



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Estudio de la diversidad y funcionalidad de la microbiota del colon distal  
asociada a enfermedades metabólicas en población mexicana**

Tesis que presenta

**Alejandra Chávez Carbajal**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de Tesis

**Dr. Jaime García Mena**

**México, D.F.**

**Julio de 2019**

# **COMITÉ TUTORAL**

## **ASESORES**

Dr. José Efraín Garrido Guerrero  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Dr. Bulmaro Cisneros Vega  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

## **ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLEULAR**

Dr. Carlos Hoyo Vadillo  
Departamento de Farmacología  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

## **ASESOR EXTERNO AL CINVESTAV**

Dr. César Ángel Hernández Guerrero  
Departamento de Salud  
Universidad Iberoamericana Cd. México

## **ASESORA ESPECIAL**

Dra. María Luisa Pizano Zárate  
Departamento de Nutrición y Bio-programación  
Instituto Nacional de Perinatología

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica Ambiental del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena; en la clínica de Medicina Familiar “Gustavo A. Madero” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPer) y en la Universidad Iberoamericana Campus Santa Fe, Ciudad de México.



Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia con Secuenciación Masiva Semiconductora de Iones y al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con reactivos y material del laboratorio y a la Ing. Linda Zuleyma Quijano Monroy por su apoyo administrativo.

Este trabajo fue financiado con apoyo del Cinvestav-IPN, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y del FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361 para Jaime García Mena.

Durante el desarrollo de este trabajo Alejandra Chávez Carbajal fue becaria de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) beca 589746 durante el período de Septiembre del año 2015 a Agosto del año 2019.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca Doctoral con el número de registro 589746 que me proporcionó y por los fondos otorgados para este proyecto.

Agradezco al Cinvestav-IPN por el apoyo otorgado para el Congreso titulado: “9ª Conferencia científica anual sobre síndrome metabólico”, realizada del 17 al 19 de Agosto de 2017 en la Ciudad de México D.F.

Además del apoyo para el curso de especialización titulado “Análisis de metagenomas y metatranscriptomas ambientales”, realizado del 25 al 29 de Septiembre del año 2017 en Ensenada Baja California.

Agradezco a mi tutor el Dr. Jaime García Mena por haberme dado la oportunidad de desarrollarme en el campo de la Biología Molecular sin previa experiencia, y por haberme tenido paciencia y haber sido mi mentor en esta área.

Agradezco a mi comité tutorial por haberme acompañado durante todo este proceso, cada semestre y siempre darme sus mejores reflexiones en cada parte de la presente tesis, en particular al Dr. Bulmaro Cisneros, Dr. Efraín Garrido mil gracias por su tiempo y enseñanzas. Además al Dr. Carlos Hoyo, por prestarme su espacio, estuve muy contenta compartiendo tiempo y experiencias con ustedes.

Se agradece la participación de los pacientes de la clínica de Medicina Familiar “Gustavo A. Madero” y de su personal médico y enfermeras quienes colaboraron con gran entusiasmo en la detección de pacientes con DT2 y sobre todo por haberme dado su incondicional apoyo para la realización de este proyecto.

De la misma manera se agradece a la Dra. María Luisa Pizano Zárte por haber proporcionado todas las herramientas a su alcance para poder desarrollar el proyecto de detección de diabetes y prediabetes en el INPer, siempre con soluciones y apoyo incondicional, por supuesto que también se agradece al personal y a los participantes por ser parte indispensable de este proyecto.

Además, se agradece a la Universidad Iberoamericana, en particular al Dr. César Hernández Guerrero por su proactiva participación y colaboración con este proyecto en particular el de pacientes que padecen obesidad y obesidad con síndrome metabólico.

## RESUMEN

En este trabajo estudiamos 287 sujetos mexicanos caracterizados en diferentes grupos de acuerdo a sus características bioquímicas y antropométricas: obesidad (OB), obesidad y síndrome metabólico (OSM) y otros grupos con intolerancia a la glucosa en diferentes etapas; Control (CO), prediabetes (PRE), T2D sin medicación (T2D-No-M), T2D con Metformina (T2D-M), T2D con polifarmacia (T2D-P) y T2D con polifarmacia e insulina (T2D-P+I). Se caracterizó la diversidad bacteriana intestinal mediante secuenciación masiva de alto rendimiento a través de la región V3 del gen 16S rRNA. Cada grupo obtuvo una firma tanto microbiológica como fenotípica propia y auténtica de los participantes de la Ciudad de México. Nuestros resultados indicaron que en mujeres OB y OSM, Firmicutes fue el Fila más abundante. Detectamos cambios significativos en la abundancia de bacterias pertenecientes a las familias Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, y Erysipelotrichaceae con un enriquecimiento significativo de 16 taxones diferentes en la microbiota intestinal de los CO, OB y OSM, los cuales explican en parte las alteraciones metabólicas observadas entre los grupos. Además, a través de PICRUSt detectamos mayor cantidad de proporciones relativas de las vías relacionadas con el metabolismo de los lípidos en el grupo OSM vs OB. Al respecto de los sujetos con intolerancia a la glucosa en diferentes etapas, encontramos una diferencia significativa en la diversidad alfa y beta de la microbiota intestinal entre todos los grupos. Se observaron diferencias en las abundancias bacterianas intestinales a nivel de familia y género. Las mayores abundancias fueron para Comamonadaceae en PRE y *Sutterella* spp. en el grupo T2D-No-M. Por otra parte, encontramos asociaciones de taxones microbianos específicos con parámetros clínicos, perfil antropométrico, ingesta dietética y actividad física. Finalmente, con el análisis de PICRUSt se predijeron vías metabólicas de la microbiota intestinal vinculadas a las condiciones T2D-M y PRE. Nuestros resultados indican que cada grupo tiene características metabólicas particulares, diversidad de bacterias intestinales y vías metabólicas específicas para cada fenotipo. Los resultados de este estudio pueden ser usados para diseñar nuevas estrategias para modular la microbiota intestinal a través de tratamientos no invasivos, como la intervención dietética, los probióticos o los prebióticos, para mejorar las características de las personas con OB, OSM, PRE o afectadas por la diabetes tipo 2 (DT2) ya que son enfermedades de alta incidencia nacional y de prioridad en nuestro país.

## SUMMARY

In this study we study 287 Mexican subjects characterized in different groups according to their biochemical and anthropometric characteristics: obesity (OB), obesity and metabolic syndrome (OMS) and other groups with glucose intolerance at different stages; Control (CO), prediabetes (PRE), T2D without medication (T2D-No-M), T2D with Metformin (T2D-M), T2D with polypharmacy (T2D-P) and T2D with polypharmacy and insulin (T2D-P+I). Intestinal bacterial diversity was characterized by high throughput DNA sequencing of the V3 region of the 16S rRNA gene. We obtained microbiological and phenotypic signatures for each group of the participants from Mexico City. Our results indicated that in OB and OMS women, Firmicutes was the most abundant phylum. We detect significant changes in the abundance of bacteria of the families Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, and Erysipelotrichaceae with significant enrichment of 16 different taxa in the gut microbiota of CO, OB and OMS, which partly explain the metabolic alterations observed among the groups. In addition, using PICRUST we detected more relative proportions of pathways related to lipid metabolism in the OMS vs OB group. Regarding subjects with glucose intolerance at different stages, we found significant differences in the alpha and beta diversities of the gut microbiota among all groups. Differences in intestinal bacterial abundances were observed at family and genera level. The greatest abundances were for Comamonadaceae in PRE and *Sutterella* spp. in the T2D-No-M group. Moreover, we find specific microbial taxa associations with clinical parameters, anthropometric profile, dietary intake and physical activity. Finally, the PICRUST analysis predicted metabolic pathways of the gut microbiota linked to T2D-M and PRE conditions. Our results indicate that each group has metabolic characteristics, diversity of gut bacteria and metabolic pathways specific to each phenotype. The results of this study can be used to design new strategies to modulate the gut microbiota through non-invasive treatments, such as dietary intervention, probiotics or prebiotics, to improve the characteristics of people that suffer of OB, OMS, PRE or type 2 diabetes (DT2), since they are diseases of high national incidence and priority in our country.

## Índice

<b>1.</b> Introducción.....	1
<b>2.</b> Antecedentes.....	10
<b>3.</b> Justificación.....	12
<b>4.</b> Hipótesis.....	14
<b>5.</b> Objetivos.....	15
<b>6.</b> Alcance.....	17
<b>7.</b> Metodología.....	18
<b>8.</b> Resultados.....	27
<b>9.</b> Avances y trabajo futuro.....	53
<b>10.</b> Anexos.....	54
<b>11.</b> Referencias.....	65
<b>12.</b> Lista de Tablas.....	80
<b>13.</b> Lista de Figuras.....	104
<b>14.</b> Lista de Abreviaturas.....	136

## 1. Introducción

La obesidad, el síndrome metabólico (SM) la prediabetes y la diabetes tipo 2 (DT2) son también conocidas como enfermedades metabólicas con una alta prevalencia e incidencia en países desarrollados y en vías de desarrollo, no distinguiendo entre género ni edad. Es conocido que el factor genético es uno de los principales factores en la presentación de enfermedades metabólicas, sin embargo, son necesarios otros factores ambientales para desarrollarlas, algunos de ellos son; la mala alimentación, la ausencia de actividad física, la forma de nacimiento de los individuos y el consumo de alcohol y tabaco entre otros.

La obesidad es considerada una enfermedad metabólica que se desarrolla por un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las que son gastadas. Uno de los grandes contribuyentes ambientales es la inactividad física debido a los nuevos modelos de trabajo, por ejemplo, trabajos de oficina, la urbanización y el desplazamiento, en el que implica movilidad en automóvil o transporte público y la ausencia de actividades recreativas. Todos ellos junto al alto consumo calórico de los alimentos como los ricos en grasas, carbohidratos y azúcares simples desempeñan un papel importante en el desarrollo de obesidad. Es considerada como el quinto factor de riesgo de muerte en el mundo, y se estima que 2.8 millones de muertes se censaron en población adulta a nivel mundial hasta el 2011, a estas muertes se les atribuye el 44% de la carga de diabetes y el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas (World Health Organization, 2014).

El criterio de la OSM es el más usado para determinar la obesidad, el Índice de Masa Corporal (IMC) es la medida de categorización que evalúa de manera individual el peso en relación a la estatura ( $\text{Kg/m}^2$ ) y es utilizado a nivel internacional,



la clasificación en el adulto es sencilla ya que un IMC mayor de 30 kg/m<sup>2</sup> es considerado como obesidad, en México se estima que más del 70% de la población adulta tiene exceso de peso y más del 90% de los casos de DT2 se atribuyen al sobrepeso y la obesidad (Dávila-Torres *et al.*, 2015; ENSANUT 2016).

El SM en América Latina tiene una prevalencia media de 24.9% con un rango entre 18.8% y 43.3%, ligeramente más frecuente en mujeres que en hombres a partir de los 50 de edad. Cabe destacar que el SM es una enfermedad que incrementa el riesgo para desarrollar Enfermedad Cardiovascular (ECV) y DT2 (Márquez-Sandoval *et al.*, 2011).

El diagnóstico de síndrome metabólico puede variar dependiendo de la organización o federación que los dictamina, por ejemplo, los propuestos por la Federación Internacional de Diabetes (FID), La OMS y el *Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol* de los Estados Unidos (ATP-III), entre otros, este último contempla la presencia de tres o más de los siguientes parámetros (Miguel Soca 2009);

1. Obesidad abdominal: circunferencia de cintura de  $\geq 102$  cm en hombres y  $\geq 88$  cm en mujeres, sin embargo, en referencia a la “*NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación*”, la circunferencia abdominal saludable está sobre los puntos de corte;  $< 90$  cm en hombres y  $< 80$  cm en mujeres para población Mexicana.
2. Triglicéridos  $\geq 1.70$  mmol/L en ambos géneros.
3. HDL- Colesterol  $< 1.04$  mmol/L en hombres y  $< 1.29$  mmol/L en mujeres.

4. Presión arterial (PA)  $\geq 130/85$  mm Hg o que tengan prescrito tratamiento farmacológico para el control de la hipertensión.
5. Glucemia en ayunas  $\geq 5.6$  mmol/L en ambos géneros.

La definición de DT2 que otorga la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1999), es aquella diabetes que comúnmente es llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta, se debe a una utilización ineficaz de la insulina, siendo el tipo de diabetes que representa aproximadamente el 90% de los casos mundiales. Se estima según cifras reportadas en enero del año 2015 que en el año anterior la prevalencia mundial de diabetes fue del 9% en personas mayores de 18 años, mientras que más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos medios y bajos (World Health Organization, 2017). En general la sintomatología consiste en poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso trastornos visuales y cansancio, sin embargo no son tan intensos, es por ello que en consecuencia, la enfermedad se diagnostica cuando ya han pasado varios años de evolución y han aparecido complicaciones como daño a órganos y sistemas, especialmente a vasos sanguíneos y nervios como consecuencia de los niveles de hiperglucemias constantes.

En México dentro de las diez enfermedades que causan muerte por grupos de edad, se encuentra la DT2, éstos reportes los otorgó el *Instituto Nacional de Estadística y Geografía* en el 2013, siendo el octavo lugar en poblaciones de entre los 25 y 34 años, la sexta causa en el grupo de 35 a 44 y la primera causa de muerte en el grupo de 45 a 64 años (INEGI, 2013), mientras que de acuerdo a la distribución

porcentual de las causas de consulta médica la diabetes ocupa el primer lugar en el grupo de edad de mayores de 50 años (ENSANUT, 2016).

Otro de los factores antes mencionados para el desarrollo de enfermedades metabólicas es el componente del genoma humano, complementado por un genoma colectivo de comunidades microbianas complejas que colonizan el cuerpo de los individuos por microorganismos comensales, algunos patógenos y también simbióticos. En general el microbioma humano está compuesto por virus protozoarios y hongos, y no únicamente por bacterias, pero al referir el microbioma se hace referencia en su mayoría a bacterias. En el *Proyecto del Microbioma Humano* (The Human Microbiome Project Consortium, 2012) lograron identificar que en el intestino se alberga uno de los ecosistemas más complejos y abundantes colonizados por más de cientos de miles de billones de microorganismos. En el adulto la mayoría de las bacterias se encuentran en el intestino y generalmente pertenecen a dos Fila bacterianos más abundantes; los Bacteroidetes (Gram-negativos) y los Firmicutes (Gram-positivos), algunos otros niveles son subdominantes, como; Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia, sin embargo las cantidades de ellos varían dramáticamente entre individuos (Belizário & Napolitano, 2015).

El estudio de la microbiota intestinal se ha propuesto desde hace algunos años como un factor ambiental responsable del control del peso corporal y metabolismo energético en donde existe una conexión con la obesidad (Ley *et al.*, 2006) y desórdenes metabólicos como la DT2 (Cani & Delzenne, 2009). Recientemente existe evidencia acumulada que sugiere que la microbiota intestinal juega un papel importante en la patogénesis de la DT2 (Han & Lin, 2014).

Se ha demostrado que la composición de la microbiota intestinal puede ser directamente responsable por inducir un estado de inflamación de bajo grado en donde existe una asociación muy cercana con la DT2 (Wellen *et al.*, 2005).

En muchas enfermedades como la DT2, se ha reportado que la etiología además de tener un componente genómico cromosomal, también está relacionada con determinantes genéticos de la microbiota y el microbioma correspondiente.

Las investigaciones acerca de la composición de las bacterias residentes del intestino en función de la DT2 han incrementado en relación al número de datos disponibles durante los últimos diez años, sin embargo, en México se carece de estudios de referencia sobre la microbiota intestinal en enfermedades metabólicas en adultos. Es por ello que se caracterizará la microbiota del colon distal para obtener una referencia propia de nuestra población y que pueda ser usada para el desarrollo de modulaciones bacterianas en el futuro. Además de ello, actualmente los estudios sobre las líneas de los metabolitos que producen las bacterias son de particular interés para la salud metabólica, por lo que en estudios experimentales en modelos animales se ha identificado que metabolitos y componentes bacterianos actúan en la homeostasis inmunológica del huésped y en el metabolismo de la glucosa principalmente por la acción de las células intestinales que participan en funciones endócrinas y como parte de la barrera intestinal (Delzenne *et al.*, 2015).

Algunas bacterias como *Clostridium* spp., *Fecalibacterium prauznitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia inulinivorans* y *Roseburia intestinalis* son productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), específicamente de butirato, e interesantemente se ha identificado que en el microbioma de pacientes con DT2 existe una disminución de ellas y un enriquecimiento de bacterias

oportunistas patógenas. También se ha observado que aquellas que se encuentran incrementadas son las reductoras de sulfato, como *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum*. (Quin *et al.*, 2012, Karlsson *et al.*, 2013). Aunque en algunas poblaciones como en japoneses se identificó que aquellos pacientes tratados con inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa se encontraron incrementados los *Lactobacillus* spp. (Sato *et al.*, 2014).

Adicionalmente se han hecho correlaciones entre los cambios en la microbiota intestinal y algunos posibles marcadores para DT2 y se ha identificado a *Lactobacillus* spp. que correlacionó positivamente con glucosa en ayuno y niveles de HbAc1, por el contrario, *Clostridium* spp. correlacionó negativamente con glucosa en ayuno, HbAc1 y niveles de insulina (Karlsson *et al.*, 2013).

Por otro lado, se sugiere que la hiperglucemia puede ser predictiva por una reducción en la proporción de bacterias anaerobias, en particular de *Bacteroides* spp. (Sepp *et al.*, 2014).

Sato *et al.*, (2014) indicaron que además de la disbiosis en la microbiota intestinal presente en la población japonesa, encontraron la presencia de bacterias vivas en muestras de sangre periférica, la mayoría de ellas Gram-positivas y se detectaron más abundantes en personas con DT2 (28%) que en los sujetos sanos estudiados (4%) con un nivel de significancia de  $p < 0.01$ , los resultados obtenidos podrían implicar una posible translocación bacteriana asociada al padecimiento.

Uno de los estudios enfocados en la microbiota del colon distal en pacientes Mexicanos que padecen diabetes tipo 1 (DT1), se realizó en niños y adolescentes mestizos nacidos en Sonora México, con predisposición genética para padecer la enfermedad, con un rango de edad entre 7 y 18 años en quienes se evaluó la

diversidad de la microbiota al inicio y posterior a dos años de tratamiento de insulina, los resultados arrojaron que los niños con la enfermedad mostraron proporciones reducidas de; *Prevotella* spp., *Megamonas* spp. y *Acidaminococcus* spp. respecto al grupo control, aunque a nivel de Fila no hubo diferencias significativas entre los dos grupos, sin embargo, los pacientes tratados con insulina luego de dos años mostraron una abundancia relativa intermedia (Entre los controles y los pacientes con DT1 en un inicio) de los géneros antes mencionados (Mejía-León *et al.*, 2014).

Con la evidencia obtenida a partir de la caracterización de bacterias en determinadas poblaciones y el conocimiento del efecto que tienen sobre el huésped, se han propuesto perspectivas terapéuticas que incluyen la modulación de la microbiota intestinal con el uso de probióticos, prebióticos, antibióticos y trasplante de microbiota fecal podría tener beneficios para mejorar el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina en el huésped (Han & Lin, 2014).

### **Nopal y el impacto de su consumo en la salud.**

El nopal (*Opuntia* spp.) es considerado un alimento funcional ya que se ha comprobado que tiene actividad antioxidante y capacidad para mejorar biomarcadores de síndrome metabólico (Morán Ramos, *et al.*, 2012).

Se documentó la cantidad de flavonoides y ácidos fenólicos de 10 especies diferentes de nopal entero y posteriormente deshidratado en 8 de ellos, encontrando que para cada variedad existen diferentes cantidades de sustancias fenólicas y flavonoides, de los cuales la variedad Tapón 3, es una de las que tiene altas concentraciones de ácido gálico (23.7 µg/g), sin embargo, la especie llamada cristalino se detectó un contenido de 6.4 µg/g. En relación con los flavonoides (Iso-

quercetina, Nicotiflorina, Rutina y Narcisina) se detectó que todas las variedades de nopal que se analizaron tuvieron altas concentraciones de ellos, la quercetina parece tener una actividad neuro-protectora y supresora de estrés en los cardiomiocitos (Guevara Figueroa *et al.*, 2010).

Se demostró que el ácido gálico a concentraciones de hasta 50 mM inhibe el crecimiento de los adipocitos e induce apoptosis en células 3T3-L1, lo que podría sugerir que los compuestos fenólicos podrían ser la base para formulación de medicamentos anti-obesidad (Hsu, Yen 2008).

Uno de los componentes del nopal en mayor proporción es la fibra dietética, en el estudio de Rodríguez-García *et al.*, 2007, se caracterizó la composición del nopal conforme los estados de maduración respecto al tiempo de cosecha, ya que la hoja de nopal cambia de tamaño, el objetivo fue determinar si también la composición nutrimental cambiaba conforme el contenido nutrimental, para ello se tomó la variedad Redonda y se midieron sus componentes nutrimentales hasta los 20 días de cosecha alcanzando un peso de 60g y a los 60 días de cosecha alcanzando un peso de 200g por hoja de nopal. Resultados importantes fueron los del contenido de fibra, la cual se divide en dos grandes categorías, fibra soluble a la cual pertenecen las pectinas, las gomas y los mucílagos, disminuyó del 25% al 14% en función de los estados de maduración y por el contrario, la fibra insoluble a la que pertenecen la celulosa, la hemicelulosa y la lignina incrementa del 29 al 41% conforme pasan los días de cosecha.

Por lo tanto, el nopal es una fuente rica en fibra dietética, tanto en la fracción insoluble como en la soluble, las cuales tienen un impacto en la salud digestiva en el consumidor ya que la fibra insoluble absorbe agua y acelera el paso de los

alimentos por el tracto digestivo retrasando la absorción de los azúcares y provocando una sensación de saciedad y de esta manera contribuyendo a la pérdida de peso.

La recomendación de consumo de fibra para población adulta es de 25g/día, en el caso del nopal el consumo de 350g representa un 28% (7.04g) del consumo de fibra diario recomendado.

Un ensayo clínico en un modelo de ratas con obesidad inducida (durante 6 meses) demostró que una dieta prehispánica mexicana (Maíz, frijol, tomate, nopal, chía y semillas de calabaza en forma deshidratada, exenta de celulosa) disminuyó la ganancia de peso, la intolerancia a la glucosa, leptina y triglicéridos en hígado y suero. Además disminuyó el tamaño de los adipocitos e incrementó la abundancia de las proteínas involucradas en el desarrollo de tejido adiposo blanco (PPAR-alfa y UCP-1), por otro lado detectaron que la microbiota también sufrió cambios respecto al incremento de la abundancia de un 64% de *Bifidobacterias* y un 21% en la abundancia de *Lactobacillus* esto con respecto a otro grupo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa más un 5% de sacarosa diluida en agua durante tres meses (Ávila-Nava *et al.*, 2017).



## 2. Antecedentes

El cuerpo humano contiene dos acervos genéticos adicionales a los genes cromosomales que tienen un efecto sobre la salud y que se relacionan con enfermedades como la DT2 y la obesidad: el genoma mitocondrial (Ji *et al.*, 2015; Martin & McGee, 2014) y el Microbioma definido como la colección de genes de todos los genomas de la microbiota que puebla el cuerpo humano (van *et al.*, 2015; Blaut, 2015).

En nuestro grupo hemos desarrollado investigación en México y sobre mexicanos en relación a enfermedades que son un problema de salud Nacional como la DT2 y la obesidad. Como parte de este trabajo se realizan estudios sobre el genoma humano que han permitido reportar hallazgos a nivel de expresión transcripcional en sangre periférica, donde se estudiaron veinte genes asociados con obesidad en niños mexicanos, se encontró una diferencia significativa en la expresión de los genes; *FTO*, *GHRL*, *ADIPOR1* y *ADRB1*, lo que podría indicar que están involucrados en el proceso de desarrollo de obesidad (Ulloa-Martínez. *et al.*, 2016). En contraste, el polimorfismo del gen *TCF7L2* (rs12255372) mostró ser protector para obesidad en niños Mexicanos en edad escolar de la Ciudad de México (Klünder-Klünder *et al.*, 2011).

En relación con los estudios sobre DT2 en población adulta, se estudió la asociación de genes *CAPN10*, *TCF7L2*, *IRS1* y *PPARG* con DT2 en pacientes de poblaciones diferentes de México como la Ciudad de México y el Estado de Guerrero, encontrándose que un polimorfismo de una sola base (SNP) en sólo dos genes (*TCLF7L2* SNPs rs7903146 y *IRS1* SNPs Gly972Arg) presentaron una fuerte asociación para DT2 en ambos grupos de estudio (Martínez-Gómez *et al.*, 2011).

Se encontró también asociación de otro SNP del gen *TCF7L2* (rs12255372) con DT2 en pacientes de la ciudad de México, pero curiosamente el SNP en el gen no se asoció con SM, sin embargo, si hubo asociación con DT2 y con SM para el gen *ADRB3* (rs4994) (Cruz *et al.*, 2010). De la misma manera la variante *ADRB3* Trp64Arg se asoció significativamente con DT2 y *ADRB1* Gly389Arg en alteraciones del metabolismo de lípidos al encontrar que los niveles sanguíneos de insulina y de LDL respectivamente se encontraron elevados (Burguete García *et al.*, 2014), por lo que la importancia de los hallazgos obtenidos podría resultar en posibles marcadores para predecir el riesgo a algunas de las alteraciones metabólicas como DT2, prediabetes y síndrome metabólico.

Como antecedente, nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios dentro del marco de caracterización y análisis de la microbiota del colon distal y los metabolitos producidos en niños mexicanos con sobrepeso y obesidad, en quienes se determinó que la abundancia en al menos nueve diferentes bacterias se encuentran alterada, al igual que la concentración de los AGCC específicamente ácido butírico y propiónico en heces (Murugesan *et al.*, 2015).

### 3. Justificación

La diversidad microbiana del colon distal ha sido estudiada ampliamente, por lo menos en la última década se han realizado estudios en diversas poblaciones en un número importante de enfermedades metabólicas de importancia epidemiológica mundial como lo son la obesidad y la DT2, sin embargo en población mexicana los reportes existentes en relación a la microbiota-obesidad (Murugesan *et al.*, 2015) y Microbiota-DT1 (Mejía-León *et al.*, 2014) están dirigidos a la población infantil, por lo que el presente trabajo tiene enfoque en la detección y caracterización de la microbiota del colon distal en enfermedades metabólicas como; obesidad, síndrome metabólico, prediabetes y DT2 en adultos mexicanos.

Las consecuencias mayores en la calidad de vida de los afectados con obesidad mórbida son múltiples, entre ellas destacan las siguientes: síndrome de hipoventilación-obesidad; enfermedad cardiovascular; apnea obstructiva del sueño; neoplasias (hígado, endometrio y mama); artropatía degenerativa de articulaciones de carga; hipertensión arterial y DT2 (Cabrerizo *et al.*, 2008), que a su vez esta última presenta otras comorbilidades debido al estado de hiperglucemia crónica que causa disfunción endotelial y puede desarrollar procesos de aterosclerosis. En referencia a las complicaciones macro vasculares se encuentran: enfermedad cerebrovascular y enfermedad isquémica coronaria, y referente a las complicaciones microvasculares las más representativas son; neuropatía y pie diabético, retinopatía y nefropatía (Ramos *et al.*, 2014).

Además de las consecuencias graves y el impacto en la salud de las enfermedades metabólicas presentadas aquí, los costos por enfermedad son altos, agravando la economía del individuo que la padece y también la de la sociedad, es

por ello que el sistema de salud en México estimó en 1991 que los costos directos fueron de 100 millones de dólares, de ellos 15 millones fueron para control metabólico y 85 para servicios adicionales mientras que los costos indirectos fueron de 330 millones de dólares, sin embargo la presencia de las complicaciones micro y macro vasculares incrementa el costo del tratamiento a más de 3.5 veces del tratamiento sin complicaciones, cerca del 62% de los gastos se destinan para hospitalizaciones mientras que para el tratamiento farmacológico lo representa el 18% del total de los costos (Zárate & Flores, 2012).

Por otro lado se conoce que el componente genético del individuo que lo predispone para el desarrollo de ciertas enfermedades, sin embargo identificar el comportamiento alimentario, la composición corporal, el perfil metabólico, la cantidad de actividad física, la composición de la microbiota y el microbioma del colon distal así como sus metabolitos de alguna manera podría esclarecer el problema en una población definida y podría proporcionar una visión clara respecto a los blancos bacterianos para su posterior modulación, la cual podría traer un beneficio para la salud del individuo.

#### **4. Hipótesis**

H<sub>i</sub>: La diversidad microbiana y el componente genómico del microbioma del colon distal en adultos mexicanos que padecen enfermedades metabólicas como obesidad, síndrome metabólico, prediabetes y DT2 son diferentes al de las personas sanas.

H<sub>0</sub>: La diversidad microbiana y el componente genómico del microbioma del colon distal en adultos mexicanos que padecen enfermedades metabólicas como obesidad, síndrome metabólico, prediabetes y DT2 no son diferentes al de las personas sanas.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar si existen diferencias en la diversidad microbiana y el componente genómico del microbioma del colon distal en población Mexicana que padece enfermedades metabólicas como prediabetes, diabetes tipo 2, síndrome metabólico y obesidad al respecto de las personas sanas.

### **5.2 Objetivos Específicos**

#### **Fase I. Reclutamiento y recolección de muestras de casos y controles.**

Objetivo 1. Seleccionar individuos de las bases de datos.

Actividad 1.1. Valoración clínica.

Actividad 1.2. Determinación de la composición corporal.

Actividad 1.3. Aplicación de encuestas de consumo dietético.

Actividad 1.4. Cuantificación de actividad física.

Objetivo 2. Obtener muestras biológicas de sangre y copro.

Actividad 2.1. Recolección de las muestras biológicas de heces y sangre.

#### **Fase II. Análisis bioquímico en muestras de sangre y copro.**

Objetivo 3. Determinar el perfil bioquímico de los casos y controles.

Actividad 3.1. Cuantificación de glucosa, insulina, colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos en ayunas.

### **Fase III. Caracterización de la microbiota y del microbioma.**

Objetivo 4. Caracterizar la microbiota del colon distal de casos y controles.

Actividad 4.1. Creación de una biblioteca de copro DNA de muestras de casos y controles.

Actividad 4.2. Construcción de genotecas 16S rDNA por PCR.

Actividad 4.3. Secuenciación masiva en paralelo en tecnología Ion Torrent de las genotecas 16S rDNA.

### **Fase IV. Procesamiento de los datos.**

Objetivo 5. Analizar los datos de secuenciación y establecer un modelo de asociación.

Actividad 5.1 Análisis de las bases de datos obtenidas.

Actividad 5.2 Establecer un modelo de asociación microbiota-microbioma con las enfermedades metabólicas y sus respectivos controles.

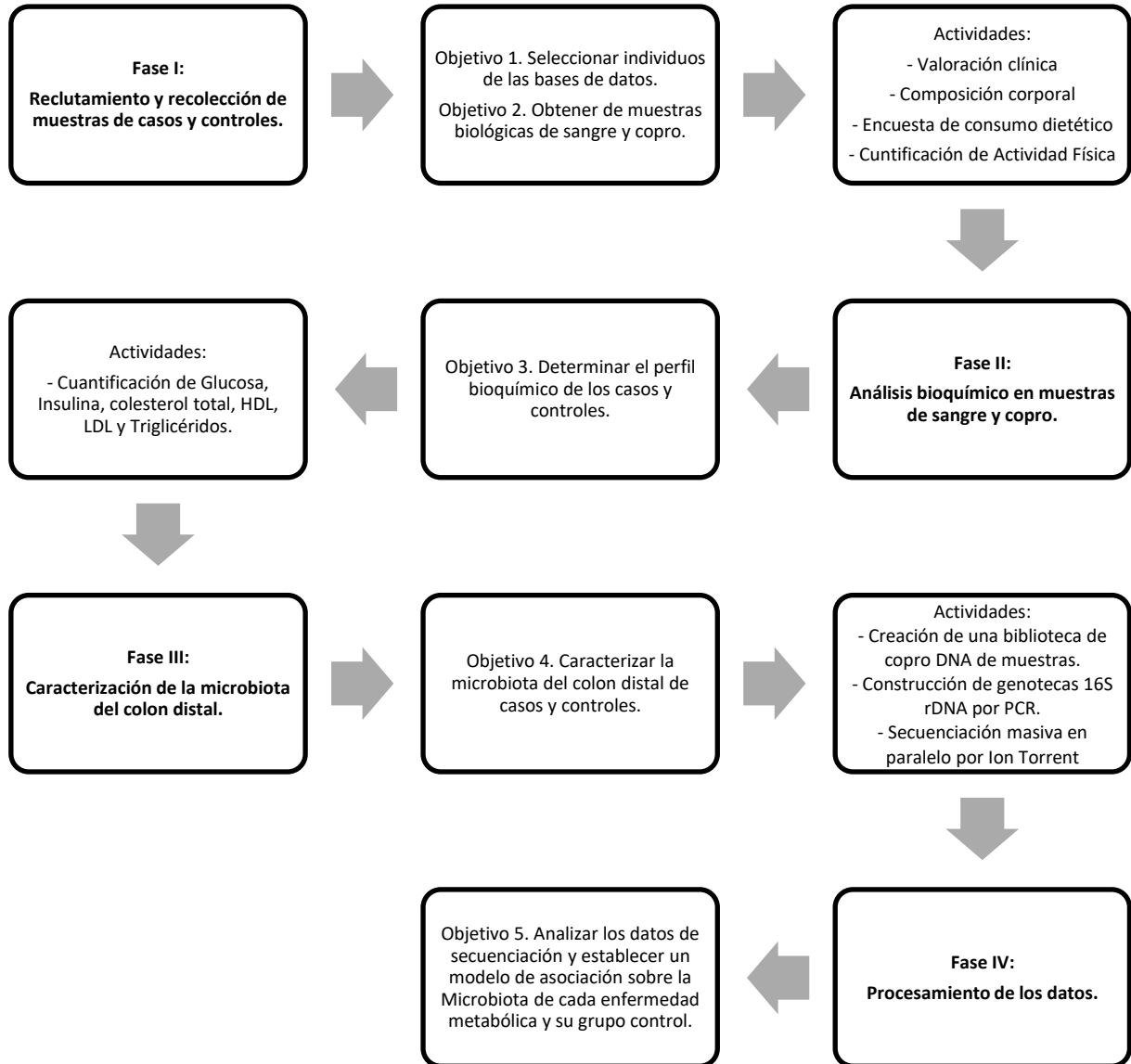
## **6. Alcance**

El alcance de la presente investigación es la caracterización de la diversidad microbiana y el componente genómico del microbioma del colon distal en pacientes adultos mexicanos con IMC normal, obesidad y obesidad con síndrome metabólico (67 pacientes), y por otro lado, pacientes control, con prediabetes y DT2 debutantes y medicados (217 pacientes), de manera que al caracterizar la microbiota-microbioma y comparar con el de las personas sanas, se pueda tener un panorama acerca del tipo de microorganismos que habitan el tracto digestivo en cada padecimiento, mostrando una perspectiva para modular la microbiota, por medio de estrategias alimentarias como; estrategias dietéticas, desarrollo de suplementos de pre o probióticos o trasplante fecal.



## 7. Metodología

### 7.1 Plan de Trabajo



## **7.2 Materiales y Métodos**

### **7.2.1 Diseño de estudio**

Descriptivo transversal de casos y controles.

### **7.2.2 Población de estudio**

Se invitó a participar en el estudio a población abierta que acudió a las instalaciones participantes, que una vez explicado el protocolo firmaron el consentimiento informado aprobado por los respectivos comités de ética de las siguientes instituciones: la Universidad Iberoamericana campus Santa Fe, en la ciudad de México, la Clínica de Medicina Familiar Gustavo A. Madero (ISSSTE) y el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPer).

### **7.2.3 Tamaño de la muestra**

IBERO: 25 pacientes con IMC normal o controles, 17 pacientes con IMC de Obesidad y 25 pacientes con obesidad y síndrome metabólico

ISSSTE e INPer: 76 pacientes controles para diabetes, prediabetes 54, 14 pacientes debutantes para DT2, 14 pacientes con DT2 y Metformina como tratamiento farmacológico, 22 pacientes con DT2 y tratamiento farmacológico para hipertensión o hiperlipidemias, y 37 pacientes con DT2 y tratamiento farmacológico para hipertensión o hiperlipidemias y además insulina exógena para el control de su diabetes.

#### **7.2.4 Técnica de muestreo**

No probabilístico. Por cuotas (se fundamenta en el conocimiento de que los individuos serán representativos para los fines de la investigación).

#### **7.2.5 Métodos y Técnicas**

El presente protocolo de investigación fue aprobado por la “Universidad Iberoamericana de la ciudad de México” con el número 2018-01 el 28 de Octubre de 2013. El comité científico de ética y de investigación de la “Clínica de Medicina familiar Gustavo A. Madero” y el “Instituto Nacional de Perinatología (539) 212250-3310-21108-04-1” en el año 2016. Se les invitó a participar en el estudio a los pacientes y a los controles por medio de una búsqueda en las bases de datos de las instituciones participantes, se explicaron los beneficios indirectos de la investigación y la importancia de los resultados que se obtuvieron. Se les explicaron los puntos importantes de la carta de consentimiento informado (**ANEXO 1**) y se explicó la forma de toma de muestra de heces (**ANEXO 2**), se les otorgó un vaso de copro para colectar heces, el cual se les pidió entregar un día posterior. Se procedió al interrogatorio que el investigador aplicó (**ANEXO 3** para los casos o **ANEXO 4** para los controles) el cual contiene datos acerca de su historial clínico. Se cuantificó la actividad física por medio de un cuestionario validado para países en vías de desarrollo, elaborado por la *Organización Mundial de la Salud*, llamado Cuestionario Mundial de Actividad Física (**ANEXO 5**) o GPAQ por sus siglas en Inglés (Global Physical Activity Questionnaire) los resultados se reportaron en Equivalentes Metabólicos (METs) y finalmente se aplicó un recordatorio de 72 horas (**ANEXO 6**) para determinar el consumo de macro y micronutrientes de los pacientes. Los

parámetros antropométricos como el peso y la estatura se midieron por medio de una báscula clásica con estadiómetro, de capacidad de 0 a 160 Kg., mientras que para la medición de circunferencia abdominal y circunferencia de cadera se midió con una cinta métrica antropométrica marca Lufkin Executive Thinline, modelo W606PM. Para la medición de la composición corporal se utilizó el método de pletismografía (Body pod) por medio de la tecnología de desplazamiento de aire, además de Impedancia bioeléctrica (Inbody), con los que se cuenta el INPer y IBERO. Una vez concluida la fase de obtención de las muestras de sangre se procedió a realizar los análisis bioquímicos correspondientes para determinar el estado metabólico de los participantes.

#### Análisis bioquímicos: Determinación de glucosa y perfil lipídico

De una muestra de sangre periférica se obtuvo el suero y se congeló a una temperatura de -70° C. La glucosa se determinó por medio de la glucosa oxidasa, detectada por método fotométrico, el colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, mientras que el colesterol-LDL se determinó por medio de una prueba colorimétrica.

#### Extracción de DNA de heces

Para la extracción de DNA se utilizó la cantidad de 200 mg de heces usando un kit llamado AquaStool (Aquaplasmid). La cantidad de la purificación de DNA se midió con una absorbancia de 260/280 usando el espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific), posteriormente se evaluó la calidad por fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 0.5% (Murugesan *et al.*, 2015).

### Construcción de la genoteca V3-16S rDNA

Para cada muestra de DNA fecal se incluyó un amplicon de aproximadamente 281 pb de la región polimórfica V3 del gen 16S rRNA, fue amplificado usando un primer V3-341F contenido en un barcode de 12 pb, siendo un barcode para cada muestra (Fierer *et al.*, 2008). Un adaptador para secuenciación masiva en Ion Torrent PGM (Life Technologies) y un primer anti sentido V3-518R que contenía adaptadores P1 Truncados (TrP1) (Whiteley, *et al.* 2012). La programación de termociclador fue de: 5 minutos a 95° C; 25 ciclos de (15 segundos a 94° C, 15 segundos a 62° C y 15 segundos a 72° C); posteriormente 10 minutos a 72° C. La amplificación fue realizada usando PCR GeneAmp System 2700 Termociclador (Applied Biosystems) (Murugesan *et al.*, 2015).

### Secuenciación semiconductor de iones de DNA, Ion Torrent

Para la secuenciación, se midieron cantidades equivalentes de los amplicones de aproximadamente 10 µg cada uno. Cada mezcla de genotecas de la región V3 del gen 16S rRNA fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se cortó y se purificó el gel usando el sistema Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up System (Promega). La concentración de DNA de cada genoteca fue medida por el espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). El tamaño promedio de cada amplicón de la librería fue de 263 pb. La emulsión de PCR fue llevada a cabo usando el Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El enriquecimiento del amplicón con esferas iónicas se llevó a cabo usando Ion OneTouch ES. La secuenciación se realizó usando el Chip Ion 316 Kit V2 y el sistema Ion Torrent PGM. Posteriormente

de la secuenciación las lecturas fueron filtradas por el software PGM para remover las secuencias policlonales y de baja calidad.

#### qPCR para la medición de la carga bacteriana total y la composición de los Fila más abundantes.

La carga bacteriana y las abundancias de Firmicutes y Bacteroidetes se estimaron mediante qPCR. Seleccionamos al azar siete muestras de CO, cinco de OB y siete de OSM por método de muestreo estratificado proporcional correspondiente al 25% de cada grupo. Utilizamos el sistema de PCR en tiempo real StepOne (Thermo Scientific), los cebadores (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Universal) y las condiciones desarrolladas para cada taxón bacteriano [Bacchetti *et al.*, 2011]. Para cada par de cebadores, determinamos la especificidad de los productos y la ausencia de dímeros de cebadores utilizando un análisis de curva de fusión. El Ct se midió por triplicado para cada par de cebadores. Utilizamos la prueba de ANOVA para detectar diferencias significativas en el Ct entre los grupos y una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas específicas entre pares de grupos.

#### **7.2.6 Criterios de selección**

Criterios de Inclusión: personas que tuvieron un IMC de  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ , que decidieron participar en el estudio y otorgaron una muestra de sangre para obtener plasma y heces para su posterior estudio. En el caso de pacientes con DT2 se incluyeron a aquellos que tuvieron diagnóstico por medio de parámetros

establecidos por la *American Diabetes Association* y que tuvieron una edad de entre 40 y 55 años.

Criterios de Exclusión: enfermedades gastrointestinales, tratamiento con antibióticos durante los últimos 2 meses, vegetarianos y veganos, alergias y enfermedad autoinmune.

### **7.2.7 Consideraciones bioéticas**

La investigación se apegó a la Ley General de Salud y contó con la firma de previo consentimiento informado de todos los participantes del presente estudio, de acuerdo con la Declaración de Helsinki del año 2000 y no representó daño a la población en estudio.

### **7.2.8 Análisis estadístico**

Los datos clínicos, dietéticos, antropométricos y de actividad física, se procesaron en el programa estadístico SPSS v.24.0 por medio de análisis paramétricos, el nivel de significancia a aceptar fue de  $p < 0.05$  y el intervalo de confianza de 95%. Para el análisis de la estimación de la alfa y beta diversidad se utilizó el software QIIME por medio del análisis de coordinados principales (PCoA) y el análisis de semejanza por ANOSIM (Jervis-Bardy J., 2015).

## **8. Resultados**

### **Fase I. Reclutamiento y recolección de muestras de casos y controles.**

Objetivo 1. Se seleccionaron a los individuos de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión.

Objetivo 2. Se obtuvieron las muestras biológicas de sangre y copro.

Actividades: se determinó la valoración clínica, composición corporal, encuesta de consumo dietético y cuantificación de actividad física de los casos y controles.

### **Fase II Análisis bioquímico en muestras de sangre y copro.**

Objetivo 3. Se determinó el perfil bioquímico de casos y controles.

Actividades: Se cuantificó la glucosa en ayunas, insulina, colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos en suero y plasma de sangre periférica.

### **Fase III Caracterización de la Microbiota del colon distal de casos y controles.**

Objetivo 4. Para la caracterización de la microbiota del colon distal en casos y controles se realizaron las siguientes actividades:

Se creó una biblioteca de copro DNA de muestras; a partir de la extracción de DNA de heces con el Kit ZR Fecal DNA MiniPrep, se midió la pureza con una absorbancia de 260/280 usando el espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific), datos mostrados en la Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3.

Se evaluó la calidad por fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 0.5%.



Posteriormente se realizó PCR diagnóstico del gen 16S rRNA para conocer su condición de ser amplificado en geles de agarosa al 1.5%; las imágenes de los geles se mostraron en la sección 1 de figuras.

Se realizó la construcción de genotecas 16S rDNA por PCR; los geles de agarosa al 1.5% para identificar el DNA con Barcodes de las muestras se muestran en la sección 2, 4 y 6 de figuras.

Se realizó la secuenciación masiva en paralelo por la tecnología de Ion Torrent.

#### **Fase IV. Procesamiento de los datos obtenidos por la secuenciación.**

Objetivo 5. Analizar los datos de secuenciación y establecer un modelo de asociación y se realizan las siguientes actividades:

El análisis de calidad de los datos obtenidos del secuenciador Ion Torrent se realizaron por medio del programa FastQC.

Se cortaron las secuencias de acuerdo con el análisis previo por medio de la herramienta de recorte llamada Trimmomatic, resultando en un corte a 200 pb.

Se asignó taxonomía con QIIME v 1.0.

Con los OTU's generados se utilizó la base de datos de Green Genes, para la identificación de las bacterias del colon, quien ofrece una similitud de identidad del 97%.

Se generaron tablas con los resultados de diversidad microbiana en el orden siguiente; Fila, Clase, Orden, Familia y Género para el análisis de los datos obtenidos.

Se analizaron las abundancias relativas de las bacterias por grupos, con el software SPSS v.24.0 y se reportaron aquellas en las cuales existió una diferencia de  $p < 0.05$ .

### **Resultados del artículo titulado:**

Chávez-Carbajal A, Nirmalkar K, Pérez-Lizaur A, Hernández-Quiroz F, Ramírez-Del-Alto S, García-Mena J, Hernández-Guerrero C. **Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome.** *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 21;20(2). pii: E438. doi: 10.3390/ijms20020438.

**Las mujeres mexicanas que sufren de obesidad u obesidad más síndrome metabólico exhiben parámetros clínicos de acuerdo con su condición.**

Estudiamos a 67 mujeres en donde las características clínicas de las participantes permitieron clasificarlas en tres categorías: 25 controles o sanas (CO) con un promedio de 23.3 años, 17 mujeres que padecían obesidad (OB) con 33.8 años de promedio, y 25 mujeres que padecen de obesidad + síndrome metabólico (OSM) con una edad promedio de 40.5 años. Los datos antropométricos mostraron que, entre los tres grupos, las mujeres con OB y OSM tienen los valores más altos en peso, índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera y relación cintura-cadera. De la misma manera, los datos bioquímicos muestran que las mujeres con OB y OSM tuvieron glucosa elevada en ayunas,

triglicéridos, colesterol, lipoproteína de baja densidad y disminución del nivel de lipoproteína de alta densidad. Además, la presión sanguínea fue normal en los grupos CO y OB, y normal en promedio en la condición OSM (Tabla 4). La evaluación dietética no mostró diferencias significativas entre los grupos (resultados no mostrados).

### **Firmicutes es el Filo bacteriano más abundante en mujeres que sufren de obesidad y obesidad más síndrome metabólico.**

Caracterizamos la diversidad bacteriana intestinal en muestras de heces como se describe en la sección Métodos. Encontramos que en todas las categorías el orden de Fila dominante de mayor a menor porcentaje de abundancia relativa fue; Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria (Fig. 1). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis ( $p = 0.0029$ ) y la corrección de Benjamini-Hochberg ( $q = 0.0345$ ) indicaron un cambio significativo en la abundancia relativa para Firmicutes con 56.95% para CO, 72.97% para OB y 73.34% para OSM. Sin embargo, no hubo un cambio significativo en la abundancia de Bacteroidetes ( $p = 0.7125$ ,  $q = 1.0000$ ), aunque el grupo CO tenía un 36.20%, el OB 22.50% y el OSM tenía una abundancia del 23.43%. La misma situación fue para el resto de los otros Fila; Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes, Cyanobacteria y Sinergistetes. La categoría "Otros" que incluye Fila de menor abundancia como; Verrucomicrobia, Spirochaetes y Fusobacteria, mostró una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ) (Fig. 1 y Tabla 5). La carga bacteriana y la abundancia de Firmicutes y Bacteroidetes también se evaluaron mediante qPCR como se describe en la sección Métodos. Los resultados mostraron que no hay un cambio significativo en la carga bacteriana ( $p$

= 0.646) y la abundancia de Bacteroidetes ( $p = 0.661$ ); sin embargo, los datos sugirieron un ligero aumento en la abundancia de Firmicutes ( $p = 0.053$ ) entre los grupos (Tabla 10). Un análisis adicional de los datos utilizando la prueba de Tukey como una prueba post hoc, confirmó que hay al menos un aumento en Firmicutes ( $p = 0,046$ ) en el grupo de OSM con respecto al grupo de CO.

### **La abundancia de algunas bacterias cambió en mujeres que sufren de obesidad y obesidad más síndrome metabólico.**

A nivel de géneros el análisis estadístico indicó un cambio significativo en el porcentaje de abundancia relativa para *Faecalibacterium* ( $p = 0.0003$ ,  $q = 0.0290$ ) un miembro de la familia Ruminococcaceae, que aumentó 2 veces su abundancia con 0.55% en CO, 1.15% en OB, y 1.19% en OSM. También observamos un aumento significativo de al menos 2,8 veces en la abundancia para los miembros de la familia Lachnospiraceae. En este caso, *Roseburia* ( $p = 0.0002$ ,  $q = 0.0231$ ), tenía una abundancia de 0.89% en CO, 2.72% en OB y 2.14% en MS, y *Lachnospira* ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.0075$ ) tenía una abundancia de 0.99% en CO, 3.24% en OB y 3.79% en OSM. Finalmente, *Coprococcus*, ( $p = 0.0002$ ,  $q = 0.0231$ ) tuvo una abundancia de 2.18% en CO, 4.55% en OB y 4.51% en OSM. Sorprendentemente, la familia Erysipelotrichaceae ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.00075$ ) tuvo una disminución de casi 5 veces en la abundancia de 1.74% en CO, a 0.38% en OB y 0.36% en OSM (Fig. 2, Tabla 7).

**La diversidad beta de la microbiota intestinal de mujeres con obesidad y obesidad más síndrome metabólico fue similar y diferente del grupo de control.**

La diversidad beta se calculó utilizando un análisis unifraco no ponderado y las distancias estimadas entre las muestras de los tres grupos. El gráfico de dispersión tridimensional generado utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA); agrupa claramente las comunidades de la microbiota del colon de los grupos OB y OSM en el que se aprecia claramente la separación respecto a la distribución de la microbiota del grupo CO (Fig. 3).

**La diversidad alfa de la microbiota intestinal de las mujeres con obesidad más síndrome metabólico es más rica que la diversidad en la obesidad y las condiciones de control.**

Estimamos la riqueza de especies entre las condiciones de CO, OB y OSM (Fig. 4). Los índices Observado y Chao1 indican que la comunidad bacteriana en la MS tiene la mayor riqueza, seguida por OB y CO. El índice de Shannon, un estimador de la diversidad, determinó que la comunidad bacteriana en la condición OB era más diversa que la OSM y el CO, además, el índice Simpson, otro indicador de la diversidad, mostró que la comunidad bacteriana OB era más diversa que las comunidades encontradas en las condiciones de OSM y CO.

**Las bacterias intestinales de once familias diferentes podrían explicar las diferencias metabólicas observadas entre los grupos de control, obesidad y obesidad más síndrome metabólico.**

Basándonos en las abundancias relativas de las bacterias intestinales en los grupos CO, OB y OSM, usamos un algoritmo de tamaño de efecto de análisis lineal discriminativo (LEfSe), seguido de una corrección Benjamini-Hochberg, para determinar las bacterias que podrían explicar las diferencias metabólicas observadas entre los grupos (Fig. 5). Seis géneros y familias (*Lachnospiraceae*, *Lachnospira*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* y *Megamonas*) se enriquecieron en el grupo OSM (color verde), mientras que siete géneros y familias (*Bacteroides*, *Streptococcus*, *Erysipelotrichaceae*, *Parabacteroides*, *Staphylococcus*, *Turicibacter* y *Lactococcus*) en el grupo CO (color rojo), y tres géneros y familias (*Roseburia*, *Succinivibrio* y S24-7) se enriquecieron en el grupo OB (color azul) (Tabla 8).

### **El metagenoma funcional predicho de la microbiota intestinal muestra diferencias entre los grupos de estudio.**

A continuación, quisimos explorar si las rutas metabólicas encontradas en la microbiota intestinal están relacionadas con las diferencias metabólicas encontradas en los grupos CO, OB y OSM. Para esto, hicimos un análisis de predicción comparativo del metagenoma funcional de la microbiota bacteriana intestinal (como se describe en la sección de Métodos). Observamos rutas metabólicas implicadas en el metabolismo lipídico, cuerpos cetónicos y la biosíntesis de Acetil Coenzima-A aumentó significativamente en la microbiota intestinal de OSM y OB. Por otro lado, observamos rutas metabólicas relacionadas con aminoácidos, amino azúcares y metabolismo energético, así como

glucólisis/gluconeogénesis y vías de adipocitoquinas aumentó significativamente en los individuos con CO (Fig. 6), (Tabla 9).

## **Discusión**

En este trabajo, estudiamos a mujeres mexicanas que sufren de obesidad u obesidad más síndrome metabólico. Se examinaron 67 mujeres voluntarias, 25 mujeres con peso normal (CO), 17 con obesidad (OB) y 25 con obesidad y síndrome metabólico (OSM) (Tabla 4). Los datos antropométricos, bioquímicos y la presión arterial distinguen claramente las categorías fenotípicas entre los sujetos estudiados.

Según el IMC, las mujeres en obesidad tienen en promedio obesidad tipo I, mientras que las mujeres en la categoría OSM tienen en promedio obesidad tipo II (*World Health Organization, 2017*). También es notable que las mujeres OB y OSM casi duplican en promedio la edad del CO. No fue posible encontrar mujeres mayores no afectadas en la comunidad donde se recolectó la muestra.

La circunferencia media de la cintura  $>80.0$  cm, es considerada alta en los grupos OSM y OB, así como la relación cintura-cadera  $\geq 0.85$  cm sugieren un mayor riesgo de complicaciones metabólicas para estas mujeres.

Las mujeres en el grupo de OSM tienen una dislipidemia caracterizada por niveles elevados de triglicéridos y lipoproteínas LDL, y un bajo nivel de lipoproteínas HDL; por otro lado, las mujeres en OB tienen una dislipidemia caracterizada por un aumento de lipoproteínas LDL, y un nivel bajo de HDL (Tabla 4) (*National Cholesterol Education Program, 2002* y *Meaney et al., 2013*). En promedio, la glucosa en ayunas y el colesterol total estaban en niveles normales en OB, mientras

que las mujeres de OSM tenían un nivel de glucosa en ayunas que sugería prediabetes (American Diabetes Association, 2018).

Dado que la diabetes tipo 2 es un criterio de eliminación, en realidad eliminamos cuatro sujetos que tenían valores elevados de glucosa en ayunas durante el estudio. La relación LDL-c/HDL-c fue significativamente más alta y muy cercana al valor de corte de 3.0 para el nivel de riesgo cardiovascular, en los grupos OSM y OB con respecto al grupo de CO.

Por otro lado, la proporción media de CT/HDL en el grupo OSM fue mayor que la tasa de punto de corte de 4.5, lo que indica un riesgo cardiovascular para estas mujeres (Millán *et al.*, 2009).

Otros parámetros, como la presión arterial sistólica y diastólica, se encontraron en el rango normal para las mujeres mexicanas en los grupos OB y OSM (NOM-030-SSA2-2009). Los resultados anteriores muestran que la hiperglucemia y la dislipidemia son factores para la condición de OSM en mujeres de nuestro estudio (Alberti *et al.*, 2009).

Los resultados de la caracterización de la microbiota intestinal mostraron que Firmicutes es el Fila bacteriano más abundante en mujeres que sufren de OB y OSM con respecto al CO (Fig. 1). La disbiosis de la microbiota intestinal que afecta a bacterias pertenecientes a los Fila Firmicutes se ha notificado en mujeres austriacas de 58-71 años (Lippert *et al.*, 2017).

Se cree que el aumento de las abundancias relativas del Fila de los Firmicutes son un factor contribuyente para el desarrollo de obesidad, y en nuestro estudio, la proporción de la abundancia relativa de Firmicutes/Bacteroidetes para OSM fue de 3.13, para OB de 3.24 y CO 1.57.



Este resultado está de acuerdo con informes anteriores que muestran que la alta abundancia de Firmicutes está asociada a la obesidad en niños mexicanos de 6 a 14 años de edad (Estrada-Velasco *et al.*, 2014; Murgesan *et al.*, 2015), o Niños italianos de 9 a 16 años (Riva *et al.*, 2017). Además, aunque sin significancia estadística, la abundancia de Bacteroidetes y Actinobacteria en nuestro estudio fue mayor en mujeres con CO con respecto a OB y OSM (Fig. 1). Se informó también que las bacterias de estos Fila son capaces de inhibir simultáneamente el crecimiento de Firmicutes (Barczynska *et al.*, 2016).

Observamos que la abundancia de algunas bacterias cambió en los grupos OB y OSM. Un análisis estadístico no paramétrico de la abundancia relativa de bacterias entre los grupos estudiados (Fig. 2), mostró diferencias en los miembros de tres familias. *Faecalibacterium* spp., de la familia Ruminococcaceae fue significativamente más abundante en OB y OSM. La abundancia de *F. prausnitzii* en heces (un importante productor de butirato) está correlacionada con la obesidad en algunas poblaciones, pero no en otras, lo que sugiere que se debe considerar la ascendencia, la ubicación geográfica y la dieta para la interpretación de los resultados en todos los estudios (Feng *et al.*, 2014). Por otro lado, *Roseburia* spp., *Lachnospira* spp. y *Coprococcus* spp. de la familia Lachnospiraceae, fueron significativamente más abundantes en OB y OSM. Se ha informado que esta familia está asociada con la obesidad relacionada con el exceso de kilocalorías por la dieta en hombres británicos (Salonen *et al.*, 2014). Se sabe que los miembros del intestino de la familia Lachnospiraceae, así como la Ruminococcaceae, degradan los polisacáridos complejos a ácidos grasos de cadena corta como el butirato, propionato y acetato (Biddle *et al.*, 2013). Encontramos que la familia

Erysipelotrichaceae disminuyó significativamente en OB y OSM; hay informes que involucran a esta familia con trastornos metabólicos como la obesidad (Kaakoush NO, 2015), sin embargo, Erysipelotrichaceae disminuye en el intestino de los individuos con obesidad después del bypass gástrico (Zhang *et al.*, 2009).

El análisis de la riqueza bacteriana y la diversidad alfa entre los grupos mostró que las mujeres en las categorías OB y OSM tenían comunidades más ricas y diversas que el CO (Fig. 3). De la misma manera, cuando se midió la diversidad beta, las comunidades bacterianas de los individuos OSM y OB se agruparon juntas separadas del CO (Fig. 4).

Nuestros resultados son contradictorios con los informes en los que se incrementó la diversidad bacteriana intestinal en sujetos obesos varones afectados por síndrome metabólico después de la transferencia alogénica de microbiota intestinal que aumenta la sensibilidad a la insulina (Vrieze *et al.*, 2012).

Sin embargo, también existen informes que muestran que la diversidad bacteriana es mayor en individuos que sufren de obesidad que en individuos con IMC normal (Davis *et al.*, 2017). Así mismo también, hay otros informes que muestran que no hay diferencia en la diversidad bacteriana entre los sujetos no obesos y con síndrome metabólico (Lippert *et al.*, 2017).

Nuestros resultados sobre la diversidad bacteriana sugieren que es importante analizar el tipo y la función de las bacterias que componen la microbiota en el estudio para cada grupo y con características particulares para cada grupo y población de estudio para poder comprender las diferencias entre las diversidades.

Para esto, analizamos los datos de secuenciación de ADN de alto rendimiento de la microbiota intestinal obtenida utilizando el algoritmo LEfSe, que

muestra el enriquecimiento significativo de bacterias relevantes en función de las abundancias relativas en los grupos de CO, OB y OSM (Fig. 5). Los resultados demostraron que las bacterias de once familias diferentes explican potencialmente las diferencias metabólicas observadas entre los grupos.

De esta manera, identificamos bacterias particularmente relacionadas con cada categoría fenotípica en el estudio. El análisis del metagenoma funcional predicho utilizando PICRUSt y STAMP, mostró que estas bacterias también tienen genes más abundantes de vías metabólicas que están implicadas con las condiciones de OB y OSM (Fig. 6).

Esas vías metabólicas involucran enzimas para el metabolismo de los lípidos, cuerpos cetónicos y biosíntesis de CoA. Por otro lado, las mujeres con CO transportan bacterias con vías metabólicas relacionadas con los aminoácidos, los azúcares amino y el metabolismo energético, así como la glucólisis/gluconeogénesis y adipocitoquinas.

Una posibilidad es que en cada categoría, el huésped a través de la dieta esté favoreciendo la proliferación de la microbiota con vías metabólicas seleccionadas que interactúan de forma sintrófica con otras bacterias que realmente influyen en el metabolismo del huésped para definir los perfiles antropométricos y bioquímicos encontrados en nuestras mujeres con OB y OSM (Tabla 4).

Entre los filos bacterianos, encontramos en la microbiota intestinal de las mujeres estudiadas para el grupo OSM, la microbiota intestinal se enriqueció significativamente en los miembros del Filo Firmicutes. Estas bacterias son productoras de ácidos grasos de cadena corta como el butirato (*Faecalibacterium* spp., *Coprococcus* spp., Familia Lachnospiraceae y *Ruminococcus* spp.), y acetato

(*Coprococcus* spp.). Bacterias reportadas en casos de obesidad (*Faecalibacterium* spp., Familia Lachnospiraceae, *Megamonas* spp.); casos de síndrome metabólico (familia Lachnospiraceae), y cuya abundancia disminuye después de la cirugía de “bypass” gástrico en otras poblaciones (*Coprococcus* spp.) (Tabla 5).

En el grupo de OB, la microbiota intestinal se enriqueció significativamente en bacterias pertenecientes al Filo Proteobacterias, con ejemplos en casos de sobrepeso (*Succinivibrio* spp.), en el Filo de Bacteroidetes se enriquecieron las bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta y de lipopolisacáridos (Familia S24-7). En el Filo de Firmicutes, se incrementaron las bacterias como por ejemplo *Roseburia* spp., las cuales se han visto incrementadas en enfermedades que incluyen obesidad y diabetes tipo 2 en otras poblaciones (Tabla 5).

Mientras que las mujeres en el grupo CO tenían una microbiota intestinal enriquecida significativamente en el Filo Bacteroidetes, con miembros, que se correlacionan negativamente con la ingesta de energía y la adiposidad (*Bacteroides* spp.).

Otras bacterias disminuyeron significativamente en la obesidad (familia Bacteroidaceae), esta familia de bacterias, atenuaron la colitis en un modelo murino, la especie relacionada a este fenómeno fue *Parabacteroides distasonis*. El Filo Firmicutes también se enriqueció en el grupo CO, con miembros asociados a la reducción del peso corporal (*Streptococcus thermophilus*) y propiedades inmunomoduladoras (*Streptococcus* spp.). Otras bacterias enriquecidas se asociaron a trastornos metabólicos en humanos (familia Erysipelotrichaceae), mayor abundancia en el síndrome metabólico en otras poblaciones (*Staphylococcus* spp.), se determinó una asociación negativa con indicadores clínicos de trastornos

metabólicos (*Turicibacter* spp.), con agentes antimicrobianos como bacteriocinas (*Lactococcus lactis*), y se correlacionó con un tránsito colónico más rápido en mujeres sanas (*Lactococcus* spp.) (Tabla 5).

### **Resultados del artículo titulado:**

*Alejandra Chávez-Carbajal, Carlos Hoyo-Vadillo, Guillermo Federico Ortiz-Luna, Rosa María Morales-Hernández, Amapola De Sales-Millán, María Hernández-Trejo, Angelina García-Vite, Luis Beltrán-Lagunes, María Luisa Pizano-Zárate, Jaime García-Mena. **Characterization of the gut microbiota of individuals at different DT2 stages reveals a complex relationship with the host.** PLOS ONE --en prensa.*

### **La ligera actividad física, la alta ingesta de nutrientes y el perfil antropométrico contrastan los grupos de DT2 con respecto a los controles y la prediabetes.**

Para este estudio, reclutamos a 217 participantes de una edad promedio de 50 años, de los cuales 143 eran mujeres. La medición de la glucemia en ayunas y la hemoglobina glucosilada permitieron clasificar a los participantes en los grupos Control (CO), DT2, prediabetes (PRE) y personas que no sabían que tenían DT2 por lo que al momento del diagnóstico se les nombró debutantes de DT2 y por supuesto no tenían tratamiento farmacológico previo (DT2 No M). En el caso de los individuos con DT2 se dividieron en tres grupos, de acuerdo al tratamiento farmacológico que recibieron, como Metformina DT2 (DT2 M), polifarmacia DT2 (DT2 P) y polifarmacia DT2 + insulina (DT2 P + I) (Tabla 11). El perfil antropométrico

mostró que todos los grupos con la categoría DT2 sufren de obesidad, mientras que los miembros de los grupos CO y PRE sufren de sobrepeso. El perfil bioquímico mostró que la hemoglobina glucosilada (HA1c) y la glucosa en ayunas estaban por encima de los niveles normales que definen el perfil metabólico de los grupos. El nivel de colesterol en la sangre fue más alto en el rango normal en los grupos PRE, DT2 no M y DT2 M. Los niveles de triglicéridos se elevaron por encima del rango normal en todos los grupos excepto en los individuos con polifarmacia DT2 (DT2 P). En general, la lipoproteína de baja densidad se elevó por encima del nivel normal en todos los grupos, observándose el nivel más alto en el grupo de debutantes (DT2 No M) seguido de la prediabetes (PRE). El perfil dietético aplicado a todos los grupos mostró que la ingesta diaria de kilocalorías y macronutrientes se incrementó en individuos DT2 P y DT2 P + I seguidos por los individuos PRE. La ingesta diaria de azúcar para todos los grupos estaba dentro del rango normal, sin embargo, los grupos DT2 P, PRE y CO informaron que tenían una ingesta más alta que los demás (Tabla 10). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto a la actividad física ( $p = 0.526$ ), pero los valores indicaron un estilo de vida de actividad física sedentaria y ligera para todos ellos. Los análisis comparativos de pares de grupos confirmaron las diferencias observadas en la Tabla 11 para todos los perfiles (Tabla 11).

**Los cambios en Firmicutes y Bacteroidetes describen la mayor transición en la microbiota intestinal desde la condición saludable hasta la anterior y la diabetes.**

El análisis de los resultados de la caracterización de la diversidad bacteriana por secuenciación masiva de las bibliotecas de la región V3 del gen 16S rRNA realizadas como se describe en Materiales y Métodos, mostró una tendencia al aumento de Bacteroidetes y una disminución en las abundancias relativas de Firmicutes al inicio de la diabetes tipo 2 que se caracteriza por individuos con prediabetes y DT2 no medicado en este trabajo (Fig. 7); aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 14). Por otro lado, también observamos que los grupos DT2 P y DT2 P + I tenían abundancias Firmicutes y Bacteroidetes similares con respecto al grupo CO. Se observaron diferencias significativas en el nivel de Fila (Firmicutes y Bacteroidetes) en el grupo DT2 M con respecto al CO y los grupos DT2 P (Tabla 14). Además, el aumento en la abundancia de Firmicutes fue estadísticamente significativo cuando se comparó el grupo DT2 M con el grupo DT2 P + I (Tabla 14) (Figura 7).

**La riqueza bacteriana intestinal y la diversidad de individuos afectados por DT2 no M son más bajos que los otros grupos.**

Realizamos un perfil de las comunidades bacterianas intestinales en las personas estudiadas que miden el índice Chao1 como indicador de la riqueza, y los índices Shannon y Simpson como indicadores de la diversidad (Figura 8). Además, realizamos un análisis de comparación entre los grupos de los índices de alfa-diversidad para detectar diferencias significativas (Tabla 15). Los índices mostraron que en términos de riqueza y diversidad, las comunidades bacterianas intestinales de personas afectadas por diabetes tipo 2 sin medicación (DT2 no M) son más bajas que las que se encuentran en el control (CO), pre-diabetes (PRE), y personas ya

afectadas por diabetes con medicamentos (DT2 M, DT2 P y DT2 P + I). La diferencia más alta para el índice Chao1 se encontró entre DT2 no M y CO, y DT2 no M y PRE; para el índice de Shannon la diferencia fue entre CO, DT2 P + I y PRE en comparación con DT2 M. No hubo una diferencia detectable en la diversidad bacteriana cuando analizamos los datos para el índice de Simpson (Tabla 15).

**Existe una diferencia significativa en la diversidad beta de la microbiota intestinal en los grupos PRE, DT2 No M, DT2 M, DT2 P y DT2 P + I.**

La diversidad beta es la diversidad de especies de un número de muestras o de comunidades para algún grupo de ambientes, de modo que esto resulta en ser un parámetro excelente para contrastar las diferencias entre comunidades bacterianas entre individuos de diferentes condiciones de salud. Con base en los datos de la tabla de OTU's, realizamos una gráfica de dispersión tridimensional, generada utilizando las coordenadas principales (PCoA), calculadas mediante el análisis unifrac no ponderado y las distancias estimadas entre las muestras de todos los grupos. Los resultados de este análisis no muestran similitudes entre sujetos para individuos que pertenecen a la misma categoría (Fig. 9). A continuación, realizamos un análisis de datos por medio de la herramienta de QIIME denominada ANOSIM para ver las diferencias estadísticas en la beta-diversidad de un par de grupos (Tabla 16). Este análisis mostró diferencias significativas en la diversidad beta de los pares de grupos incluidos; CO, PRE, DT2 No M, DT2 M, DT2 P y DT2 P + I (Tabla 16).



## **Las bacterias intestinales a nivel familiar y géneros explican las diferencias para todos los grupos.**

Utilizando la información de las abundancias relativas para todas las bacterias obtenidas en la asignación de géneros a nivel de OTU, se realizó el análisis LEfSe para determinar el enriquecimiento significativo de bacterias intestinales como se describe en Material y Métodos. Se analizaron las 6 categorías fenotípicas que agruparon DT2 P y DT2 P + I en un solo grupo, obteniendo resultados significativos basados en valores  $p$ - y  $q$ - para todos ellos. En base a estos análisis para el grupo CO, encontramos bacterias del Filo Proteobacteria, orden Burkholderiales, familia Alcaligenaceae que se enriquecieron al menos 2.9 veces ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.0002$ ). Para la condición PRE el análisis detectó la familia Comamonadaceae, orden Burkholderiales, Filo Proteobacteria, enriquecida al menos 2.07 veces ( $p = 0.0004$ ,  $q = 0.0072$ ), y para la DT2 no M, bacterias del género *Sutterella* spp., que pertenecen a la familia Alcaligenaceae, orden Burkholderiales se enriqueció al menos 2.85 ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.0004$ ) (Figura 10, Tabla 17).

Para pacientes con DM2 y tratamiento farmacológico, encontramos un aumento en las bacterias de tres Fila diferentes. Para DT2 M, el género *Pelomonas* spp., de la familia Comamonadaceae, orden Burkholderiales, Filo Proteobacteria se incrementó 2.61 veces ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ). El orden Bacteroidales, Filo Bacteroidetes se incrementó 4.43 veces ( $p = 0.0001$ ,  $q = 0.0013$ ); y para el Filo Acidobacteria, la familia Koribacteraceae se incrementó 2.78 veces ( $p = 0.0013$ ,  $q = 0.0243$ ), y el orden Acidobacteriales aumentó 2.74 veces ( $p = 0.0013$ ,  $q = 0.0243$ ). Finalmente, para el grupo combinado DT2 P y DT2 P + I, encontramos que

*Oscillospira* spp., se incrementó 3.03 veces ( $p = 0.0001$ ,  $q = 0.0018$ ) y *Roseburia* spp., se incrementó en 2.94 veces ( $p = 0.0001$ ,  $q = 0.0022$ ) (Figura 10, Tabla 17).

### **Taxones microbianos seleccionados significativamente vinculados a parámetros clínicos, perfil antropométrico, ingesta dietética y actividad física.**

Para identificar asociación con variables de tipo clínico, bioquímico, dietético y antropométrico se utilizó el algoritmo de MasLin para asociación multivariada y encontramos asociación positiva de la edad con Enterococcaceae y género con *Prevotella*. Se encontraron asociaciones negativas en la ingesta de lípidos con *Kaistobacter* y presión arterial sistólica con *Erwinia* en todos los sujetos estudiados ( $n = 217$ ) (Figura 11). Después de esta parte preliminar quisimos explorar las asociaciones estadísticas en una muestra de sujetos con variables de composición corporal y actividad física ( $n = 99$ ) (Figura 11) y encontramos asociaciones negativas en *Dorea* con la actividad física, familia Enterococcaceae con grasa corporal (%) y grasa (Kg), y *Fusobacterium* con peso (Kg) (Tabla 18).

### **El metagenoma funcional previsto de la microbiota intestinal muestra diferencias en los grupos PRE y DT2 M.**

Realizamos un análisis de predicción comparativo del metagenoma funcional (PICRUSt) de la microbiota bacteriana intestinal en los grupos PRE y DT2 M (Figura 12), observamos rutas metabólicas implicadas en el metabolismo energético, metabolismo de carbohidratos (metabolismo del azúcar y azúcares nucleótidos y Propanoato) metabolismo). También vías como el metabolismo de aminoácidos (metabolismo de glicina, serina y treonina), metabolismo lipídico (esfingolípido)

biosíntesis de glicanos (biosíntesis de lipopolisacáridos) y biodegradación y metabolismo de xenobióticos (atrazina, benzoato, dioxinas, xileno y degradación de estireno), en este las últimas cuatro vías se encontraron más altas en el grupo PRE que DT2 M (Tabla 19).

## **Discusión**

Nosotros realizamos un estudio de tipo observacional para detectar diferencias en la microbiota intestinal y, en particular, en las bacterias con un potente papel en la contribución de la DT2 entre grupos de pacientes que tuvieron diferentes tipos de tratamientos farmacológicos para tratar la DT2 y con años de evolución menor a dos y mayores a quince, además de otros dos grupos sin tratamiento farmacológico a los cuales les denominamos debutantes y a otro grupo denominado prediabetes, ya que habían sido diagnosticados en el momento del estudio.

Mediante secuenciación masiva semiconductor de iones de alto rendimiento en muestras fecales humanas, demostramos que la abundancia relativa a nivel de Filo, en particular Firmicutes en el grupo T2D M se redujo casi en un 30% en comparación con el grupo CO, ese hallazgo es opuesto a un trabajo anterior donde después de 2 meses de tratamiento con Metformina, la abundancia relativa aumentó en 86 cepas bacterianas, donde la mayoría de ellas pertenecían al filo de Firmicutes [Wu *et al.*, 2017].

También encontramos que la diversidad Alfa y Beta mostró diferencias estadísticas entre dos pares de grupos notables, porque no tienen tratamiento farmacológico, estos hallazgos muestran claramente el efecto de la enfermedad sin variables que podrían causar confusión en la enfermedad *per se* cómo es el

tratamiento farmacológico, fueron CO con respecto a T2D No M y PRE con T2D No M (Tabla 16 y Tabla 17).

Para detectar quiénes eran las bacterias intestinales entre los grupos, clasificamos el grupo T2D P y T2D P + I en un grupo porque ellos tuvieron la misma edad de evolución de la enfermedad y, además, el mismo tratamiento farmacológico, solo se incluyó la insulina como diferente tratamiento farmacológico.

En ese grupo encontramos solo dos bacterias; *Oscillospira* spp., en el que se observó un aumento del respecto de los demás, esto es consistente con los hallazgos informados en una muestra de niños mexicanos con obesidad en comparación con el sobrepeso [Muruguesan *et al.*, 2015], mientras que *Roseburia* spp., la encontramos en aumento en comparación con los otros grupos, sin embargo, se mostraron datos contradictorios en sujetos europeos y chinos que padecen T2D [Karlsson *et al.*, 2013], esto podría indicar que las bacterias encontradas en nuestra muestra son características de nuestra población de estudio.

El grupo T2D M tuvo los mayores cambios bacterianos entre los demás, y es notable que el orden de Bacteroidales fue el más abundante en comparación con los otros, y también se encontró un aumento en la microbiota intestinal de ratas con T2D genética y enfermedad de hígado graso no alcohólico [Shin *et al.*, 2017]. Por otro lado, el orden Acidobacteriales y la clase Acidobacteriia se ha informado que crecen en una variedad de ambientes con azúcares [Huber *et al.*, 2017], y es consistente con el hecho de que el grupo T2D M tuvo la mayor ingesta de Azúcares en bebidas por día entre los otros cinco grupos.

Además, *Pellomonas* spp., tuvo un predominio en un aumento de casi el 25% en la enfermedad de Crohn activa con respecto a la enfermedad de Crohn no activa [Schäffler *et al.*, 2016] lo cual podría ser una posible explicación sobre el papel de la inmunidad en estas muestras de heces, ya que nuestro grupo tuvo solo dos años de evolución con T2D y, al mismo tiempo, con el uso de Metformina.

Probablemente el grupo con menos variables intervinientes respecto al tratamiento farmacológico en este trabajo fue T2D No M o pacientes debutantes de DT2. Nuestros resultados mostraron que solo *Sutterella* spp., se incrementó respecto a los otros grupos, se informó el mismo hallazgo, pero en pacientes con prediabetes de Dinamarca en comparación con sujetos sanos [Allin *et al.*, 2017].

Solo la familia Comamonadaceae se encontró más aumentada en el grupo PRE que en los otros grupos, y en otro informe de la misma familia fue 3 veces incrementada en obesos en comparación con cerdos magros [Newell-Fugate *et al.*, 2017] en nuestro caso, el grupo PRE solo tenía sobrepeso, pero estos hallazgos podrían ser interesantes para profundizar más allá en éste grupo de pacientes porque no encontramos otros informes en microbiota intestinal de humanos y la relación con trastornos metabólicos, y especialmente en prediabetes y microbiota intestinal.

Además, el grupo CO mostró algunas bacterias intestinales de acuerdo con las características caracterizadas como un estado metabólico saludable, como el caso de la familia Alcaligenaceae (orden Burkholderiales) se ha informado en otros estudios que se encuentran en el intestino de sujetos humanos sanos [Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2007].

Es notable que, aunque este análisis LEfSe no detectó una diferencia en la abundancia de *Prevotella* spp., es una de las 20 bacterias más abundantes en nuestro estudio, la abundancia de esta bacteria tiene una tendencia a aumentar de CO <PRE <T2D, no M <T2D M, y disminuye cuando hay polifarmacia y polifarmacia + insulina (T2D P, T2D P + I) (Fig. 10).

En este trabajo, además, detectamos asociaciones con algunos marcadores clínicos, uno de ellos fue la asociación negativa con la presión arterial sistólica y *Erwinia* spp., en toda nuestra muestra, sin embargo, en los niños obesos mexicanos solo se detectó por una disminución en la abundancia relativa en comparación con el grupo de control [Muruguesan *et al.*, 2015].

*Kaistobacter* spp., se encontró en asociación negativa con la ingesta de lípidos; sin embargo, en otros informes, las mismas bacterias mostraron un aumento en ratas con niveles más altos de apolipoproteína E y tienen un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas, especialmente en la regulación del metabolismo del colesterol total [Bo *et al.*, 2016].

Por otro lado, un informe en mujeres posmenopáusicas con obesidad de Dinamarca mostró que *Dorea longicatena* se correlacionó negativamente con marcadores de resistencia a la insulina, sin embargo, en nuestro estudio encontramos la misma asociación, pero con actividad física, aunque por *Dorea* spp. [Brahe *et al.*, 2015].

La familia Enterococcaceae se encontró 24 veces más abundante en el microbioma intestinal de ratones ejercitados en comparación con ratones sedentarios [Choi *et al.*, 2013] sin embargo, en nuestro estudio encontramos una

asociación negativa con la grasa corporal (Kg) y la grasa corporal (%), y un hallazgo más interesante fue una asociación positiva con la edad (Fig. 11).

Finalmente, queríamos saber si algunas vías metabólicas de las bacterias intestinales tenían relevancia en todas las enfermedades metabólicas, teníamos una visión general y particular de cada condición, para eso realizamos un análisis PICRUST y demostramos que solo las condiciones PRE y T2D M tenían un patrón estadísticamente significativo entre las vías metabólicas relevantes. El cambio más representativo se produjo en el metabolismo de Energía, Carbohidratos, Aminoácidos y Lípidos en el que la T2D M fue más alta con respecto al grupo PRE, y esto es consistente porque es probable que esta bacteria use ese metabolismo porque tienen más sustrato en la luz intestinal, es importante destacar esto porque la Metformina mejora la detección de glucosa intestinal y aumenta la producción de ácidos grasos de cadena corta y péptidos intestinales [Rodríguez *et al.*, 2018] incluso cuando todas las ingestas de nutrientes de estos dos grupos fueron casi similares, parece que la Metformina tuvo un cambio significativo.

Actualmente hay evidencia que sugiere que la microbiota intestinal podría ser un marcador que podría estar involucrado en los efectos antidiabéticos de los tratamientos farmacológicos, el fármaco más estudiado es la Metformina, otro punto para profundizar es el efecto directo de los otros fármacos en la microbiota de colon a través de la clínica.

Se requieren más estudios que prueban qué fármacos son más efectivos y cómo la microbiota de colon puede ayudar a estos efectos antidiabéticos. Otro contribuyente a los trastornos metabólicos con un vínculo potente que proviene de la microbiota intestinal es el lipopolisacárido o "endotoxina", es un glicolípido que se

encuentra en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y tiene implicaciones en la inflamación metabólica de bajo grado [Boutagy *et al.*, 2016].

En una cohorte del estudio FINRISK 97 [Pussinen *et al.*, 2011] se informó que en pacientes que padecían diabetes tenían una mayor actividad de endotoxinas en referencia a sujetos no diabéticos, pero más interesante era el hecho de que la actividad de endotoxinas estaba asociada con un mayor riesgo de diabetes incidente independientemente por otros factores de riesgo, esto es consistente con nuestros resultados. Sin embargo, se mostraron resultados contradictorios con un análisis de la función microbiana intestinal de otro grupo [Forslund *et al.*, 2015] para determinar el impacto de la Metformina sobre la microbiota intestinal, mostraron una reducción en la absorción de los lípidos intestinales y lipopolisacáridos reducidos. Eso provocó una inflamación local, por eso es importante informar todos los estudios metagenómicos para determinar cuidadosamente cuál es el impacto metabólico en cada población en condiciones y circunstancias específicas.

Otro factor importante que nos interesó seguir en nuestro estudio fue la medida de los genes en la microbiota intestinal relacionada con la biodegradación por xenobióticos (Fig. 12), debido a que todos los medicamentos ingeridos y que llegan al tracto gastrointestinal están expuestos a la microbiota intestinal, incluso antes de ser absorbidos, y al estar en el torrente sanguíneo, pueden ser alterados y modificar la efectividad e incluso ser tóxicos [Jourova *et al.*, 2016], [Carmody *et al.*, 2014] desafortunadamente, no encontramos significancia estadística con T2D No M y TD2 M probablemente porque nuestro grupo debutante fue pequeño, sin embargo se realizarán análisis adicionales con nuestro primer informe.



Por otro lado, encontramos una disminución de todas las vías metabólicas relacionadas con la degradación de 5 xenobióticos en el grupo TD2 M vs. PRE, la importancia clínica de estas vías de degradación de xenobióticos se debe a la biodisponibilidad de los fármacos, pero también en la biorremediación, ya que muchas de estas vías juegan un papel importante.

El papel en la desintoxicación de contaminantes como la atrazina se muestra aquí. Los estudios experimentales, que caracterizan las capacidades de degradación de los xenobióticos en diferentes bacterias, son actualmente limitados. Llevamos a cabo una búsqueda para identificar el metabolismo de los xenobióticos por la microbiota intestinal en pacientes con medicación para T2D; desafortunadamente, no encontramos estudios con participación directa en la degradación de algunos xenobióticos, en particular con el uso de Metformina. Se requieren estudios adicionales sobre metagenómica para identificar si, de hecho, la Metformina tiene un efecto de baja capacidad de degradación y, finalmente, y más allá del alcance de estos estudios de metagenómica.

## **Discusión general y conclusión**

En humanos, la importancia del papel que desempeña la microbiota intestinal en la ingesta de energía y la recolección de ésta por la dieta, se ha informado anteriormente a través de una serie de estudios en modelos animales y humanos.

Actualmente se acepta que hay una microbiota intestinal asociada a la obesidad que extrae mayor energía de la fibra dietética soluble a través de la fermentación, que produce más ácidos grasos de cadena corta que los que se

producen en individuos delgados e influye de esta manera en el metabolismo energético del huésped (Heiss *et al.*, 2018).

Además, la microbiota intestinal y sus metabolitos están notablemente involucrados en el control del apetito del huésped mediante la modulación de las vías de saciedad del huésped (Fetissov, 2017).

En algunos casos, nuestros resultados contrastan con lo que se informa en la literatura disponible; sin embargo, planteamos la hipótesis de que en las mujeres OB y OSM la microbiota intestinal ha aumentado la actividad sacarolítica, produciendo más ácidos grasos de cadena corta, aumentando los niveles de acetil-CoA en el huésped y causando dislipidemia debido a la elevación del colesterol y los triglicéridos, como se observa en las características clínicas y como también se ha informado en otros grupos con obesidad en mexicanos (Maya-Lucas *et al.*, 2019) e italianos (Del Chierico *et al.*, 2018).

Por otro lado, en relación a las enfermedades metabólicas de relevancia mundial y nacional como lo es la prediabetes y la diabetes tipo 2, nosotros logramos demostrar diferencias significativas en la diversidad de la microbiota intestinal entre los grupos estudiados, desde una condición saludable que progresa a prediabetes hasta una condición de diabetes tipo 2, utilizando abundancias relativas y también diversidades alfa y beta.

También encontramos asociaciones significativas de bacterias específicas con características clínicas; además, mostramos las vías metabólicas predichas de la microbiota intestinal en relación con las condiciones PRE y DT2 M.

Finamente nosotros concluimos con este trabajo, que nuestros resultados indican que cada grupo tiene características metabólicas, diversidades de

microbiota intestinal y vías metabólicas en la microbiota intestinal específica de cada condición. Por lo tanto, se cumplió nuestra hipótesis de investigación, logramos determinar que existieron diferencias entre la microbiota intestinal de las personas que padecen enfermedades metabólicas respecto a la microbiota del grupo control.

## **9. Avances y trabajo futuro**

Los avances en los resultados de este estudio podrían utilizarse para definir estrategias que puedan modular la microbiota intestinal a través de tratamientos no invasivos, como intervenciones dietéticas, los probióticos o los prebióticos, e incluso trasplante fecal, para mejorar la tolerancia a la glucosa de las personas con prediabetes o afectadas por la DT2 y mejorar la calidad de vida de quienes las padecen.

Adicionalmente, nosotros creemos que como trabajo futuro, se requieren más estudios para determinar el efecto de los fármacos en la microbiota, particularmente el efecto de la Metformina en las vías metabólicas de las bacterias del colon.

## 10. Anexos

### Anexo 1. Consentimiento Informado

**Título de la Investigación:** Estudio de la diversidad microbiana y del microbioma del colon distal en Mexicanos afectados de diabetes tipo 2 y obesidad.

**Nombre del Investigador Principal:** Dr. Jaime García Mena.

**Estimado paciente:** El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN está realizando un proyecto de investigación, donde el objetivo del estudio es determinar el componente genómico del microbioma del colon distal, para lo cual se requiere su cooperación voluntaria para el análisis de muestras biológicas.

A través de este documento queremos hacerle una invitación a participar voluntariamente en un estudio de investigación.

Antes de que usted acepte participar en este estudio, se le presenta el documento de nombre "**Consentimiento Informado**", que tiene como objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda tomar una decisión informada.

El consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio al que se le está invitando a participar, por ello es de suma importancia que lo lea cuidadosamente antes de tomar alguna decisión y si usted lo desea, puede comentarlo con quien desee (un amigo, un familiar de confianza, etc.) Si usted tiene preguntas puede hacerlas directamente a su médico tratante o al personal del estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier inquietud.

Una vez que tenga conocimiento sobre el estudio y los procedimientos que se llevarán a cabo, se le pedirá que firme esta forma para poder participar en el estudio.

**Procedimiento:** Si usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente; se le harán unas preguntas acerca de su historial médico, tipo de alimentación y actividad física que realiza, el interrogatorio tendrá una duración de aproximadamente 1 hora, posteriormente se le solicitará una muestra de sangre de 4 ml (lo equivalente en mililitros es a menos de lo que cabe en una cucharadita cafetera) y será en una sola ocasión y una muestra de heces fecales del tamaño de una nuez en un frasco estéril, la cual será entregada el siguiente día. Le aclaramos que tanto la toma de muestras de sangre como la indicación de cómo tomar la muestra de heces usted mismo le serán facilitadas por personal calificado.

**Beneficios:** Usted no recibirá un beneficio directo, sin embargo si usted aceptara participar, el beneficio indirecto será colaborar con la ciencia para determinar si el componente genómico del microbioma de la población mexicana en pacientes sanos y con alguna enfermedad metabólica es diferente y que si lo fuera que tanta diversidad existe entre cada una de las enfermedades metabólicas planteadas aquí, como lo son la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

**Riesgos:** El presente estudio no representa riesgos a los participantes.

**Confidencialidad:** la información que usted proporcione para el estudio será estrictamente confidencial, de manera que se utilizará únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito, entonces usted quedará identificado con un número y no con su nombre.

Por último los resultados obtenidos serán publicados con fines científicos pero se presentarán de modo que usted no pueda ser identificado. Esto se apega a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. Capítulo I De los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7, 8 y 9: y el aviso de privacidad institucional.



## ANEXO 2. Indicaciones para la obtención de muestra de heces

El objetivo principal es obtener la viabilidad de las bacterias que se encuentran en la muestra y de proporcionar un buen manejo de la misma.

### Procedimiento:

1. Un día antes rotular el frasco con los siguientes datos:

**Nombre del participante:** \_\_\_\_\_

**Edad:** \_\_\_\_\_

**Fecha de obtención de la muestra:** \_\_\_\_\_

**Número de teléfono para contacto:** \_\_\_\_\_

2. Colocar el papel "contact" (transparente) de costado a costado del retrete de manera que quede un poco en forma de columpio.

3. Una vez que tiene las heces sobre el plástico, cuidadosamente, tomar con un abate lenguas solo una parte y deberá ser aproximadamente del tamaño de una nuez de las heces contenidas en el plástico.

4. Tapar bien el frasco.

5. Ingresar el frasco con la muestra en una bolsa plástica.

6. Refrigerar a 4°C (Temperatura convencional de refrigeradores de casa)

7. Entregar la muestra al lugar indicado el mismo día de la obtención, recuerde que la vida útil de la muestra fuera de la temperatura de refrigeración es de 2 horas.

### ANEXO 3. Historia Clínica Casos

FECHA \_\_\_\_\_

FOLIO \_\_\_\_\_

#### Ficha de identificación

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Género: Fem Masc Número de afiliación a su institución \_\_\_\_\_

Estado civil: Casado Soltero Divorciado Viudo Tel casa \_\_\_\_\_ Cel \_\_\_\_\_

Lugar y fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_

Escolaridad:

1. Primaria años, 2. Secundaria, 3. Técnico, 4. Preparatoria, 5. Profesional, 6. Postgrado

Especifique los años de últimos estudios: \_\_\_\_\_

Ingreso Mensual actual: < \$ 2000.00 \$ 2000-5000.00 >\$ 5000.00

#### Antecedentes Personales no patológicos

Tabaquismo Si No Tiempo \_\_\_\_\_ años No. Cigarros/día \_\_\_\_\_

Alcoholismo Si No Tiempo \_\_\_\_\_ años No. de copas/día \_\_\_\_\_

#### Antecedentes Heredofamiliares:

¿Alguien en su familia presentó Evento cardiovascular?

Madre 1. Si 2. No Hermana 1. Si 2. No Padre 1. Si 2. No Hermano 1. Si 2. No

¿Tiene familia con diabetes tipo 2?

Madre 1. Si 2. No Hermana 1. Si 2. No Padre 1. Si 2. No Hermano 1. Si 2. No

¿Alguno de sus familiares padece o padeció enfermedad renal?

Padre 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a diabetes 3. No

Madre 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a diabetes 3. No

Hermanos 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a diabetes 3. No

Abuelo (a) paterno (a) 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a diabetes 3. No

Abuelo (a) materno (a) 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a diabetes 3. No

#### Evolución de la Diabetes

¿A qué edad se diagnosticó con diabetes tipo 2? años

¿A qué edad comenzó con los síntomas? años

¿Qué tratamiento farmacológico toma para el control de la diabetes?:

**Nombre:** mg tomas/día Tiempo de tomarlo en meses

¿Qué tratamiento farmacológico toma para el control de otras enfermedades?:

**Nombre:** mg tomas/día Tiempo de tomarlo en meses

¿Le han diagnosticado hipertrigliceridemia? 1. Si 2.No

¿Toma tratamiento? 1. Si 2.No

Especifique: Bezafibrato Otro:

¿Le han diagnosticado hipercolesterolemia? 1. Si 2.No

¿Toma tratamiento? 1. Si 2.No

Especifique: Pravastatina Otro:

¿Le han diagnosticado hipertensión arterial 1. Si 2.No

¿Toma tratamiento? 1. Si 2.No

Especifique:

¿El paciente presenta alguna complicación de diabetes tipo 2? 1. Si 2.No

¿Cuál?

#### Antecedentes Patológicos

Quirúrgicos: Si No Colectomía Apendicectomía otros \_\_\_\_\_

Hospitalizaciones en el último año: Si No Motivo \_\_\_\_\_

Otros padecimientos importantes: \_\_\_\_\_

Actualmente, ¿está usted en un régimen de alimentación específico para DM?: Si No

#### Exploración Física y Antropometría

TA sistólica \_\_\_\_\_ mm Hg Peso \_\_\_\_\_ Kg Talla \_\_\_\_\_ metros

TA diastólica \_\_\_\_\_ mm Hg Cintura \_\_\_\_\_ cm Cadera \_\_\_\_\_ cm

Abdomen \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_

Observaciones por el entrevistador:



## ANEXO 4. Historia Clínica Control

FECHA \_\_\_\_\_

FOLIO \_\_\_\_\_

### Ficha de identificación

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Género: Fem Masc Número de afiliación de su institución \_\_\_\_\_

Estado civil: Casado Soltero Divorciado Viudo Tel casa \_\_\_\_\_ Cel \_\_\_\_\_

Lugar y fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_

Escolaridad:

1. Primaria años, 2. Secundaria, 3. Técnico, 4. Preparatoria, 5. Profesional, 6. Postgrado

Especifique los años de últimos estudios: \_\_\_\_\_

Ingreso Mensual actual: < \$ 2000.00 \$ 2000-5000.00 >\$ 5000.00

### Antecedentes Personales no patológicos

Tabaquismo Si No Tiempo \_\_\_\_\_ años No. Cigarros/día \_\_\_\_\_

Alcoholismo Si No Tiempo \_\_\_\_\_ años No. de copas/día \_\_\_\_\_

### Antecedentes Heredofamiliares:

¿Alguien en su familia presentó Evento cardiovascular?

Madre 1. Si 2. No Hermana 1. Si 2. No Padre 1. Si 2. No Hermano 1. Si 2. No

¿Tiene familia con diabetes tipo 2?

Madre 1. Si 2. No Hermana 1. Si 2. No Padre 1. Si 2. No Hermano 1. Si 2. No

¿Alguno de sus familiares padece o padeció enfermedad renal?

Padre 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a

diabetes 3. No

Madre 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a

diabetes 3. No

Hermanos 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a

diabetes 3. No

Abuelo (a) paterno (a) 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a

diabetes 3. No

Abuelo (a) materno (a) 1. Sí, no especificada 2. Si, debida a

diabetes 3. No

¿Le han diagnosticado hipertrigliceridemia? 1. Si 2.No

¿Toma tratamiento? 1. Si 2.No

Especifique: Bezafibrato Otro:

¿Le han diagnosticado hipercolesterolemia? 1. Si 2.No

¿Toma tratamiento? 1. Si 2.No

Especifique: Pravastatina Otro:

¿Le han diagnosticado hipertensión arterial 1. Si 2.No

¿Toma tratamiento? 1. Si 2.No

Especifique:

### Antecedentes Patológicos

Quirúrgicos: Si No Colectomía Apendicectomía otros \_\_\_\_\_

Hospitalizaciones en el último año: Si No Motivo \_\_\_\_\_

Otros padecimientos importantes: \_\_\_\_\_

Actualmente, ¿está usted en un régimen de alimentación específico para DM?: Si No

Actualmente, ¿está usted tomando algún medicamento o suplemento actualmente?: Si No

### Exploración Física y Antropometría

TA sistólica \_\_\_\_\_ mm Hg Peso \_\_\_\_\_ Kg Talla \_\_\_\_\_ metros

TA diastólica \_\_\_\_\_ mm Hg Cintura \_\_\_\_\_ cm Cadera \_\_\_\_\_ cm

Abdomen \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_

Observaciones por el entrevistador:






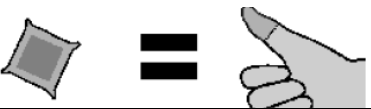
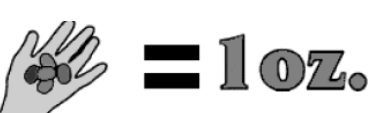
## ANEXO 5. Cuestionario Mundial de Actividad Física

<b>Actividad física</b>			
<p>A continuación voy a preguntarle por el tiempo que pasa realizando diferentes tipos de actividad física. Le ruego que intente contestar a las preguntas aunque no se considere una persona activa.</p> <p>Piense primero en el tiempo que pasa en el trabajo, que se trate de un empleo remunerado o no, de estudiar, de mantener su casa, de cosechar, de pescar, de cazar o de buscar trabajo <i>[inserte otros ejemplos si es necesario]</i>. En estas preguntas, las "actividades físicas intensas" se refieren a aquéllas que implican un esfuerzo físico importante y que causan una gran aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco. Por otra parte, las "actividades físicas de intensidad moderada" son aquéllas que implican un esfuerzo físico moderado y causan una ligera aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco.</p>			
Pregunta	Respuesta	Código	
En el trabajo			
49 ¿Exige su trabajo una actividad física intensa que implica una aceleración importante de la respiración o del ritmo cardíaco, como <i>[levantar pesos, cavar o trabajos de construcción]</i> durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>(INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1  No 2 <i>Si No, Saltar a P 4</i>	P1	
50 En una semana típica, ¿cuántos días realiza usted actividades físicas intensas en su trabajo?	Número de días <input style="width: 30px;" type="text"/>	P2	
51 En uno de esos días en los que realiza actividades físicas intensas, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input style="width: 30px;" type="text"/> : <input style="width: 30px;" type="text"/> hrs mins	P3 (a-b)	
52 ¿Exige su trabajo una actividad de intensidad moderada que implica una ligera aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco, como caminar deprisa <i>[o transportar pesos ligeros]</i> durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>(INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1  No 2 <i>Si No, Saltar a P7</i>	P4	
53 En una semana típica, ¿cuántos días realiza usted actividades de intensidad moderada en su trabajo?	Número de días <input style="width: 30px;" type="text"/>	P5	
54 En uno de esos días en los que realiza actividades físicas de intensidad moderada, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input style="width: 30px;" type="text"/> : <input style="width: 30px;" type="text"/> hrs mins	P6 (a-b)	
Para desplazarse			
<p>En las siguientes preguntas, dejaremos de lado las actividades físicas en el trabajo, de las que ya hemos tratado. Ahora me gustaría saber cómo se desplaza de un sitio a otro. Por ejemplo, cómo va al trabajo, de compras, al mercado, al lugar de culto <i>[insertar otros ejemplos si es necesario]</i></p>			
55 ¿Camina usted o usa usted una bicicleta al menos 10 minutos consecutivos en sus desplazamientos?	Sí 1  No 2 <i>Si No, Saltar a P 10</i>	P7	
56 En una semana típica, ¿cuántos días camina o va en bicicleta al menos 10 minutos consecutivos en sus desplazamientos?	Número de días <input style="width: 30px;" type="text"/>	P8	
57 En un día típico, ¿cuánto tiempo pasa caminando o yendo en bicicleta para desplazarse?	Horas : minutos <input style="width: 30px;" type="text"/> : <input style="width: 30px;" type="text"/> hrs mins	P9 (a-b)	

En el tiempo libre			
Las preguntas que van a continuación excluyen la actividad física en el trabajo y para desplazarse, que ya hemos mencionado. Ahora me gustaría tratar de deportes, fitness u otras actividades físicas que practica en su tiempo libre [inserte otros ejemplos si llega el caso].			
58	¿En su tiempo libre, practica usted deportes/fitness intensos que implican una aceleración importante de la respiración o del ritmo cardíaco como [correr, jugar al fútbol] durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>(INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1  No 2 Si No, Saltar a P 13	P10
59	En una semana típica, ¿cuántos días practica usted deportes/fitness intensos en su tiempo libre?	Número de días <input type="text"/>	P11
60	En uno de esos días en los que practica deportes/fitness intensos, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P12 (a-b)
<b>SECCIÓN PRINCIPAL: Actividad física (en el tiempo libre) sigue.</b>			
Pregunta		Respuesta	Código
61	¿En su tiempo libre practica usted alguna actividad de intensidad moderada que implica una ligera aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco, como caminar deprisa, [ir en bicicleta, nadar, jugar al volleyball] durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>( INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1  No 2 Si No, Saltar a P 16	P13
62	En una semana típica, ¿cuántos días practica usted actividades físicas de intensidad moderada en su tiempo libre?	Número de días <input type="text"/>	P14
63	En uno de esos días en los que practica actividades físicas de intensidad moderada, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P15 (a-b)
<b>SECCIÓN PRINCIPAL: Actividad física (en el tiempo libre) sigue.</b>			
La siguiente pregunta se refiere al tiempo que suele pasar sentado o recostado en el trabajo, en casa, en los desplazamientos o con sus amigos. Se incluye el tiempo pasado [ante una mesa de trabajo, sentado con los amigos, viajando en autobús o en tren, jugando a las cartas o viendo la televisión], pero no se incluye el tiempo pasado durmiendo. <i>[INSERTAR EJEMPLOS] (UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>			
64	¿Cuándo tiempo suele pasar sentado o recostado en un día típico?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P16 (a-b)

## ANEXO. 6 Registro de alimentos, bebidas y sal de mesa

Estimado paciente; el siguiente es un registro de los alimentos que ha consumido en un lapso de 3 días de la semana con el objetivo de conocer numéricamente su consumo de acuerdo a su patrón de alimentación, para lo cual le pedimos especifique **cantidades** (Abajo se presenta una tabla para que cada alimento contenga su cantidad aproximada en referencia a cosas muy comunes como una pelota de tenis, puños, dedos y la palma de la mano) y **descripción** (Tipo de carne o tipo de comida procesada incluyendo la marca) **de la manera más precisa posible y** acerca de las preparaciones de los alimentos se sugiere no omitir sal, azúcar y aceite o condimentos, es necesario registre el consumo de sal de mesa en referencia a una cucharadita cafetera por día o por comida como lo prefiera, y en el caso de las bebidas, como: cerveza, agua simple, refrescos y jugos en relación a mililitros o a tazas harineras la cual contiene 240 ml. Proceda a registrar absolutamente todo lo que comió el día que elija de la semana, esto deberá hacerlo por las noches antes de dormir para referirse al día de registro, así evitaremos que al día siguiente no recuerde con exactitud las cantidades o que omita alimentos consumidos por olvido, recuerde que hacerlo bien, no importa que consuma, puede dejar aportaciones importantes a la ciencia y esto ayudaría a más personas que comparten sus características. Los resultados de su consumo en relación a el balance de kilocalorías, líquidos, proteínas y grasas que habitualmente consume y si es lo adecuado para usted o no, **usted podrá consultarlos** una vez que los entregue al personal correspondiente y este los analice, por favor, escriba la forma de contacto en la que desea ser informado: \_\_\_\_\_

<p>90 gramos de carne es aproximadamente el tamaño y el espesor de una baraja o un casete de audio antiguo.</p>	
<p>Una pera o manzana de tamaño mediano corresponde a una pelota de tenis.</p>	
<p>30 gramos de queso es del tamaño de 4 dados juntos</p>	
<p>½ taza por ejemplo de helado es del tamaño de una pelota de tenis</p>	
<p>Una taza de puré de papa o verduras como brócoli es aproximadamente el tamaño de un puño de una mujer</p>	
<p>Una cucharada cafetera de mantequilla o aceite es aproximadamente del tamaño de la punta del dedo pulgar de una mujer</p>	
<p>30 gramos (1 Onza) de dulces o nueces o cacahuates son aproximadamente lo que cabe en la palma de la mano sin empalmarse unos con otros.</p>	

**DÍA 1** Fecha: \_\_\_\_\_

<b>Desayuno</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Colación matutina</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Comida</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Colación vespertina</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Cena</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		

\* Agua Total, refresco o jugos y su tipo o marca y mililitros consumidos de cada uno:  
 \* Sal de mesa en cucharaditas para cocinar sus alimentos de todo el día, (aproxime cantidad):

**DÍA 2** Fecha: \_\_\_\_\_

<b>Desayuno</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Colación matutina</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Comida</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Colación vespertina</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Cena</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		

\* Agua Total, refresco o jugos y su tipo o marca y mililitros consumidos de cada uno:

\* Sal de mesa en cucharaditas para cocinar sus alimentos de todo el día, (aproxime cantidad):

**DÍA 3** Fecha: \_\_\_\_\_

<b>Desayuno</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Colación matutina</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Comida</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Colación vespertina</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		
<b>Cena</b>	<b>Horario</b>	<b>Platillo, alimentos que contiene y de cada alimento: Ingredientes y cantidades</b>
Lugar de consumo:		<p>* Agua Total, refresco o jugos y su tipo o marca y mililitros consumidos de cada uno:                      * Sal de mesa en cucharaditas para cocinar sus alimentos de todo el día, (aproxime cantidad):</p>

## 11. Referencias.

- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, *et al.* (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 120:1640.
- Allin K.H., Nielsen T., Pedersen O. (2015). Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 172: R167 -77.
- American Diabetes Association. (2018). Standards of Medical Care in Diabetes-2017: Summary of Revisions. *Diabetes Care*; 40: S11.
- Ávila-Nava A., G. Noriega L., R. Tovar A., Granados O., Perez-Cruz C., Pedraza-Chaverri J., and Torres N (2017). Food combination based on a pre-hispanic Mexican diet decreases metabolic and cognitive abnormalities and gut microbiota dysbiosis caused by a sucrose-enriched high-fat diet in rats. *Mol. Nutr. Res Food*. 61, 1.
- Bacchetti De Gregoris T., Aldred N., Clare A.S., & Burgess J.G. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods*. 86, 351-356.
- Barczynska R, Kapusniak J, Litwin M, Slizewska K, Szalecki M. (2016). Dextrins from Maize Starch as Substances Activating the Growth of Bacteroidetes and Actinobacteria Simultaneously Inhibiting the Growth of Firmicutes, Responsible for the Occurrence of Obesity. *Plant Foods Hum Nutr*; 71:190.
- Belizário J.E., Napolitano M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol*. 6:1050.



- Biddle A, Stewart L, Blanchard J and Leschine S. (2015). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*; 5:627.
- Blaut M. (2015). Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc.* 74:227-34.
- Bo T, Shao S, Wu D, Niu S, Zhao J, Gao L. (2017). Relative variations of gut microbiota in disordered cholesterol metabolism caused by high-cholesterol diet and host genetics. *Microbiologyopen*;6: e491.
- Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. (2016). Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie*;124: 11-20.
- Brahe LK, Le Chatelier E, Prifti E, Pons N, Kennedy S, Hansen T, *et al.* (2015). Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutr Diabetes*; 5: e159.
- Burguete-García A. I., Martínez-Nava G. A., Valladares-Salgado A., Bermúdez V. H, Estrada-Velasco B., Wachter N., Peralta-Romero J., Garcia-Mena J., Parra E. & Cruz M. (2014). Association of  $\beta 1$  and  $\beta 3$  adrenergic receptors gene polymorphisms with insulin resistance and high lipid profiles related to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Nutr Hosp.* 29:1327-1334.
- Cabrerizo L., Rubio M. Á., Ballesteros M. D., Moreno Lopera C. (2008). Complicaciones asociadas a la obesidad. *Rev Esp Nutr Comunitaria*; 14: 156-162.
- Cani P.D., Delzenne N.M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 15:1546–1558.

- Carmody RN and Turnbaugh PJ. (2014). Host-microbial interactions in the metabolism of therapeutic and diet-derived xenobiotics. *J Clin Invest*; 124: 4173-4181.
- Chiu CM, Huang WC, Weng SL, Tseng HC, Liang C, Wang WC, *et al.* (2014). Systematic analysis of the association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics approaches. *Biomed Res Int*, 2014: 906168.
- Choi JJ, Eum SY, Rampersaud E, Daunert S, Abreu MT, Toborek M. (2013). Exercise attenuates PCB-induced changes in the mouse gut microbiome. *Environ Health Perspect*, 121: 725-730.
- Cruz M., Valladares-Salgado A., Garcia-Mena J., Ross K., Edwards M., Angeles-Martinez J., *et al.* (2010). Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev*, 26: 261–270.
- Dávila-Torres J., González-Izquierdo J., Barrera-Cruz A. (2015). Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 53:240-9.
- Davis SC, Yadav JS, Barrow SD, Robertson BK. (2017). Gut microbiome diversity influenced more by the Westernized dietary regime than the body mass index as assessed using effect size statistic. *Microbiologyopen*; 6:1.
- Del Chierico, F. Abbatini, F. Russo, A. Quagliariello, A. Reddel, S. Capoccia, D. Caccamo, R. Corradini, S.G. Nobili, V. De Peppo, F., *et al.* (2018). Gut microbiota markers in obese adolescent and adult patients: Age-dependent differential patterns. *Front. Microbiol*, 9, 1–12.

- Delzenne M.N., Cani D.P., Everard A., Neyrinck M.A., Bindels B.L. (2015). Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 58:2206–2217.
- Di Luccia B, Crescenzo R, Mazzoli A, Cigliano L, Venditti P, Walser JC, *et al.* (2015). Rescue of Fructose-Induced Metabolic Syndrome by Antibiotics or Faecal Transplantation in a Rat Model of Obesity. *PLoS One*; 10: e0134893.
- Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. (2002). Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*; 52:1615.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. ENSANUT MC 2016. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>.
- Estrada-Velasco BI, Cruz M, Garcia-Mena J, Valladares Salgado A, Peralta Romero J, Guna Serrano M de L, *et al.* (2014). Childhood obesity is associated to the interaction between firmicutes and high energy food consumption. *Nutr Hosp*; 31:1074.
- Feng J, Tang H, Li M, Pang X, Wang L, Zhang M, *et al.* (2014). The abundance of fecal Faecalibacterium prausnitzii in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Arch Microbiol*; 196:73.
- Fetissov, S.O. (2017). Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat. Rev. Endocrinol*; 13, 11–25.
- Fierer N., Hamady M., Lauber C.L., Knight R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17994–17999.

- Forslund, K, Hildebrand, F, Nielsen, T, Falony, G, Le Chatelier, E, Sunagawa, *et al.* (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*; 528: 262–266.
- Franco-de-Moraes AC, de Almeida-Pititto B, da Rocha Fernandes G, Gomes EP, da Costa Pereira A, Ferreira SRG. (2017). Worse inflammatory profile in omnivores than in vegetarians associates with the gut microbiota composition. *Diabetol Metab Syndr*; 9:62.
- Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, *et al.* (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*; 59:3049.
- Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, *et al.* (2013). Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J*; 13:514.
- Guevara-Figueroa T., Hugo Jiménez-Islas, María L. Reyes-Escogido, Anne G. Mortensen, Bente B. Laursen, Li-Wei Lin, Antonio De León-Rodríguez, Inge S. Fossgaard, Ana P. Barba de la Rosa (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.) *Journal of Food Composition and Analysis*; 23, 525–532.
- Han J.L., Lin H.L. (2014). Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective. *World J Gastroenterol*. 20: 17737-17745.

Haro C, Garcia-Carpintero S, Alcalá-Díaz JF, Gomez-Delgado F, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, *et al.* (2016b). The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *J Nutr Biochem*; 27:27.

Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, *et al.* (2016a). Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J Clin Endocrinol Metab*; 101:233.

Heiss, C.N.; Olofsson, L.E. (2018). Gut Microbiota-Dependent Modulation of Energy Metabolism. *J. Innate Immun*; 10, 163–171.

Hsu, C., Yen, G.C., (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 53–61.

Huber, KJ, Pascual, J, Foessel, BU and Overmann, J. (2015). Acidobacteriaceae. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2<sup>nd</sup> Ed. Bergey's Manual Trust.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Causas de Mortalidad, Base interactiva de datos 2013. Tomado de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Jervis-Bardy J., Leong E.X, Marri S., Smith R.J., Choo J.M., Smith-Vaughan H. C., Nosworthy E., Morris P.S., O'Leary S., Rogers G. B. and Marsh R. L. (2015). Deriving accurate microbiota profiles from human samples with low bacterial content through post-sequencing processing of Illumina MiSeq data. *Microbiome*. 3:19.

- Ji J., Qin Y., Ren J., Lu C., Wang R., Dai X., Zhou R., Huang Z., Xu M., Chen M., Wu W., Song L., Shen H., Hu Z., Miao D., Xia Y., Wang X. (2015). Mitochondria-related miR-141-3p contributes to mitochondrial dysfunction in HFD-induced obesity by inhibiting PTEN. *Sci Rep.* 5:16262.
- Jourova L, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. (2016). Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*; 160:317-326.
- Kaakoush NO. (2015). Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol*; 5:84.
- Kang C, Wang B, Kaliannan K, Wang X, Lang H, Hui S, *et al.* (2017). Gut Microbiota Mediates the Protective Effects of Dietary Capsaicin against Chronic Low-Grade Inflammation and Associated Obesity Induced by High-Fat Diet. *MBio*; 23:8.
- Karlsson Frederik H., Tremaroli V., Nookaew I., Bergstrom G., Behre Carl J., Fagerberg B., Nielsen J., Backhed F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*; 498:99–103.
- Klünder-Klünder M., Mejía-Benitez M.A., Flores-Huerta S., Burguete-García A.I., García-Mena J., & Cruz M. (2011). rs12255372 Variant of TCF7L2 Gene Is Protective for Obesity in Mexican Children. *Archives of Medical Research.* 42: 495-501.
- Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Sokol D, Hudcovic T, Hrnecir T, *et al.* (2011). Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin Exp Immunol*; 163:250.

- Laroute V, Tormo H, Couderc C, Mercier-Bonin M, Le Bourgeois P, Coccagn-Bousquet M, *et al.* (2017). From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*; 5:E27.
- Ley E.R., Turnbaugh P.J., Klein S. & Gordon J.I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022–1023.
- Lippert K, Kedenko L, Antonielli L, Kedenko I, Gemeier C, Leitner M, *et al.* (2017). Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef Microbes*; 8:545.
- Márquez-Sandoval F., Macedo-Ojeda G., Viramontes- Hörner D., Fernández Ballart J.D., Salas Salvadó J., Vizmanos B. (2011). The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr.* 14:1702-13.
- Martin S.D. & McGee S.L. (2014). The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 1840:1303-1312.
- Martínez-Gómez L.E., Cruz M., Martínez-Nava G.A., Madrid-Marina V., Parra E., García-Mena J., Espinoza-Rojo M., Estrada-Velasco B.I., Piza-Roman L.F., Aguilera P., Burguete-García A.I. (2011). A Replication Study of the *IRS1*, *CAPN10*, *TCF7L2*, and *PPARG* Gene Polymorphisms Associated with Type 2 Diabetes in Two Different Populations of Mexico. *Annals of Human Genetics.* 75,612–620.
- Maya-Lucas, O.; Murugesan, S.; Nirmalkar, K.; Alcaraz, L.D.; Hoyo-Vadillo, C.; Pizano-Zárate, M.L.; García-Mena, J. (2019). The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe*; 55, 11–23.

- Meaney A, Ceballos-Reyes G, Gutiérrez-Salmean G, Samaniego-Méndez V, Vela-Huerta A, Alcocer L, *et al.* (2013). Cardiovascular risk factors in a Mexican middle-class urban population. The Lindavista Study. Baseline data. *Arch Cardiol Mex*; 83:249.
- Mejía-León M.E., Petrosino J.F., Ajami N.J., Domínguez-Bello M.G. & Calderón de la Barca A.M. (2014). Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Scientific Reports*. 4: 3814.
- Menni C, Jackson MA, Pallister T, Steves CJ, Spector TD, Valdes AM. (2017). Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *Int J Obes (Lond)*; 41:1099.
- Miguel Soca P.E. (2009). El síndrome metabólico: un alto riesgo para individuos sedentarios. *ACIMED*, vol.20, n.2, pp. 0-0. ISSN 1024-9435.
- Millán J, Pintó X, Muñoz A, *et al.* (2009). Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag*; 5:757.
- Monk JM, Lepp D, Wu W, Pauls KP, Robinson LE, Power KA. (2017). Navy and black bean supplementation primes the colonic mucosal microenvironment to improve gut health. *J Nutr Biochem*; 49:89.
- Morán-Ramos S., Avila-Nava A., R. Tovar A., Pedraza-Chaverri J, López-Romero P., and Torres N (2012). *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. *J. Nutr.* 142: 1956–1963.
- Murugesan S., Ulloa-Martínez M., Martínez-Rojano H., Galván-Rodríguez F. M., Miranda-Brito C., Romano M. C., Piña-Escobedo A., Pizano-Zárate M. L., Hoyo-Vadillo C., García-Mena J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by



the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34:1337–1346.

National Cholesterol Education Program. (2002). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*; 106:3143.

Newell-Fugate AE, Lenz K, Skenandore C, Nowak RA, White BA, Braundmeier-Fleming A. (2017). Effects of coconut oil on glycemia, inflammation, and urogenital microbial parameters in female Ossabaw mini-pigs. *PLoS One*; 12:e0179542.

Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013) (2013).

Parthasarathy G, Chen J, Chen X, Chia N, O'Connor HM, Wolf PG, *et al.* (2016). Relationship between Microbiota of the Colonic Mucosa vs Feces and Symptoms, Colonic Transit, and Methane Production in Female Patients with Chronic Constipation. *Gastroenterology*; 150:367.

Pu S, Khazanehei H, Jones PJ, Khafipour E. (2016). Interactions between Obesity Status and Dietary Intake of Monounsaturated and Polyunsaturated Oils on Human Gut Microbiome Profiles in the Canola Oil Multicenter Intervention Trial (COMIT). *Front Microbiol*; 7:1612.

- Pussinen, PJ, Havulinna, AS, Lehto, M, Sundvall, J and Salomaa, V. (2011). Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care*; 34: 392–397.
- Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., *et al.* (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*; 490:55–60.
- Quigley Eamonn M. M. (2013). Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*; 9:560.
- Rajilić-Stojanović M, Smidt H, de Vos WM. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol*; 9: 2125-2136.
- Ramos W., López T., Revilla L., More L., Huamaní M., Pozo M. (2014). Resultados de la vigilancia epidemiológica de diabetes mellitus en hospitales notificantes del Perú, 2012. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 31: 9-15.
- Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, *et al.* (2017). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol*; 19:95.
- Rodriguez J, Hiel S and Delzenne NM. (2018). Metformin: old friend, new ways of action-implication of the gut microbiome? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 21: 294-301.
- Rodríguez-García, M.E., de Lira, C., Hernández-Becerra, E. *et al.* (2007). Physicochemical Characterization of Nopal Pads (*Opuntia ficus indica*) and Dry Vacuum Nopal Powders as a Function of the Maturation Plant Foods. *Hum Nutr*, 62: 107.
- Sakamoto M, Tanaka Y, Benno Y, Ohkuma M. (2015). Parabacteroides faecis sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*; 65:1342.

- Salonen A, Lahti L, Salojärvi J, Holtrop G, Korpela K, Duncan SH, *et al.* (2014). Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J*; 8:2218.
- Sato J., Kanazawa A., Ikeda F., Yoshihara T., Goto H., *et al.* (2014). Gut dysbiosis and detection of “live gut bacteria” in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 37:2343–2350.
- Schäffler H, Herlemann DP, Alberts C, Kaschitzki A, Bodammer P, Bannert K, *et al.* (2016). Mucosa-attached bacterial community in Crohn's Disease coheres with the Clinical Disease Activity Index. *Environ Microbiol Rep*; 8: 614–621.
- Sepp E., Kolk H., Loivukene K., Mikelsaar M., *et al.* (2014). Higher blood glucose level associated with body mass index and gut microbiota in elderly people. *Microb Ecol Health Dis*, 25.
- Shin N. R., Bose S., Wang J. H., Ansari A., Lim S. K., Chin Y. W., *et al.* (2017). Flos Lonicera Combined with Metformin Ameliorates Hepatosteatosis and Glucose Intolerance in Association with Gut Microbiota Modulation. *Front Microbiol*;8: 2271.
- Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, *et al.* (2017). Roseburia spp.: a marker of health? *Future Microbiol*; 12:157.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486; 215–221.
- Tremaroli V, Bäckhed F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*; 489:242.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, *et al.* (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*; 457:480.

- Ulloa-Martínez M., Burguete-García A.I., Murugesan S., Hoyo-Vadillo C., Cruz M., García-Mena J. (2016). Expression of candidate genes associated to obesity in peripheral White blood cells of Mexican children. *Arch Med Sci*. 5. Vol. 12.
- Upadhyaya B, McCormack L, Fardin-Kia AR, Juenemann R, Nichenametla S, Clapper J, *et al.* (2016). Impact of dietary resistant starch type 4 on human gut microbiota and immunometabolic functions. *Sci Rep*; 6:28797.
- van den Bogert B, Meijerink M, Zoetendal EG, Wells JM, Kleerebezem M. (2014). Immunomodulatory properties of *Streptococcus* and *Veillonella* isolates from the human small intestine microbiota. *PLoS One*; 9:114277.
- van Olden C., Groen A.K., Nieuwdorp M. (2015). Role of Intestinal Microbiome in Lipid and Glucose Metabolism in Diabetes Mellitus. *Clin Ther*. 1; 37:1172-7.
- Vital M, Howe AC, Tiedje JM. (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta) genomic data. *MBio*; 5:e00889.
- Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, *et al.* (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*; 143:913.
- Wellen K.E., Hotamisligil G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 115: 1111–1119.
- Whiteley A.S., Jenkins S., Waite I., Kresoje N., Payne H., Mullan B., Allcock R., O'Donnell A. (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *J Microbiol Methods*. 9: 80–88.

- World Health Organization (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, (WHO/NCD/NCS/99.2).
- World Health Organization (2014). Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva.
- World Health Organization. Obesity. (2017). <http://www.who.int/topics/obesity/en/> Accessed November 08, 2017.
- Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, *et al.* (2017). Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med*; 23: 850-858.
- Yoda K, Sun X, Kawase M, Kubota A, Miyazawa K, Harata G, *et al.* (2015). A combination of probiotics and whey proteins enhances anti-obesity effects of calcium and dairy products during nutritional energy restriction in aP2-agouti transgenic mice. *Br J Nutr*; 113:1689.
- Zárate F., & Flores H. (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología ISBN. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/10\\_2012\\_Manual\\_DM2\\_vFinal\\_31oct12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/10_2012_Manual_DM2_vFinal_31oct12.pdf)
- Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, *et al.* (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*; 4:232.

Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, *et al.* (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106:2365.

Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, *et al.* (2013). Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*; 8:71108.

## 12. Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentración y calidad de las muestras de DNA de pacientes OB, SM y OSM.	80
<b>Tabla 2.</b> Concentración y calidad de las muestras de DNA de copro de participantes sanos, pacientes con diabetes tipo 2 y prediabetes del ISSSTE.	81
<b>Tabla 3.</b> Concentración y calidad de las muestras de DNA de copro de participantes sanos, pacientes con diabetes tipo 2 y prediabetes del INPer.	82
<b>Tabla 4.</b> Características clínicas de los sujetos de estudio.	83
<b>Tabla 5.</b> Abundancia relativa de Fila bacteriano en los sujetos de estudio.	84
<b>Tabla 6.</b> Bacterias con mayor enriquecimiento entre los grupos estudiados y comparación con otros estudios.	87
<b>Tabla 7.</b> Abundancia relativa de órdenes bacterianos, familias y géneros en los sujetos del estudio.	88
<b>Tabla 8.</b> Diferencias entre la abundancia bacteriana de los grupos de estudio.	89
<b>Tabla 9.</b> Predicción del contenido de los genes de las bacterias del colon entre los grupos con corrección de falsos positivos (FDR).	90
<b>Tabla 10.</b> Determinación de la carga bacteriana y la abundancia de los fila principales en los grupos de estudio.	91
<b>Tabla 11.</b> Características generales de los sujetos de estudio.	92
<b>Tabla 12.</b> Comparación de bacterias del colon con cambio en la abundancia y asociaciones con metadatos en relación a otros estudios.	93
<b>Tabla 13.</b> Comparación entre pares de grupos de las características generales de los sujetos de estudio.	94
<b>Tabla 14.</b> Promedio de la abundancia relativa (%) entre los grupos de estudio a nivel de Filo.	95
<b>Tabla 15.</b> Comparaciones entre grupos sobre los índices de alfa diversidad.	97
<b>Tabla 16.</b> Comparaciones entre grupos de la Beta diversidad usando el método ANOSIM.	99
<b>Tabla 17.</b> Enriquecimiento bacteriano en cada grupo de estudio con el análisis de LEfSe con el test de corrección de Benjamini-Hochberg.	100
<b>Tabla 18.</b> Taxones bacterianos ligados significativamente a parámetros clínicos, antropométricos, dietéticos y bioquímicos.	101
<b>Tabla 19.</b> Vías metabólicas de la microbiota intestinal entre el grupo de pacientes con prediabetes y DT2 con Metformina.	102

**Tabla 1. Concentración y calidad de las muestras de DNA de copro de participantes sanos, pacientes con obesidad y obesidad con síndrome metabólico.**

Muestra	ng/μl	A260/A280	A260	Muestra	ng/μl	A260/A280	A260
<b>1</b>	33.7	0.94	0.675	<b>38</b>	109.6	1.65	2.192
<b>2</b>	31.1	0.88	0.623	<b>39</b>	33.9	1.27	0.679
<b>3</b>	57.5	1.17	1.149	<b>40</b>	23.4	1.14	0.468
<b>4</b>	41.1	1.27	0.822	<b>41</b>	42.7	1.37	0.853
<b>5</b>	36	0.98	0.721	<b>42</b>	44.4	1.31	0.888
<b>6</b>	64.3	1.35	1.287	<b>43</b>	97	1.42	1.939
<b>7</b>	43.3	0.94	0.865	<b>44</b>	52.2	1.08	1.045
<b>8</b>	18.5	0.96	0.371	<b>45</b>	31.1	0.96	0.62
<b>9</b>	31.1	0.96	0.621	<b>46</b>	23.5	0.87	0.471
<b>10</b>	34.7	0.94	0.694	<b>47</b>	321.8	1.42	6.436
<b>11</b>	30.5	0.86	0.61	<b>48</b>	41.3	1.31	0.826
<b>12</b>	71.1	1.09	1.421	<b>49</b>	38.8	1.12	0.776
<b>13</b>	40.5	1.11	0.811	<b>50</b>	18.2	0.92	0.363
<b>14</b>	30.5	0.94	0.611	<b>51</b>	22.9	0.91	0.459
<b>15</b>	145.1	1.36	2.901	<b>52</b>	32.8	1.24	0.657
<b>16</b>	18.3	1.1	0.367	<b>53</b>	11.7	1.51	2.233
<b>17</b>	113.9	1.42	2.277	<b>54</b>	4.7	1.35	0.093
<b>18</b>	31.4	1.09	1.628	<b>55</b>	25.6	0.86	0.511
<b>19</b>	20.4	0.84	0.409	<b>56</b>	25.3	0.88	5.507
<b>20</b>	18.8	1.12	0.375	<b>57</b>	31.9	0.97	0.638
<b>21</b>	27	1.23	0.541	<b>58</b>	35.4	0.86	0.709
<b>22</b>	30.7	1.27	0.614	<b>59</b>	164.5	1.53	3.29
<b>23</b>	35.2	1.32	0.704	<b>60</b>	74.6	1.42	1.492
<b>24</b>	79.5	1.54	1.591	<b>61</b>	25.6	1.19	0.512
<b>25</b>	36.7	1.25	0.734	<b>62</b>	23.6	1.03	0.472
<b>26</b>	16.15	0.74	0.33	<b>63</b>	33.1	1	0.661
<b>27</b>	22	1.13	0.44	<b>64</b>	36.2	1.02	0.724
<b>28</b>	34.8	1.16	0.696	<b>65</b>	33.5	1.03	0.67
<b>29</b>	50.5	2.63	1.011	<b>66</b>	37.8	1.3	0.755
<b>30</b>	29.1	1.41	0.598	<b>67</b>	37.6	1.02	0.753
<b>31</b>	95.4	1.23	0.909	<b>68</b>	31.2	1.11	0.625
<b>32</b>	20.4	1.09	0.407	<b>69</b>	23.6	0.97	0.472
<b>33</b>	59.4	1.07	1.189	<b>70</b>	31.7	1.08	0.635
<b>35</b>	63	1.2	1.259	<b>71</b>	9.6	1.44	0.192
<b>36</b>	41.3	1.29	0.825	<b>72</b>	164.9	1.51	3.299
<b>37</b>	39.7	1.09	0.794				



**Tabla 2. Concentración y calidad de las muestras de DNA de copro de participantes sanos, pacientes con diabetes tipo 2 y prediabetes del ISSSTE.**

Muestra	ng/μl	A260/A280	Muestra	ng/μl	A260/A280	Muestra	ng/μl	A260/A280
						CASOS		
<b>1</b>	186.3	2.06	<b>38</b>	19.1	1.84	10	13.7	1.87
<b>2</b>	108.2	2.00	<b>39</b>	13.9	1.82	11	21.7	1.76
<b>3</b>	290.2	2.03	<b>40</b>	12.9	1.80	12	20.1	1.81
<b>4</b>	89.8	2.06	<b>41</b>	15.1	1.79	13	13.0	1.93
<b>5</b>	223.3	2.10	<b>42</b>	13.9	1.71	14	15.7	1.87
<b>6</b>	185.0	1.97	<b>43</b>	11.8	1.79	15	23.1	1.86
<b>7</b>	40.3	1.82	<b>44</b>	11.8	1.77	16	18.9	1.84
<b>8</b>	10.9	2.04	<b>45</b>	13.7	1.87	17	17.1	1.77
<b>9</b>	20.9	1.84	<b>46</b>	28.3	1.78	18	31.6	1.56
<b>10</b>	29.3	1.80	<b>47</b>	18.6	1.82	19	14.8	1.81
<b>11</b>	7.8	1.96	<b>48</b>	20.7	1.81	20	14.8	1.94
<b>12</b>	18.0	1.89	<b>49</b>	13.8	1.65	21	8.0	1.95
<b>13</b>	21.7	1.83	<b>50</b>	23.6	1.86	22	10.8	1.93
<b>14</b>	12.0	1.79	<b>51</b>	17.5	1.84	23	16.5	2.01
<b>15</b>	12.2	1.88	<b>52</b>	21.4	1.84	24	16.9	1.82
<b>16</b>	15.9	1.88	<b>53</b>	17.3	1.81	25	16.4	1.92
<b>17</b>	14.3	1.84	<b>54</b>	14.3	1.82	26	12.6	1.92
<b>18</b>	10.9	1.66	<b>55</b>	12.2	1.93	27	25.7	1.81
<b>19</b>	10.3	1.88	<b>56</b>	9.5	1.84	28	19.3	1.82
<b>20</b>	12.0	1.24	<b>57</b>	20.7	1.76	29	11.1	1.84
<b>21</b>	14.7	2.13	<b>58</b>	15.4	1.92	30	21.3	1.80
<b>22</b>	23.8	1.97	<b>59</b>	18.4	1.85	31	12.1	1.88
<b>23</b>	21.9	1.81	<b>60</b>	21.2	1.63	32	20.8	1.82
<b>24</b>	19.6	2.08	<b>61</b>	13.3	1.85	33	15.7	1.83
<b>25</b>	12.9	1.91	<b>62</b>	10.6	1.87	34	11.7	1.81
<b>26</b>	34.3	1.83	<b>63</b>	14.6	1.88	35	6.7	1.89
<b>27</b>	35.5	1.78	<b>64</b>	13.4	1.94	36	8.9	1.87
<b>28</b>	17.1	2.02	<b>1</b>	10.7	1.92	37	8.3	1.96
<b>29</b>	57.0	1.93	<b>2</b>	10.9	1.86	38	18.0	1.77
<b>30</b>	14.8	1.83	<b>3</b>	11.4	1.76	39	11.1	1.76
<b>31</b>	16.1	1.83	<b>4</b>	9.3	1.63	40	15.2	1.84
<b>32</b>	9.3	1.96	<b>5</b>	20.0	1.89	41	9.9	1.81
<b>33</b>	15.9	1.79	<b>6</b>	15.0	1.86	42	12.9	1.69
<b>35</b>	28.3	1.75	<b>7</b>	19.9	1.89	43	11.3	1.82
<b>36</b>	12.7	1.80	<b>8</b>	10.2	1.92	44	11.9	1.68
<b>37</b>	12.6	1.78	<b>9</b>	16.5	1.95	45	20.3	1.74

**Tabla 3. Concentración y calidad de las muestras de DNA de copro de participantes sanos, pacientes con diabetes tipo 2 y prediabetes del INPer.**

Muestra	ng/μl	A260/A280	Muestra	ng/μl	A260/A280	Muestra CASOS	ng/μl	A260/A280
1	10.5	2.09	38	11.0	1.78	2	10.9	1.99
2	13.9	1.95	39	27.0	1.87	3	19.5	1.85
3	14.7	2.06	40	16.5	2.01	4	9.6	2.18
4	24.5	1.72	41	11.3	1.95	5	16.0	1.85
5	18.4	1.88	42	10.3	1.84	6	30.5	1.88
6	25.0	1.86	43	22.3	1.82	7	18.9	2.0
7	12.5	2.12	44	16.2	1.82	8	18.0	1.92
8	23.5	1.88	45	14.2	1.89	9	13.2	1.95
9	7.8	2.20	46	26.7	1.81	10	16.6	1.85
10	25.3	1.95	47	14.7	1.85	11	25.3	1.89
11	13.0	1.92	48	19.4	1.69	12	16.8	1.84
12	18.8	1.65	49	20.5	1.82	13	18.8	1.79
13	13.6	1.80	50	38.2	1.85	14	8.9	2.03
14	24.4	1.95	51	20.9	1.90	15	17.4	1.82
15	15.7	1.95	52	37.7	1.85	16	14.7	1.86
16	22.4	1.78	53	20.1	1.71	17	19.7	2.05
17	25.6	1.85	54	14.6	1.84	18	15.3	1.93
18	34.9	1.77	55	12.7	1.86	19	24.5	1.91
19	12.7	1.75	56	23.1	1.77	20	12.9	1.90
20	10.2	1.82	57	21.7	1.84	21	22.8	1.83
21	11.7	1.72	58	12.8	1.85	22	17.8	1.88
22	19.0	1.74	59	27.4	1.71	23	7.3	2.12
23	8.3	1.92	60	31.4	1.83	24	15.6	1.78
24	15.3	1.64	61	10.2	2.12	25	18.9	1.91
25	12.7	1.87	62	13.4	1.83	26	47.3	1.84
26	15.3	1.86	63	17.1	1.96	27	12.8	1.94
27	13.3	1.81	64	31.0	1.65	28	11.5	1.80
28	12.6	1.83	65	11.4	1.90			
29	14.0	1.81	66	16.5	1.85			
30	14.2	1.72	67	17.5	1.84			
31	11.5	1.96	68	10.3	1.94			
32	0.0	0.0	69	23.5	1.84			
33	37.2	1.87	70	20.4	1.79			
35	19.1	1.83	71	19.6	1.88			
36	15.3	1.77	72	26.5	1.83			
37	20.1	1.81	1	26.3	1.82			

**Tabla 4.** Características clínicas de los sujetos de estudio.

	Control	Obesidad	Obesidad + Síndrome metabólico	<i>p</i>
<i>Numero de sujetos</i>	25	17	25	
<i>Edad (años)</i>	23.3 ±3.1	38.8 ±8.4	40.5 ±10.3	<0.001
<i>Edad rango</i>	18 a 30	22 a 51	22 a 59	nd
<i>Datos antropométricos</i>				
Estatura (m)	1.61 ±0.05	1.55 ±0.08	1.56 ±0.06	0.002
Peso (kg)	55.3 ±6.4	83.2 ±14.1	86.8 ±15.1	<0.001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21.4 ±1.9	34.8 ±6.1	35.8 ±5.1	<0.001
Cintura (cm)	71.4 ±7.0	96.9 ±11.1	99.6 ±10.2	<0.001
Cadera (cm)	92.0 ±6.7	114.6 ±11.1	115.7 ±11.8	<0.001
Índice Cintura/Cadera	0.78 ±0.6	0.85 ±0.08	0.86 ±0.05	<0.001
<i>Datos Bioquímicos</i>				
Glucosa (mg/dl)	84.2 ±5.5	91.6 ±5.6	104.6 ±17.5	<0.001
Triglicéridos (mg/dl)	109.4 ±29.1	102.2 ±27.0	177.2 ±69.6	<0.001
HDL (mg/dl)	60.6 ±12.4	45.6 ±11.5	42.4 ±8.4	<0.001
LDL (mg/dl)	87.4 ±24.2	102.0 ±21.1	116.4 ±23.3	<0.001
Colesterol (mg/dl)	170.0 ±26.2	168.0 ±26.2	194.3 ±29.0	0.002
LDL-c/HDL-c	1.5 ±0.6	2.5 ±1.0	2.9 ±0.8	<0.001
C/HDL-c	2.9 ±0.7	3.9 ±1.1	4.7 ±1.1	<0.001
<i>Presión arterial</i>				
Sistólica (mm Hg)	109.3 ±10.7	122.7 ±16.6	125.4 ±13.1	<0.001
Diastólica (mm Hg)	71.9 ±10.9	80.2 ±13.7	85.5 ±12.7	0.003

Los resultados aparecen como promedio ± desviación estándar. Valor *P* según Kruskal Wallis para datos no paramétricos y ANOVA para paramétricos. HDL - lipoproteína de alta densidad, LDL - lipoproteína de baja densidad, nd - no determinado.

**Tabla 5.** Bacterias con mayor enriquecimiento entre los grupos estudiados y comparación con otros estudios.

<b>Filo Proteobacteria</b>			
<b>bacteria</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Otros estudios</b>	<b>Referencia</b>
<i>Succinivibrio</i> spp.	3-veces más abundante en OB que en CO y OSM	<i>Succinivibrio</i> spp y <i>Halomonas</i> spp., estuvieron altos en sujetos brasileños con sobrepeso y omnívoros, este grupo mostró valores más altos de insulina, HOMA-IR y un perfil de lípidos más alto.	Franco-de-Moraes <i>et al.</i> , 2017
<b>Filo Bacteroidetes</b>			
<b>bacteria</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Otros estudios</b>	<b>Referencia</b>
Family S24-7	3- veces más abundante en OB que en CO y OSM	The increase in the abundance of S24-7 (short chain fatty acid producer) promote colonic expression of the SCFA receptors GPR-41/-43/-109a (Canadian protocol, Model: Mice).	Monk <i>et al.</i> , 2017
		El análisis de LEfSe indicó que los miembros de la familia S24-7 productora de LPS eran 5 veces más abundantes en ratones con dieta alta en grasa versus dieta alta en grasa más capsaicina (potentes funciones contra la obesidad).	Kang <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacteroides</i> spp.	4- veces más abundante en CO que en OB y OSM	<i>Bacteroides</i> spp. se correlacionó negativamente con la ingesta de energía y la adiposidad observada en personas que perdieron peso después de un procedimiento de bypass gástrico en Y de Roux en sujetos franceses.	Furet <i>et al.</i> , 2010
		En las mujeres de Austria, la abundancia relativa de la familia Bacteroidaceae (géneros de <i>Bacteroides</i> ) disminuyó significativamente en la obesidad en comparación con las mujeres sin obesidad.	Lippert <i>et al.</i> , 2017
<i>Parabacteroides</i> spp.	3- veces más abundante en CO que en OB y OSM	La administración oral de antígenos de Parabacteroides distasonis atenúa la colitis murina experimental mediante la modulación de la inmunidad y la composición de la microbiota.	Kverka <i>et al.</i> , 2011
		Una especie del género <i>Parabacteroides</i> ha sido aislada de heces humanas en la población japonesa.	Sakamoto <i>et al.</i> , 2015
<b>Filo Firmicutes</b>			
<b>bacteria</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Otros estudios</b>	<b>Referencia</b>
<i>Streptococcus</i> spp.	3- veces más abundante en CO que en OB y OSM	<i>S. thermophilus</i> es un probiótico que se asocia a la reducción del peso corporal, la acumulación de grasa y la actividad de la sintasa de ácidos grasos en adipocitos en ratones.	Yoda <i>et al.</i> 2015
		<i>Streptococcus</i> aislados del intestino delgado humano tienen propiedades inmunomoduladoras por la inducción de niveles variables de las citoquinas IL-8, TNF- $\alpha$ e IL-12p70.	van den Bogert <i>et al.</i> , 2014

<i>Roseburia</i> spp.	3- veces más abundante en OB que en CO y OSM	Bacterias comensales que producen ácidos grasos de cadena corta, especialmente butirato. Se asocia con varias enfermedades, como el síndrome del intestino irritable, la obesidad, la diabetes tipo 2, las afecciones del sistema nervioso y las alergias.	Tamanai-Shacoori <i>et al.</i> , 2017
		<i>Roseburia</i> spp. es una bacteria productora de ácido butírico que posee butiril coenzima A (CoA): acetato-CoA transferasa y actividades de acetato quinasa.	Duncan <i>et al.</i> , 2002
<i>Faecalibacterium</i> spp.	3- veces más abundante en OSM que en OB y CO	La abundancia de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> Incrementó en muestras fecales de sujetos españoles con obesidad después de una dieta alta en carbohidratos complejos.	Haro, <i>et al.</i> , 2016a
		<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> es productora de ácido butírico que posee butiril coenzima A (CoA): acetato-CoA transferasa y actividades de acetato quinasa.	Duncan <i>et al.</i> , 2002
Family Erysipelotrichaceae	3- veces más abundante en CO que en OB y OSM	Se ha informado una alta abundancia relativa de Erisipelotrichaceae en mujeres de Austria con glucosa en ayunas alterada en comparación con la glucosa normal.	Lippert <i>et al.</i> , 2017
		La evidencia más sólida sobre el papel de Erysipelotrichaceae en enfermedades humanas proviene de estudios relacionados con trastornos metabólicos.	Kaakoush NO, 2015
		Encontraron que cuatro linajes diferentes (M1-M4) dentro de la familia Erysipelotrichaceae de esta clase respondieron de manera diferente a los fenotipos de la dieta o la salud del huésped en ratones.	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>Coprococcus</i> spp.	4- veces más abundante en OSM que en OB y CO	<i>C. comes</i> la abundancia disminuye a lo largo del IMC, los triglicéridos séricos, el colesterol y el colesterol LDL en adultos alemanes afectados de T2D/OB después de la cirugía de bypass gástrico en Y de Roux.	Graessler <i>et al.</i> 2013
		<i>Coprococcus</i> spp., una bacteria productora de butirato conocida se encuentra en la microbiota intestinal de individuos sanos.	Qin <i>et al.</i> , 2010
		<i>Coprococcus</i> spp., la cepa L2-50 es un productor neto de acetato y posee actividades detectables de butirato quinasa, acetato quinasa y butiril-CoA: acetato-CoA transferasa.	Duncan <i>et al.</i> , 2002
Family Lachnospiraceae & <i>Lachnospira</i> spp.	4- veces más abundante en OSM que en OB y CO	La familia Lachnospiraceae, se asocia con un menor aumento de peso a largo plazo en mujeres de ascendencia caucásica.	Menni <i>et al.</i> 2017
		Lachnospiraceae fue más abundante en sujetos austriacos con alteración de la glucosa en ayunas y alteración de la tolerancia a la glucosa; y en mujeres con SM.	Lippert <i>et al.</i> , 2017
		<i>Lachnospiraceae</i> spp. es una productora de Butirato que ha sido encontrada en sujetos sanos.	Vital <i>et al.</i> , 2014

<i>Staphylococcus</i> spp.	3- veces más abundante en CO que en OB y OSM	La abundancia relativa de <i>Staphylococcus</i> spp., fue alta en población Española con SM en comparación a controles.	Haro <i>et al.</i> , 2016b
<i>Turicibacter</i> spp.	3- veces más abundante en CO que en OB y OSM	<i>Turicibacter</i> spp., tuvo una asociación negativa con indicadores clínicos de trastornos metabólicos como la insulina y la HbA1c en la población austriaca.	Lippert <i>et al.</i> , 2017
		En sujetos canadienses con riesgo de SM que siguieron una dieta rica en MUFA, la abundancia relativa de <i>Turicibacter</i> spp., aumentó.	Pu <i>et al.</i> , 2016
<i>Lactococcus</i> spp.	3- veces más abundante en CO que en OB y OSM	<i>Lactococcus lactis</i> es un alto productor de ácido láctico y agentes antimicrobianos (bacteriocinas) utilizados en la industria láctea.	Laroute <i>et al.</i> , 2017
		<i>Lactococcus</i> spp., se correlacionó con un tránsito colónico más rápido en mujeres sanas de E.U., esto es posible porque <i>Lactococcus</i> produce serotonina, que inicia la peristalsis intestinal.	Parthasarathy <i>et al.</i> , 2016
<i>Ruminococcus</i> spp.	3- veces más abundante en OSM que en OB y CO	La abundancia relativa de <i>Ruminococcus</i> spp., fue menor en la población española con SM respecto a los controles.	Haro <i>et al.</i> , 2016b
		En un modelo de rata con alimentación para inducir obesidad y SM con una dieta rica en fructosa, la abundancia de <i>Ruminococcus</i> spp., se incrementó.	Di Luccia <i>et al.</i> , 2015
		En sujetos caucásicos, <i>Ruminococcus lactaris</i> se enriqueció y se observaron altos niveles de acetato y butirato en las heces después de una intervención con almidón resistente tipo 4.	Upadhyaya <i>et al.</i> , 2016
		<i>Ruminococcus</i> spp., es una bacteria productora de butirato que se encuentra en sujetos sanos.	Vital <i>et al.</i> , 2014
<i>Megamonas</i> spp.	3- veces más abundante en OSM que en OB y CO	<i>Megamonas</i> spp., se informó más abundante en adultos obesos Taiwaneses que en peso normal.	Chiu <i>et al.</i> 2014
		<i>Megamonas</i> spp., se informó de mayor abundancia en sujetos Chinos sanos y en personas con prediabetes que en pacientes adultos con diabetes tipo 2 recientemente diagnosticados.	Zhang <i>et al.</i> , 2013

CO, grupo de control; OB, grupo de obesidad; OSM, grupo de obesidad + síndrome metabólico; T2D, diabetes tipo 2; HbA1c, hemoglobina glucosilada, dieta MUFA, dieta rica en aceite de canola.

**Tabla 6.** Abundancia relativa de Fila bacteriano en los sujetos de estudio.

Fila	Control	Obesidad	Obesidad + Síndrome metabólico	<i>p</i>	<i>q</i>
Firmicutes	56.95%	72.97%	73.34%	0.0029	0.0345*
Bacteroidetes	36.20%	22.50%	23.43%	0.7125	1.0000
Proteobacteria	4.20%	2.80%	1.45%	0.1160	0.6960
Actinobacteria	2.32%	1.27%	1.29%	0.1667	0.8002
Tenericutes	0.11%	0.05%	0.04%	0.0893	0.6960
Cyanobacteria	0.06%	0.20%	0.07%	0.2861	0.9809
Synergistetes	0.02%	0.00%	0.00%	0.2284	0.9136
Others	0.14%	0.22%	0.37%	<0.0001	<0.0001
Total	100.00%	100.00%	100.00%	<i>nd</i>	<i>nd</i>

%, significa la abundancia relativa. Se usó Kruskal Wallis para calcular el valor *p* y el valor *q* como False Discovery Rate (FDR ajustado). Otros incluyen Fila como Verrucomicrobia, Spirochaetes y Fusobacteria. *nd*, no determinado. \*, Indica significación estadística.

**Tabla 7.** Abundancia relativa de órdenes bacterianos, familias y géneros en los sujetos del estudio

Categoría taxonómica	Control	Obesidad	Obesidad + Síndrome metabólico	<i>p</i>	<i>q</i>
<i>g_Bacteroides</i> *	20.73%	6.47%	7.10%	<0.0001	0.0002
<i>f_Ruminococcaceae</i>	16.46%	19.16%	16.17%	0.5579	1.0000
<i>f_Lachnospiraceae</i> *	10.96%	14.75%	17.45%	<0.0001	0.0046
<i>g_Prevotella</i>	6.84%	11.65%	8.85%	0.4073	1.0000
<i>g_Blautia</i>	5.09%	7.33%	8.51%	0.1430	1.0000
<i>f_Rikenellaceae</i>	3.77%	2.56%	2.14%	0.2519	1.0000
<i>o_Clostridiales</i>	2.80%	3.80%	3.86%	0.1650	1.0000
<i>g_Ruminococcus</i>	2.37%	2.09%	2.07%	0.8908	1.0000
<i>g_Dialister</i>	2.20%	1.99%	2.30%	0.0858	1.0000
<i>g_Streptococcus</i>	2.19%	0.45%	0.64%	0.0010	0.0793
<i>g_Coprococcus</i> *	2.18%	4.55%	4.51%	0.0002	0.0231
<i>f_Erysipelotrichaceae</i> *	1.74%	0.38%	0.36%	<0.0001	0.0075
<i>o_Clostridiales</i>	1.48%	2.40%	2.44%	0.1650	1.0000
<i>f_Barnesiellaceae</i>	1.45%	0.48%	0.73%	0.0357	1.0000
<i>g_Phascolarctobacterium</i>	1.45%	0.42%	0.52%	0.1064	1.0000
<i>f_Peptostreptococcaceae</i>	1.06%	2.07%	1.82%	0.1306	1.0000
<i>g_Parabacteroides</i>	1.03%	0.44%	0.40%	0.0008	0.0681
<i>g_Lachnospira</i> *	0.99%	3.24%	3.79%	<0.0001	0.0075
<i>g_Bifidobacterium</i>	0.95%	0.76%	1.39%	0.9837	1.0000
<i>g_Eubacterium</i>	0.89%	0.19%	0.20%	0.0267	1.0000
<i>g_Collinsella</i>	0.89%	0.31%	0.27%	0.7422	1.0000
<i>g_Roseburia</i> *	0.89%	2.72%	2.14%	0.0002	0.0231
<i>f_Enterobacteriaceae</i>	0.88%	0.21%	0.48%	0.0704	1.0000
<i>f_Clostridiaceae</i>	0.78%	1.38%	1.48%	0.0524	1.0000
<i>g_Odoribacter</i>	0.57%	0.30%	0.11%	0.0026	0.1729
<i>g_Catenibacterium</i>	0.56%	0.31%	0.15%	0.1058	1.0000
<i>g_Faecalibacterium</i> *	0.55%	1.15%	1.19%	0.0003	0.0290
Others	8.26%	8.47%	8.95%	0.3679	1.0000
Total	100.00%	100.00%	100.00%	<i>nd</i>	<i>nd</i>

%, significa la abundancia relativa. Se usó Kruskal Wallis para calcular el valor *p* y el valor *q* de False Discovery Rate (FDR ajustado). Otros incluyen todas las órdenes, familias y géneros menos abundantes. *nd*, no determinado. \*, Indica significación estadística.



**Tabla 8.** Diferencias entre la abundancia bacteriana de los grupos de estudio.

Bacteria	Grupo	Escala del efecto (LDA)	<i>p</i>	<i>q</i>
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Lachnospiraceae_g_Roseburia	OB	3.9411	0.0002	0.0063
k_Bacteria_p_Proteobacteria_c_Gammaproteobacteria_o_Aeromonadales_f_Succinivibrionaceae_g_Succini vibrio	OB	3.7194	<0.0001	0.0000
k_Bacteria_p_Bacteroidetes_c_Bacteroidia_o_Bacteroidales_f_S24_7	OB	3.4940	<0.0001	0.0000
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Lachnospiraceae	OSM	4.6431	0.0001	0.0048
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Lachnospiraceae_g_Lachnospira	OSM	4.1670	<0.0001	0.0011
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Lachnospiraceae_g_Coprococcus	OSM	4.0980	0.0001	0.0032
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Ruminococcaceae_g_Faecalibacterium	OSM	3.5611	0.0002	0.0063
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Lachnospiraceae_g_Ruminococcus	OSM	3.4052	0.0001	0.0048
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Clostridia_o_Clostridiales_f_Veillonellaceae_g_Megamonas	OSM	3.0453	<0.0001	0.0001
k_Bacteria_p_Bacteroidetes_c_Bacteroidia_o_Bacteroidales_f_Bacteroidaceae_g_Bacteroides	CO	4.8619	<0.0001	0.0005
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Bacilli_o_Lactobacillales_f_Streptococcaceae_g_Streptococcus	CO	3.9944	0.0010	0.0285
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Erysipelotrichi_o_Erysipelotrichales_f_Erysipelotrichaceae	CO	3.9013	<0.0001	0.0017
k_Bacteria_p_Bacteroidetes_c_Bacteroidia_o_Bacteroidales_f_Porphyrimonadaceae_g_Parabacteroides	CO	3.5003	0.0009	0.0272
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Bacilli_o_Bacillales_f_Staphylococcaceae_g_Staphylococcus	CO	3.3018	<0.0001	0.0011
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Bacilli_o_Turicibacterales_f_Turicibacteraceae_g_Turicibacter	CO	3.1212	<0.0001	0.0006
k_Bacteria_p_Firmicutes_c_Bacilli_o_Lactobacillales_f_Streptococcaceae_g_Lactococcus	CO	3.0615	0.0006	0.0199

El valor de *p* fue calculado mediante "Linear Discriminant Analysis Effect Size" (LEfSe) y los valores de *q* fueron calculados usando el test de Benjamini-Hochberg. OB (Obesidad), OSM (obesidad + síndrome metabólico) y CO (Control) indican las categorías fenotípicas.

**Tabla 9.** Predicción del contenido de los genes de las bacterias del colon entre los grupos con corrección de falsos positivos (FDR).

Vía metabólica	Control (%)	Obesidad (%)	Obesidad + Síndrome Metabólico (%)	<i>p</i>	<i>q</i>
Metabolismo de glicerolípidos	0.400 ±0.042	0.428 ±0.027	*0.433 ±0.021	0.0017	0.0044
Metabolismo de los lípidos	0.139 ±0.011	*0.145 ±0.006	*0.145 ±0.008	0.0178	0.0292
Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos	0.029 ±0.008	0.032 ±0.004	*0.034 ±0.007	0.0180	0.0293
Pantotenato y Biosíntesis de CoA	0.656 ±0.040	*0.688 ±0.022	0.686 ±0.025	0.0019	0.0047
Metabolismo de glicerofosfolípidos	0.572 ±0.033	*0.600 ±0.016	0.597 ±0.020	0.0009	0.0029
Amino azúcares y nucleótidos de azúcar	*1.527 ±0.105	1.441 ±0.046	1.440 ±0.062	0.0034	0.0073
Glicólisis/Gluconeogénesis	*1.141 ±0.046	1.121 ±0.018	1.115 ±0.019	0.0138	0.0241
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	*1.099 ±0.071	1.066 ±0.023	1.059 ±0.028	0.0010	0.0030
Metabolismo de piruvato	*1.066 ±0.060	1.052 ±0.035	1.050 ±0.031	0.0098	0.0177
Metabolismo de energía	*0.903 ±0.062	0.857 ±0.030	0.843 ±0.040	0.0003	0.0016
Biosíntesis de lípidos	*0.582 ±0.038	0.562 ±0.022	0.552 ±0.020	0.0064	0.0121
Biosíntesis de Lipopolisacárido	*0.190 ±0.113	0.110 ±0.051	0.102 ±0.048	0.0034	0.0073
Degradación de Glicosaminoglicano	*0.085 ±0.045	0.042 ±0.016	0.040 ±0.024	0.0000	0.0002
Metabolismo de Taurina e hipotaurina	*0.107 ±0.012	0.096 ±0.004	0.095 ±0.005	0.0003	0.0015
Vía de señalización de Adipocitoquina	*0.067 ±0.022	0.047 ±0.013	0.044 ±0.012	0.0005	0.0018
Diabetes tipo 2	*0.049 ±0.004	0.047 ±0.002	0.046 ±0.002	0.0017	0.0044

El % se informa como la media de las frecuencias relativas ± desviación estándar. El valor *p* se calculó usando Kruskal-Wallis H-Test, y el valor *q* se calculó usando la prueba FDR. Obesidad, obesidad + síndrome metabólico y control indica las categorías fenotípicas. Un asterisco (\*) indica el valor más alto entre los grupos.

**Tabla 10.** Determinación de la carga bacteriana y la abundancia de los fila principales en los grupos de estudio.

Filo	Ct Control	Ct Obesidad	Ct Obesidad + Síndrome Metabólico	<i>p</i>
Carga Bacteriana <sup>§</sup>	16.54 ± 3.36	17.24 ± 2.22	17.09 ± 1.10	0.646
Firmicutes	21.30 ± 2.35	20.76 ± 2.83	19.52 ± 1.95	0.053*
Bacteroidetes	24.90 ± 3.75	23.81 ± 4.11	24.20 ± 3.23	0.661

Ct se determinaron como se describe en la sección Métodos. Los valores de Ct se representaron con; \$ y se usaron para determinar la carga bacteriana con el cebador universal, los datos son el promedio de tres determinaciones independientes, ± desviación estándar, los valores p se obtuvieron usando la prueba ANOVA. \* Se realizó una prueba post hoc de Tukey después de ANOVA para identificar diferencias significativas entre un par de grupos; solo se encontró un valor de p significativo de 0.046 cuando se compararon los grupos Control y Obesidad + Síndrome Metabólico.

**Tabla 11.** Características generales de los sujetos de estudio.

	CO	PRE	DT2 No M	DT2 M	DT2 P	DT2 P+I	<i>p</i>
<i>Número de sujetos</i>	76	54	14	14	22	37	NA
<i>Genero (mujere/hombre)</i>	50/26	36/18	7/7	12/2	14/8	24/13	NA
<i>Edad (años)</i>	48.0±5.4	50.2±5.0	48.1±4.7	48.1±4.6	51.3±5.6	50.5±4.5	0.237
<b>Presión arterial</b>							
Sistólica (mm/Hg)	75.6± 8.3	77.9 ± 9.9	80.4±8.6	77.9±9.6	76.7±7.2	79.0±10.8	0.256
Diastólica (mm/Hg)	114.5±13.4	117.5±11.3	122.1±10.2	120.5±12.3	117.7±10.3	124.2±28.9	0.078
<b>Perfil Antropométrico</b>							
Peso (kg)	71.8 ±12.9	71.6±11.9	78.9±12.1	73.9±13.6	76.9±15.4	79.4±18.6	0.078
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 ± 3.7	28.4±4.1	30.8±4.6	30.1±4.8	30.3±5.0	31.5±7.8	0.012
Cintura (cm)	89.7±14.0	92.0±11.1	99.3±11.6	97.3±8.3	94.8±20.0	99.8±15.7	0.002
Grasa corporal (%)	29.60 ± 8.20 <sup>β</sup>	30.57±9.47 <sup>δ</sup>	30.82±10.80 <sup>†</sup>	34.04 ± 7.79 <sup>†</sup>	ND	ND	0.464
<b>Perfil Bioquímico</b>							
HA1c (%)	5.4 ± 0.2	5.9 ± 0.2	8.4±2.2	7.5±1.0	8.1± 2.7	9.4± 2.0	<0.001
Glucosa (mg/dl)	92.9 ± 10.1	97.2±11.0	199.3±108.4	148.6±40.9	147.7±68.7	186.6±77.5	<0.001
Colesterol (mg/dl)	195.6 ± 29.3	204.9±53.1	271.0±160.8	205.2±34.3	169.3±31.1 <sup>Ω</sup>	182.8±35.2 <sup>β</sup>	<0.001
Triglicéridos (mg/dl)	159.6 ± 89.9	154.2±63.2	274.2±191.0	226.6±125.3	148.7±51.1 <sup>Ω</sup>	206.3±104.6 <sup>β</sup>	0.002
HDL (mg/dl)	47.5 ± 10.2 <sup>€</sup>	47.6± 9.4 <sup>¥</sup>	46.9±8.6	45.7±9.5	40.0±7.5 <sup>Ω</sup>	42.0±8.6 <sup>π</sup>	0.005
LDL (mg/dl)	114.8 ± 26.2 <sup>£</sup>	127.4±51.4 <sup>¥</sup>	137.9±37.5 <sup>∞</sup>	115.5±29.5 <sup>α</sup>	102.2±28.2 <sup>Ω</sup>	105.3±27.9 <sup>π</sup>	0.019
<b>Perfil dietético</b>							
Kcal (kcal/day)	1903.3±678.0	2027.1±608.7	1983.0±610.8	1975.6±780.6	2487.3±811.4	2597.3±887.7	<0.001
Proteínas (g/day)	90.0±36.1	93.7±31.6	98.1±38.4	98.1±36.0	123.8±45.0	114.6±43.2	0.001
Lípidos (g/day)	65.3±29.0	66.6±30.1	63.1±24.9	65.5±23.7	88.5±34.2	92.1±38.5	<0.001
Carbohydrates (g/day)	241.8±94.8	262.8±79.2	256.0±105.4	248.4±122.1	294.2±115.4	317.0±110.4	0.021
Bebidas azúcar (g/day)	14.3±22.4	12.4±16.3	7.6±11.4	18.5±19.4	15.7±15.4	15.4±13.8	0.241
Azúcar (g/day)	43.8±37.6	34.2±23.9	18.2±18.7	18.5±27.6	30.0±28.9	24.8±23.3	0.011
<b>Actividad Física</b>							
MET's	2.4±2.1	2.1±1.9	1.8±0.7	1.4±0.6	1.8±1.3	2.1±2.7	0.526

Los resultados aparecen como promedio y ± desviación estándar. El valor *p* se calculó de acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis para datos no paramétricos y ANOVA para paramétricos. Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación - DT2 No M, DT2 Metformina - DT2 M, DT2 Polifarmacia - DT2 P, DT2 Polifarmacia + Insulina - DT2 P + I. ND = No determinado, NA = No corresponde. Lipoproteína de alta densidad - HDL, lipoproteína de baja densidad - LDL. β = 35 sujetos, δ = 36 sujetos, † = 14 sujetos, € = 61 sujetos, £ = 59 sujetos, ¥ = 45 sujetos, ∞ = 11 sujetos, α = 13 sujetos, Ω = 21 sujetos, π = 33 sujetos. Polifarmacia: agentes hipoglucemiantes y otros medicamentos como antihipertensivos e hipolipemiantes.

**Tabla 12.** Comparación de bacterias del colon con cambio en la abundancia y asociaciones con metadatos en relación a otros estudios.

Bacteria	Este estudio	Otros reportes	Referencias
<b>Filo Proteobacteria</b>			
<i>Sutterella</i> spp.	2 veces más abundante en DT2 No M que en los otros grupos (LEfSe)	<i>Sutterella</i> se encontró aumentada en personas de Dinamarca con prediabetes, en comparación con sujetos sanos.	[Allin <i>et al.</i> , 2017]
Familia Alcaligenaceae	2 veces más abundante en CO que en los otros grupos (LEfSe)	La presencia de la familia Alcaligenaceae (orden Burkholderiales) se ha reportado en el intestino de sujetos humanos sanos.	[Rajilic-Stojanovic <i>et al.</i> , 2007]
Familia Comamonadaceae	2 veces más abundante en PRE que en los otros grupos (LEfSe)	La familia Comamonadaceae se encontró > 3 veces regulada en obesos en comparación con los cerdos delgados.	[Newell-Fugate <i>et al.</i> , 2017]
<i>Pelomonas</i> spp.	3 veces más abundante en DT2 M que en los otros grupos (LEfSe)	Hay un dominio del 25% de <i>Pelomonas</i> spp. en la enfermedad de Crohn activa que en ninguna enfermedad de Crohn activa en muestras de heces de una población alemana.	[Schäffler <i>et al.</i> , 2016]
<i>Kaistobacter</i> spp.	Asociación Negativa con ingesta de lípidos (MaAsLin)	<i>Kaistobacter</i> spp. se incrementó en ratas con niveles más altos de apolipoproteína E que tiene un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas, especialmente en la regulación del metabolismo del colesterol total.	[Bo <i>et al.</i> , 2016]
<i>Erwinia</i> spp.	Asociación Negativa con presión arterial sistólica (MaAsLin)	Hubo una disminución en la abundancia del género <i>Erwinia</i> spp. en comparación con el grupo de control en niños mexicanos con obesidad.	[Muruguesan <i>et al.</i> , 2015]
<b>Filo Bacteroidetes</b>			
Orden Bacteroidales	4 veces más abundante en DT2 M que en los otros grupos (LEfSe)	Aunque Bacteroidales fue un orden abundante en la microbiota intestinal del modelo de rata para DT2 genético y enfermedad de hígado graso no alcohólico, no hubo asociación con ninguna variable del estudio.	[Shin <i>et al.</i> , 2017]
<i>Prevotella</i> spp.	Asociación positiva con género (MaAsLin). Es más abundante en DT2 > DT2 no M > PRE > CO	En un estudio chino <i>Prevotella</i> spp. fue 5 veces menos abundante en DT2 que en sujetos sanos (10 hombres y 6 mujeres).	[Wu <i>et al.</i> , 2010]
<b>Filo Acidobacteria</b>			
Orden Acidobacteriales Clase Acidobacteriia	2 veces más abundante en DT2 M que en los otros grupos (LEfSe)	Se ha reportado que el orden de los acidobacteriales se promueve su crecimiento en una variedad de azúcares, incluida la glucosa, como única fuente de carbono.	[Huber <i>et al.</i> , 2017]
<b>Filo Firmicutes</b>			
<i>Roseburia</i> spp.	2 veces más abundante en DT2 P y en DT2 P+I que en los otros grupos (LEfSe)	<i>Roseburia</i> spp. disminuyó en metagenomas DT2 de poblaciones chinas y europeas.	[Karlsson <i>et al.</i> , 2013]
<i>Oscillospira</i> spp.	3 veces más abundante en DT2 P y en DT2 P+I que en los otros grupos (LEfSe)	La abundancia relativa de <i>Oscillospira</i> spp. fue menor en el grupo con sobrepeso en comparación con el grupo de niños mexicanos con obesidad. La glucosa en ayunas fue normal en el grupo de obesidad.	[Muruguesan <i>et al.</i> , 2015]
<i>Dorea</i> spp.	Asociación negativa con actividad física (MaAsLin)	<i>Dorea longicatena</i> se correlacionó negativamente con los marcadores de resistencia a la insulina en mujeres posmenopáusicas y con obesidad de Dinamarca.	[Brahe <i>et al.</i> , 2015]
Familia Enterococcaceae.	Asociación negativa con grasa corporal y asociación positiva con edad (MaAsLin)	La familia Enterococcaceae se encontró 24 veces más abundante en el microbioma intestinal de ratones ejercitados en comparación con los ratones sedentarios.	[Choi <i>et al.</i> , 2013]

Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación – DT2 No M, DT2 Metformina – DT2 M, polifarmacia DT2 – DT2, polifarmacia DT2 + Insulina – DT2 P + I.

**Tabla 13.** Comparación entre pares de grupos de las características generales de los sujetos de estudio.

Grupo 1	Grupo 2	<i>p</i>	<i>q</i>
<b>Circunferencia de cintura (cm)</b>			
A) CO	C) T2D P	0.001	<0.001
<b>Ha1c (%)</b>			
A) CO	B) PRE	<0.001	<0.001
A) CO	C) T2D No M	<0.001	<0.001
A) CO	D) T2D Metformina	<0.001	<0.001
A) CO	E) T2D P	<0.001	<0.001
A) CO	F) T2D P+I	<0.001	<0.001
B) PRE	C) T2D No M	<0.001	<0.015
B) PRE	F) T2D P+I	<0.001	<0.001
<b>Glucosa (mg/dl)</b>			
A) CO	B) PRE	<0.001	<0.001
A) CO	C) T2D No M	<0.001	<0.001
A) CO	D) T2D Metformina	<0.001	<0.001
A) CO	E) T2D P	<0.001	<0.001
A) CO	F) T2D P+I	<0.001	<0.001
B) PRE	E) T2D P	<0.001	<0.010
B) PRE	F) T2D P+I	<0.001	<0.001
<b>Kcal (kcal/día)</b>			
A) CO	F) T2D P+I	<0.001	<0.001
A) CO	E) T2D P	<0.001	0.022
B) PRE	F) T2D P+I	<0.002	0.039
<b>Proteínas (g/día)</b>			
A) CO	E) T2D P	<0.001	0.011
A) CO	F) T2D P+I	<0.001	0.002
<b>Lípidos (g/día)</b>			
A) CO	F) T2D P+I	<0.001	0.001
A) CO	E) T2D P	0.002	0.043
B) PRE	F) T2D P+I	<0.001	0.007
<b>Carbohidratos (g/día)</b>			
A) CO	F) T2D P+I	0.001	<0.001
<b>Colesterol (mg/dl)</b>			
C) T2D No M	E) T2D P	0.001	<0.001
C) T2D No M	F) T2D P+I	<0.001	0.002
B) PRE	E) T2D P	<0.001	0.021
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>			
A) CO	F) T2D P+I	0.002	0.047
<b>HDL (mg/dl)</b>			
A) CO	E) T2D P	0.002	0.036
B) PRE	E) T2D P	0.002	0.037

El valor *p* se calculó de acuerdo con la prueba de ANOVA para datos paramétrico con Tukey como la prueba Post-Hoc de pensamiento de valor *q*. Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación – DT2 No M, DT2 Metformina – DT2 M, polifarmacia DT2 – DT2 P, polifarmacia DT2 + Insulina – DT2 P + I. Polifarmacia: agentes hipoglucemiantes y otros medicamentos como antihipertensivos e hipolipemiantes.

**Tabla 14.** Promedio de la abundancia relativa (%) entre los grupos de estudio a nivel de Filo.

Filo	A) CO	B) PRE	<i>p</i>	FDR	Bonferroni
Firmicutes	61.95	56.07	0.19	0.90	1
Bacteroidetes	33.21	40.41	0.13	0.88	1
Proteobacteria	3.34	2.42	0.45	0.97	1
Actinobacteria	1.16	0.82	0.56	0.98	1
	A) CO	C) DT2 No M	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	61.95	43.11	0.01	0.18	0.21
Bacteroidetes	33.21	53.18	0.01	0.18	0.36
Proteobacteria	3.34	2.79	0.78	1	1
Actinobacteria	1.16	0.76	0.57	1	1
	C) DT2 No M	B) PRE	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	43.11	56.07	0.09	0.90	1
Bacteroidetes	53.18	40.41	0.12	0.90	1
Proteobacteria	2.79	2.42	0.86	1	1
Actinobacteria	0.76	0.82	0.91	1	1
	A) CO	D) DT2 M	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	61.95	31.98	<0.01 ††	0.01	0.03 *
Bacteroidetes	33.21	64.74	<0.01 ††	0.01	0.03 *
Proteobacteria	3.34	2.65	0.73	1	1
Actinobacteria	1.16	0.51	0.24	0.86	1
	C) DT2 No M	D) DT2 M	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	43.11	31.98	0.20	1	1
Bacteroidetes	53.18	64.74	0.19	1	1
Proteobacteria	2.79	2.65	0.92	1	1
Actinobacteria	0.76	0.51	0.50	1	1
	E) DT2 P	F) DT2 P+I	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	66.83	62.35	0.46	1	1
Bacteroidetes	29.00	33.58	0.47	1	1
Proteobacteria	2.66	2.38	0.83	1	1
Actinobacteria	1.30	1.01	0.50	1	1
	D) DT2 M	F) DT2 P+I	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	31.98	62.35	<0.01 †	0.03	0.03 *
Bacteroidetes	64.74	33.58	<0.01 †	0.03	0.06
Proteobacteria	2.65	2.38	0.82	1	1
Actinobacteria	0.51	1.01	0.07	0.55	1
	C) DT2 No M	F) DT2 P+I	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	43.11	62.35	0.00	0.15	0.15
Bacteroidetes	53.18	33.58	0.01	0.22	0.45
Proteobacteria	2.79	2.38	0.73	1	1
Actinobacteria	0.76	1.01	0.42	1	1
	C) DT2 No M	E) DT2 P	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	43.11	66.83	0.01	0.12	0.18
Bacteroidetes	53.18	29.00	0.01	0.12	0.24
Proteobacteria	2.79	2.66	0.94	1	1
Actinobacteria	0.76	1.30	0.40	0.86	1
	E) DT2 P	D) DT2 M	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	66.83	31.98	<0.01 ††	0.01	0.03 *
Bacteroidetes	29.00	64.74	<0.01 ††	0.01	0.03 *
Proteobacteria	2.66	2.65	1.00	1	1
Actinobacteria	1.30	0.51	0.19	0.99	1
	A) CO	E) DT2 P	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	61.95	66.83	0.43	1	1
Bacteroidetes	33.21	29.00	0.48	1	1
Proteobacteria	3.34	2.66	0.70	1	1
Actinobacteria	1.16	1.30	0.86	1	1
	A) CO	F)DT2 P+I	P	FDR	Bonferroni

Firmicutes	61.95	62.35	0.95	1	1
Bacteroidetes	33.21	33.58	0.94	1	1
Proteobacteria	3.34	2.38	0.44	1	1
Actinobacteria	1.16	1.01	0.87	1	1
	D) DT2 M	B) PRE	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	31.98	56.07	<0.01 †	0.04	0.09
Bacteroidetes	64.74	40.41	<0.01 †	0.04	0.09
Proteobacteria	2.65	2.42	0.91	1	1
Actinobacteria	0.51	0.82	0.48	1	1
	B) PRE	E) DT2 P	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	56.07	66.83	0.09	0.71	1
Bacteroidetes	40.41	29.00	0.09	0.71	1
Proteobacteria	2.42	2.66	0.88	1	1
Actinobacteria	0.82	1.30	0.27	1	1
	B) PRE	F) DT2 P+I	P	FDR	Bonferroni
Firmicutes	56.07	62.35	0.22	1	1
Bacteroidetes	40.41	33.58	0.21	1	1
Proteobacteria	2.42	2.38	0.97	1	1
Actinobacteria	0.82	1.01	0.55	1	1

La prueba T no paramétrica fue medida entre la media de cada grupo, FDR y la corrección de Bonferroni, el valor de p para aceptar la hipótesis fue <0.05. FDR - Falsas tasas de descubrimiento. \* significa una diferencia estadística entre los grupos con valores p de Bonferroni. Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación – DT2 No M, DT2 Metformina – DT2 M, polifarmacia DT2 – DT2 P, polifarmacia DT2 + Insulina – DT2 P + I. Polifarmacia: agentes hipoglucemiantes y otros medicamentos como antihipertensivos e hipolipemiantes. † =  $p < 0.01$ , †† =  $p < 0.001$ .



**Tabla 15.** Comparaciones entre grupos sobre los índices de alfa diversidad.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1 promedio	Grupo 1 D.E	Grupo 2 promedio	Grupo 2 D.E	<i>p</i>
<b>Observadas</b>						
E) DT2 P	D) DT2 M	149.68	28.14	119.32	42.68	0.06
C) DT2 No M	E) DT2 P	135.36	34.83	149.68	28.14	0.34
A) CO	E) DT2 P	168.86	47.16	149.68	28.14	0.14
B) PRE	F) DT2 P+I	163.23	49.23	159.44	33.29	0.68
F) DT2 P+I	E) DT2 P	159.44	33.29	149.68	28.14	0.36
B) PRE	A) CO	163.23	49.23	168.86	47.16	0.56
C) DT2 No M	D) DT2 M	135.36	34.83	119.32	42.68	0.35
A) CO	D) DT2 M	168.86	47.16	119.32	42.68	0.02*
C) DT2 No M	A) CO	135.36	34.83	168.86	47.16	0.07
F) DT2 P+I	D) DT2 M	159.44	33.29	119.32	42.68	0.03*
B) PRE	E) DT2 P	163.23	49.23	149.68	28.14	0.38
B) PRE	D) DT2 M	163.23	49.23	119.32	42.68	0.02*
C) DT2 No M	B) PRE	135.36	34.83	163.23	49.23	0.14
F) DT2 P+I	A) CO	159.44	33.29	168.86	47.16	0.37
C) DT2 No M	F) DT2 P+I	135.36	34.83	159.44	33.29	0.10
<b>Chao1</b>						
E) DT2 P	D) DT2 M	311.94	65.96	234.37	90.72	0.02*
C) DT2 No M	E) DT2 P	256.40	62.40	311.94	65.96	0.04*
A) CO	E) DT2 P	348.33	111.18	311.94	65.96	0.28
B) PRE	F) DT2 P+I	333.09	108.89	327.85	72.00	0.80
F) DT2 P+I	E) DT2 P	327.85	72.00	311.94	65.96	0.54
B) PRE	A) CO	333.09	108.89	348.33	111.18	0.52
C) DT2 No M	D) DT2 M	256.40	62.40	234.37	90.72	0.52
A) CO	D) DT2 M	348.33	111.18	234.37	90.72	0.02*
C) DT2 No M	A) CO	256.40	62.40	348.33	111.18	0.02*
F) DT2 P+I	D) DT2 M	327.85	72.00	234.37	90.72	0.02*
B) PRE	E) DT2 P	333.09	108.89	311.94	65.96	0.55
B) PRE	D) DT2 M	333.09	108.89	234.37	90.72	0.02*
C) DT2 No M	B) PRE	256.40	62.40	333.09	108.89	0.03*
F) DT2 P+I	A) CO	327.85	72.00	348.33	111.18	0.47
C) DT2 No M	F) DT2 P+I	256.40	62.40	327.85	72.00	0.01*

### Shannon

E) DT2 P	D) DT2 M	5.22	0.76	4.65	0.90	0.21
C) DT2 No M	E) DT2 P	5.07	0.74	5.22	0.76	0.71
A) CO	E) DT2 P	5.53	0.87	5.22	0.76	0.29
B) PRE	F) DT2 P+I	5.46	0.89	5.48	0.65	0.92
F) DT2 P+I	E) DT2 P	5.48	0.65	5.22	0.76	0.32
B) PRE	A) CO	5.46	0.89	5.53	0.87	0.79
C) DT2 No M	D) DT2 M	5.07	0.74	4.65	0.90	0.31
A) CO	D) DT2 M	5.53	0.87	4.65	0.90	0.02*
C) DT2 No M	A) CO	5.07	0.74	5.53	0.87	0.18
F) DT2 P+I	D) DT2 M	5.48	0.65	4.65	0.90	0.02*
B) PRE	E) DT2 P	5.46	0.89	5.22	0.76	0.34
B) PRE	D) DT2 M	5.46	0.89	4.65	0.90	0.03*
C) DT2 No M	B) PRE	5.07	0.74	5.46	0.89	0.26
F) DT2 P+I	A) CO	5.48	0.65	5.53	0.87	0.81
C) DT2 No M	F) DT2 P+I	5.07	0.74	5.48	0.65	0.22

### Simpson

E) DT2 P	D) DT2 M	0.92	0.08	0.89	0.06	0.72
C) DT2 No M	E) DT2 P	0.92	0.04	0.92	0.08	0.80
A) CO	E) DT2 P	0.93	0.06	0.92	0.08	0.60
B) PRE	F) DT2 P+I	0.93	0.06	0.94	0.04	0.68
F) DT2 P+I	E) DT2 P	0.94	0.04	0.92	0.08	0.41
B) PRE	A) CO	0.93	0.06	0.93	0.06	0.89
C) DT2 No M	D) DT2 M	0.92	0.04	0.89	0.06	0.32
A) CO	D) DT2 M	0.93	0.06	0.89	0.06	0.20
C) DT2 No M	A) CO	0.92	0.04	0.93	0.06	0.74
F) DT2 P+I	D) DT2 M	0.94	0.04	0.89	0.06	0.06
B) PRE	E) DT2 P	0.93	0.06	0.92	0.08	0.60
B) PRE	D) DT2 M	0.93	0.06	0.89	0.06	0.19
C) DT2 No M	B) PRE	0.92	0.04	0.93	0.06	0.70
F) DT2 P+I	A) CO	0.94	0.04	0.93	0.06	0.65
C) DT2 No M	F) DT2 P+I	0.92	0.04	0.94	0.04	0.37

Los resultados aparecen como media y  $\pm$  desviación estándar – D.E. El valor P se calculó para comparar las diversidades alfa basadas en una prueba t de dos muestras utilizando métodos no paramétricos y el número predeterminado de permutaciones de Monte Carlo para encontrar significados diferentes entre los grupos. Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación – DT2 No M, DT2 Metformina – DT2 M, polifarmacia DT2 – DT2 P, polifarmacia DT2 + Insulina – DT2 P + I. Polifarmacia: agentes hipoglucemiantes y otros medicamentos como antihipertensivos e hipolipemiantes.\*, significa diferencias significativas entre pares de grupos.

**Tabla 16.** Comparaciones entre grupos de la Beta diversidad usando el método ANOSIM.

Grupo 1	Grupo 2	Muestras	Grupos	<i>p</i>
Todos	NA	217	6	0.01
A) CO	C) DT2 No M	90	2	0.01
A) CO	D) DT2 M	90	2	0.01
A) CO	E) DT2 P	98	2	0.13
A) CO	F) DT2 P+I	113	2	0.38
A) CO	B) PRE	130	2	0.39
D) DT2 M	C) DT2 No M	28	2	0.23
C) DT2 No M	B) PRE	68	2	0.04
E) DT2 P	C) DT2 No M	36	2	0.01
E) DT2 P	D) DT2 M	36	2	0.02
F) DT2 P+I	D) DT2 M	51	2	0.01
F) DT2 P+I	C) DT2 No M	51	2	0.01
F) DT2 P+I	E) DT2 P	59	2	0.13
B) PRE	D) DT2 M	68	2	0.01
B) PRE	E) DT2 P	76	2	0.17
B) PRE	F) DT2 P+I	91	2	0.37

El valor *p* se calculó para comparar las diversidades beta. El método ANOSIM es una prueba no paramétrica. Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación – DT2 No M, DT2 Metformina – DT2 M, polifarmacia DT2 – DT2 P, polifarmacia DT2 + Insulina – DT2 P + I. Polifarmacia: agentes hipoglucemiantes y otros medicamentos como antihipertensivos e hipolipemiantes. NA - No aplica.

**Tabla 17.** Enriquecimiento bacteriano en cada grupo de estudio con el análisis de LfSe con el test de corrección de Benjamini-Hochberg.

Taxonomía jerárquica	Grupo de enriquecimiento	valor LDA	p	q
Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria	A) CO	2.90	<0.0001	0.0002
Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales	A) CO	2.90	<0.0001	0.0002
Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Alcaligenaceae	A) CO	2.89	<0.0001	0.0002
Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Comamonadaceae	B) PRE	2.07	0.0004	0.0072
Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Alcaligenaceae Sutterella	C) DT2 No M	2.85	<0.0001	0.0004
Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Comamonadaceae Pelomonas	D) DT2 M	2.61	<0.0001	<0.0001
Bacteria Bacteroidetes Bacteroidia	D) DT2 M	4.43	0.0001	0.0013
Bacteria Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales	D) DT2 M	4.43	0.0001	0.0013
Bacteria Acidobacteria Acidobacteriia Acidobacteriales Koribacteraceae	D) DT2 M	2.78	0.0013	0.0243
Bacteria Acidobacteria Acidobacteriia	D) DT2 M	2.58	0.0013	0.0243
Bacteria Acidobacteria Acidobacteriia Acidobacteriales	D) DT2 M	2.74	0.0013	0.0243
Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae Oscillospira	E) DT2 P y DT2 P+I	3.03	0.0001	0.0018
Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Roseburia	E) DT2 P y DT2 P+I	2.94	0.0001	0.0022

El valor de p se calculó usando el análisis de tamaño de efecto discriminante lineal (LEfSe), y el valor q se calculó usando la prueba de Benjamini-Hochberg. Control - CO, Prediabetes - PRE, DT2 Sin medicación – DT2 No M, DT2 Metformina – DT2 M, polifarmacia DT2 – DT2 P, polifarmacia DT2 + Insulina – DT2 P + I. Polifarmacia: agentes hipoglucemiantes y otros medicamentos como antihipertensivos e hipolipemiantes. El orden de la jerarquía taxonómica fue: k\_-reino, p\_-Filo, c-clase, o\_-orden, f\_-familia y g-géneros.

**Tabla 18.** Taxones bacterianos ligados significativamente a parámetros clínicos, antropométricos, dietéticos y bioquímicos.

Taxonomía jerárquica	Variable	Coefficiente	<i>p</i>	<i>q</i>
<b><i>n=217</i></b>				
Bacteria Firmicutes Bacilli Lactobacillales Enterococcaceae	Edad	0.0004	0.0001	0.0870
Bacteria Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Paraprevotellaceae Prevotella	Genero	0.0574	0.0002	0.0870
Bacteria Proteobacteria Alphaproteobacteria Sphingomonadales Sphingomonadaceae Kaistobacter	Ingesta de Lípidos	-0.0001	0.0001	0.0870
Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Erwinia	Presión sistólica	-0.0001	0.0005	0.1692
<b><i>n=99</i></b>				
Bacteria Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Dorea	Actividad Física	-0.1123	0.0001	0.2093
Bacteria Firmicutes Bacilli Lactobacillales Enterococcaceae	Grasa corporal	-0.0021	0.0004	0.2093
Bacteria Fusobacteria Fusobacteriia Fusobacteriales Fusobacteriaceae Fusobacterium	Peso	-0.0003	0.0004	0.2093

El valor de *p* se calculó utilizando el algoritmo de asociación multivariada con modelos lineales (MaAsLin), y el valor *q* se calculó utilizando FDR para el valor de *p* corregido. El orden de la jerarquía taxonómica fue: k\_-reino, p\_-Filo, c-clase, o\_-orden, f\_-familia y g-géneros. PA sistólica - presión arterial sistólica.

**Tabla 19.** Vías metabólicas de la microbiota intestinal entre el grupo de pacientes con prediabetes y DT2 con Metformina.

Vía metabólica	B) PRE (%)	D) DT2 M (%)	<i>p</i>	<i>q</i>
Metabolismo de energía	0.944	*0.998	0.006	0.040
<b><i>Metabolismo de carbohidratos</i></b>				
Metabolismo de amino azúcares	1.481	*1.617	0.002	0.031
Metabolismo de Propanoato	*0.494	0.446	0.007	0.042
<b><i>Metabolismo de aminoácidos</i></b>				
Metabolismo de Glicina, serina y treonina	0.833	*0.890	0.003	0.033
<b><i>Metabolismo de lípidos</i></b>				
Metabolismo de esfingolípidos	0.238	*0.313	0.005	0.037
<b><i>Metabolismo y Biosynthesis de glicano</i></b>				
Biosíntesis de lipopolisacárido	0.229	*0.400	0.007	0.042
<b><i>Metabolismo y Biodegradación de Xenobióticos</i></b>				
Degradación de Benzoato	*0.212	0.167	0.008	0.046
Degradación de Atrazina	*0.013	0.008	0.002	0.029
Degradación de Dioxina	*0.053	0.036	0.003	0.032
Degradación de Xileno	*0.051	0.035	0.004	0.033
Degradación de Estireno	*0.019	0.013	0.003	0.031

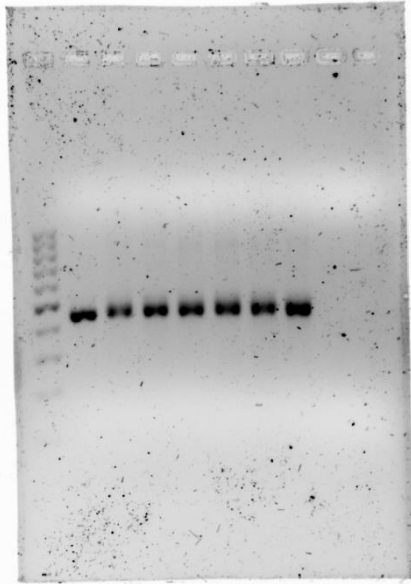
El % se informa como la media de las frecuencias relativas  $\pm$  desviación estándar. El valor *p* se calculó usando la prueba *t* de Welch, y el valor *q* se calculó usando Benjamini-Hochberg, como la prueba FDR. Prediabetes - PRE, DT2 Metformina - DT2 M. Un asterisco (\*) indica el valor más alto entre los grupos.

### 13. Lista de Figuras

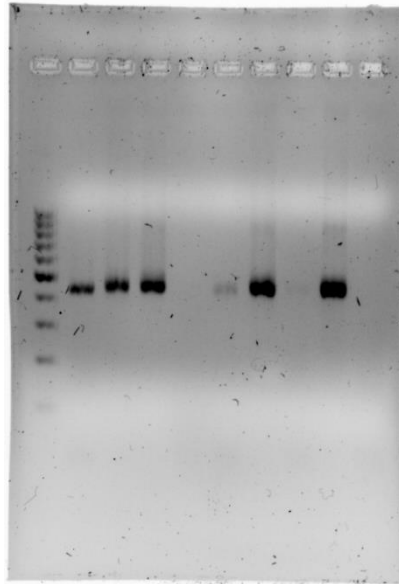
<b>Figuras Sección 1.</b> Imágenes de geles de agarosa al 1.5%, muestran los productos de PCR de diagnóstico del gen 16S rDNA en muestras de copro de pacientes con OB, OSM y CO.	104
<b>Figuras Sección 2.</b> Imágenes de los geles para la construcción de genotecas 16S rDNA por PCR en geles de agarosa al 1.5% con asignación de barcodes en grupos OB, OSM y CO.	107
<b>Figuras Sección 3.</b> Imágenes de los geles de agarosa al 0.5% para identificar DNA genómico De muestras ISSSTE.	109
<b>Figuras Sección 4.</b> Imágenes de los geles de agarosa al 1.5% para identificar el DNA con Barcodes de las muestras del ISSSTE.	111
<b>Figuras Sección 5.</b> Imágenes de geles de agarosa al 0.5% para identificar DNA genómico de muestras INPer.	116
<b>Figuras Sección 6.</b> Imágenes de los geles de agarosa al 1.5% para identificar el DNA con Barcodes de las muestras del INPer.	118
<b>Figura 1.</b> Abundancia relativa de Fila bacterianos de la microbiota del colon de los Participantes.	123
<b>Figura 2.</b> Diversidad bacteriana en peso normal, obesidad y síndrome metabólico.	124
<b>Figura 3.</b> Diversidad alfa bacteriana.	125
<b>Figura 4.</b> Diversidad beta bacteriana.	126
<b>Figura 5.</b> Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) para las comunidades Bacterianas.	127
<b>Figura 6.</b> Predicción comparativa del genoma funcional de la microbiota bacteriana intestinal.	128
<b>Figura 7.</b> Abundancia de Filo bacteriano en la microbiota de los 6 grupos de estudio.	129
<b>Figura 8.</b> Diversidad alfa bacteriana.	130
<b>Figura 9.</b> Diversidad beta bacteriana.	131
<b>Figura 10.</b> Gráfico del Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) para las comunidades bacterianas.	132
<b>Figura 11.</b> Asociación multivariada de la microbiota intestinal con todas las variables medidas usando MaAsLin.	133
<b>Figura 12.</b> Predicción comparativa del genoma funcional de la microbiota bacteriana intestinal.	134

**Figuras Sección 1.** Imágenes de geles de agarosa al 1.5%, muestran los productos de PCR de diagnóstico del gen 16S rDNA en muestras de copro de pacientes con OB, OSM y CO.

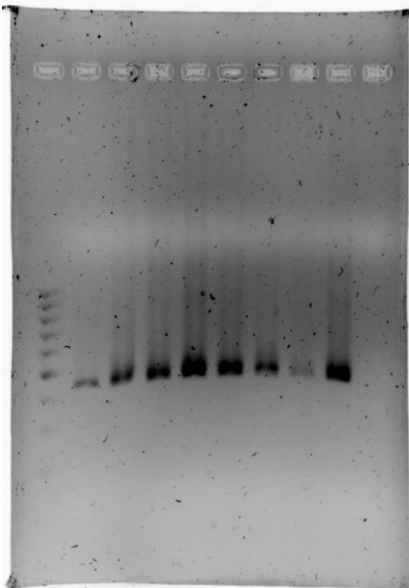
L + 1 2 3 4 5 6 7 -



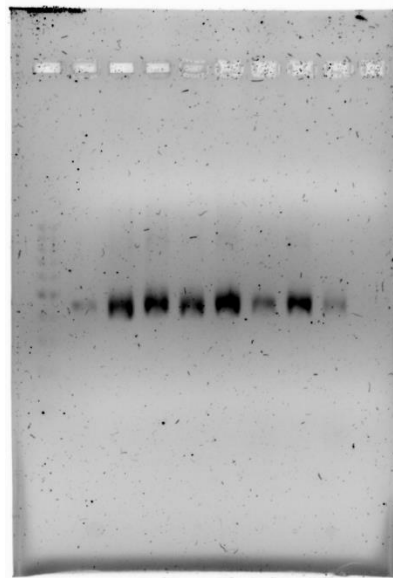
L + 8 9 10 11 12 13 14 -



L + 15 16 17 18 19 20 21 -

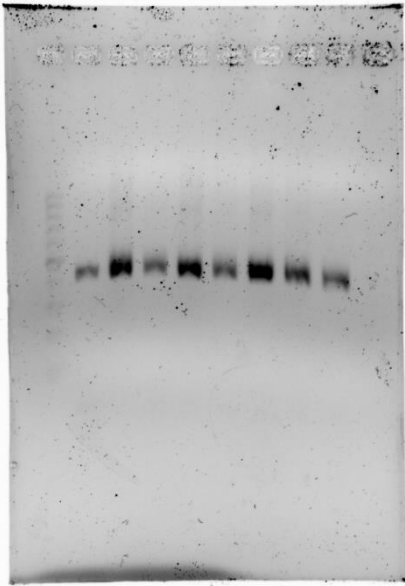


L + 22 23 24 25 26 27 28 -

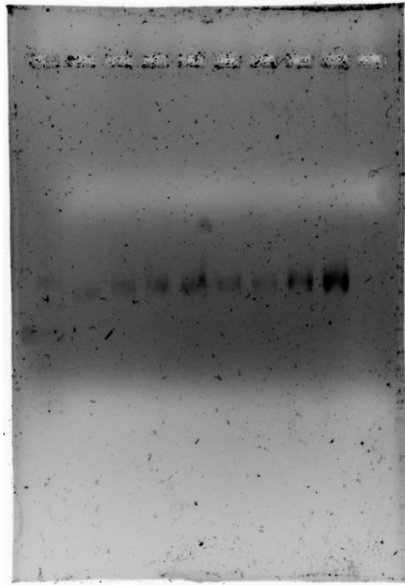




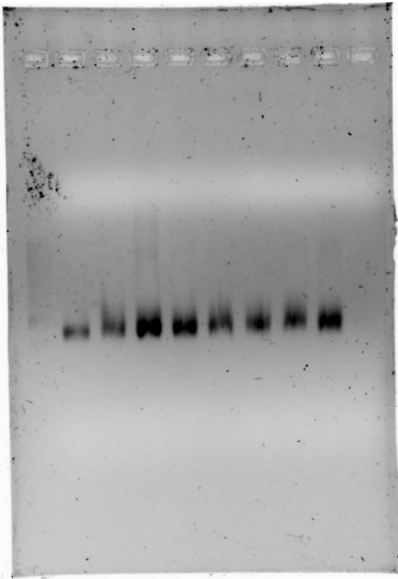
L + 29 30 31 32 33 34 35 -



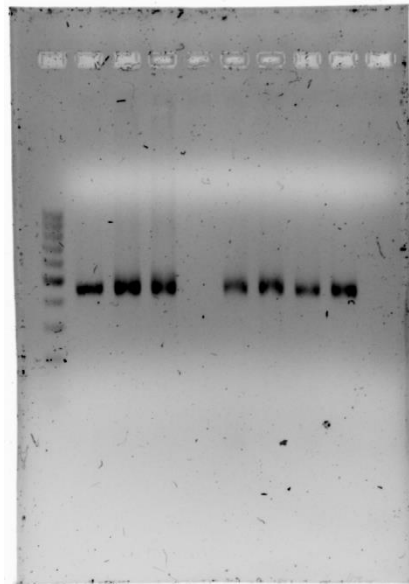
L + 36 37 38 39 40 41 42 -



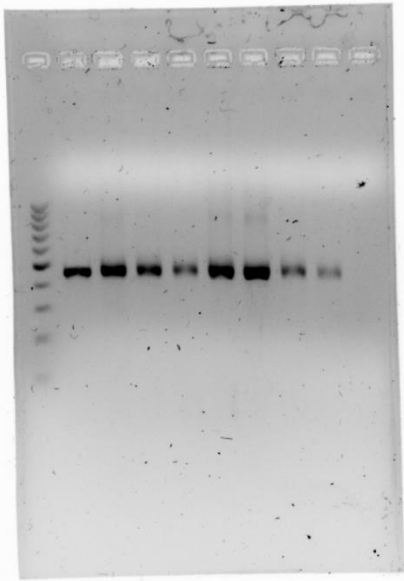
L + 43 44 45 46 47 48 49 -



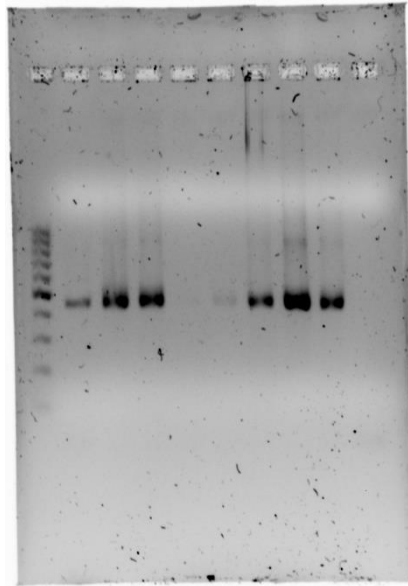
L + 50 51 52 53 54 55 56 -



L + 57 58 59 60 61 62 63 -

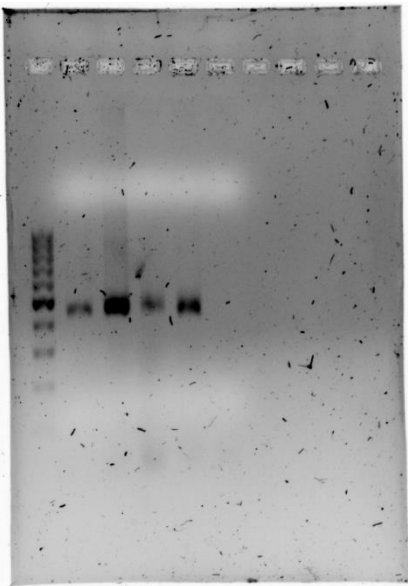


L + 64 65 66 67 68 69 70 -

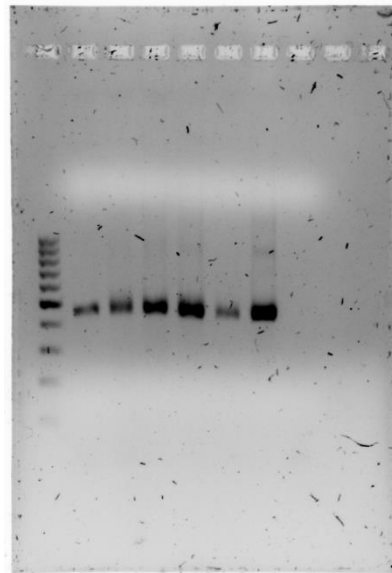


Repeticiones:

L + 38 60 35 -

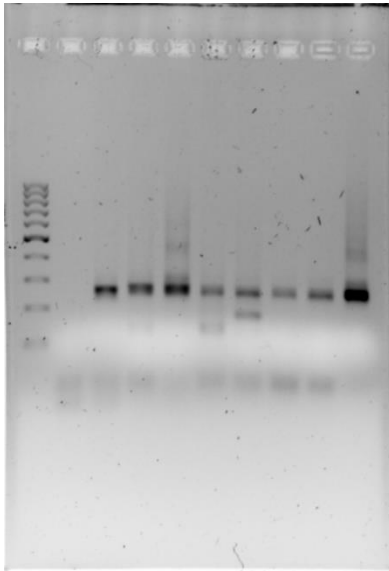


L + 71 38 29 41 21 -

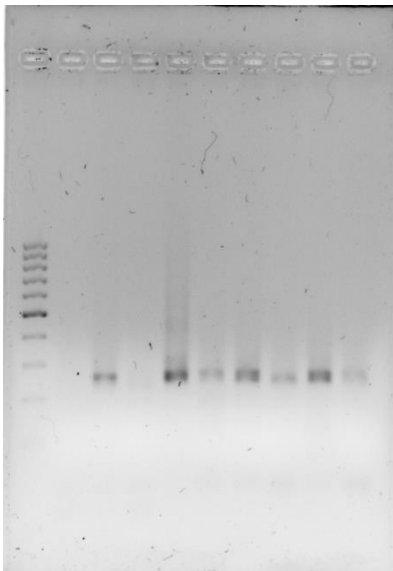


**Figuras Sección 2.** Imágenes de los geles para la construcción de genotecas 16S rDNA por PCR en geles de agarosa al 1.5% con asignación de Barcodes de pacientes con OB, OSM y CO

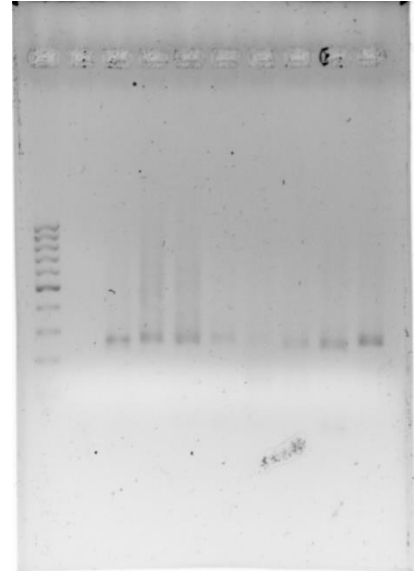
M-(-)(+)-1B1-2B2-3B3-4B4-5B5-6B6-7B7



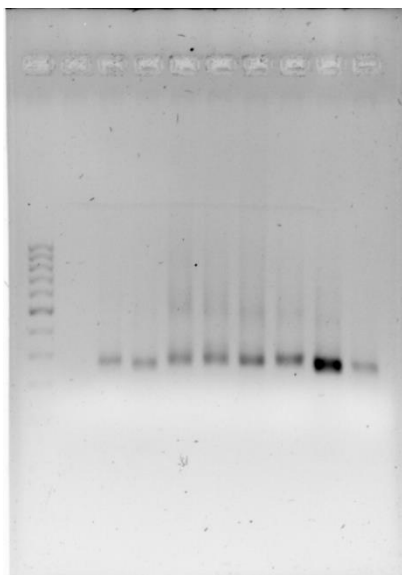
M-(-)(+)-8B8-9B9-10B10-11B11-12B12-13B13-14B14



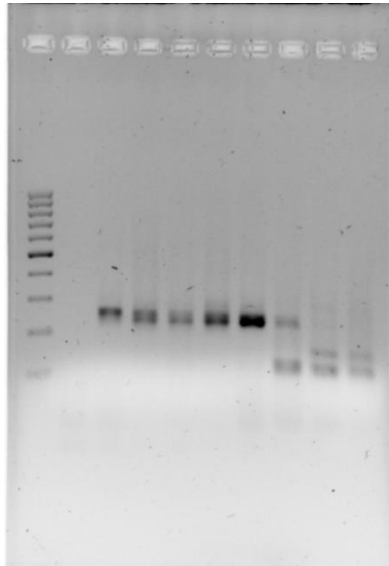
M-(-)(+)-15B15-16B16-17B17 18B18-19B19-20B20-21B21



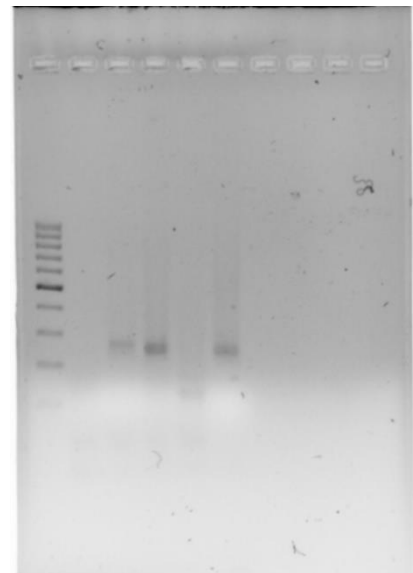
M-(-)(+)-22B22-23B23-24B24-25B25-26B26-27B27-28B28



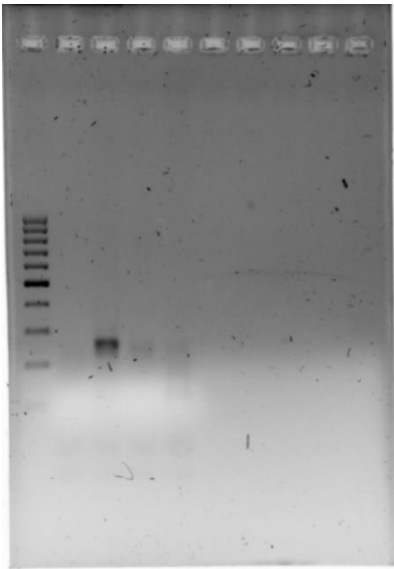
M-(-)(+)-29B29-30B30-31B31-32B32-33B33-35B35-36B36



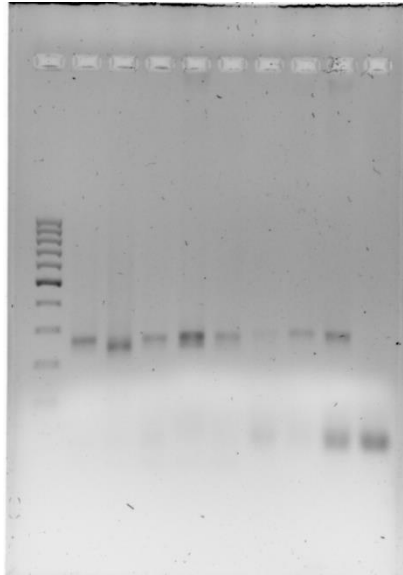
M-(-)(+)-33B33-35B35-36B36



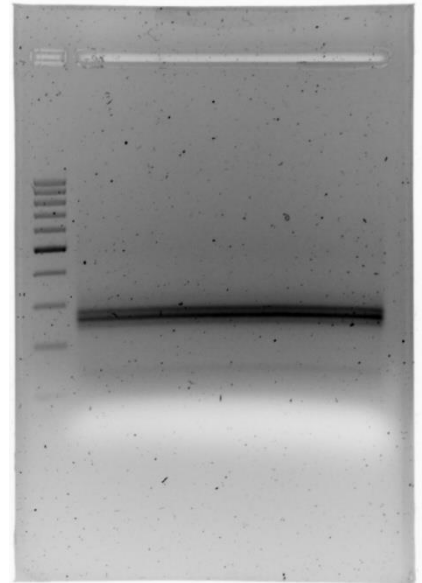
M-(b35)-(b35)-35B35-MuestraX



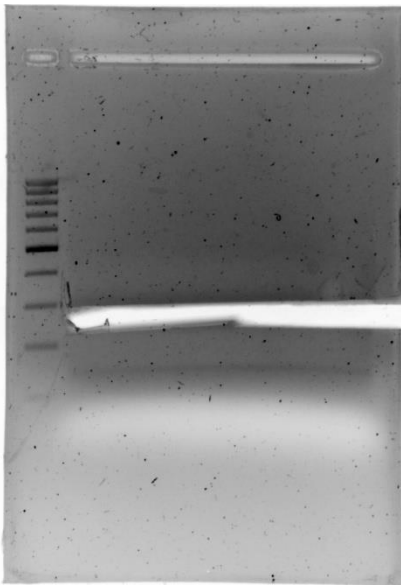
(+)-37B37-43B43-44B44-45B45-48B48-49B49-50B50-(-)



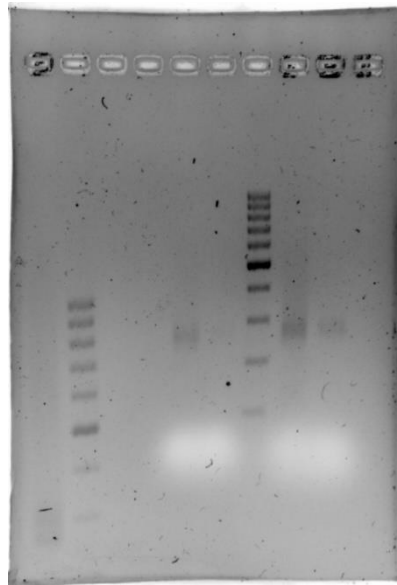
100PB ONMA POOL



AFTER CUT 100PB ONMA POOL INV

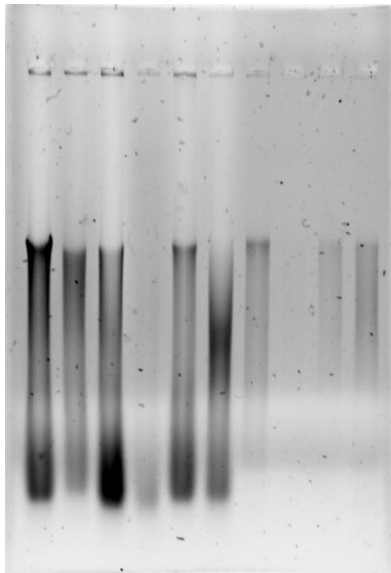


BR-YAIR POOL BR-YAIR PURE 100PB ONMA POOL ONMA PURE

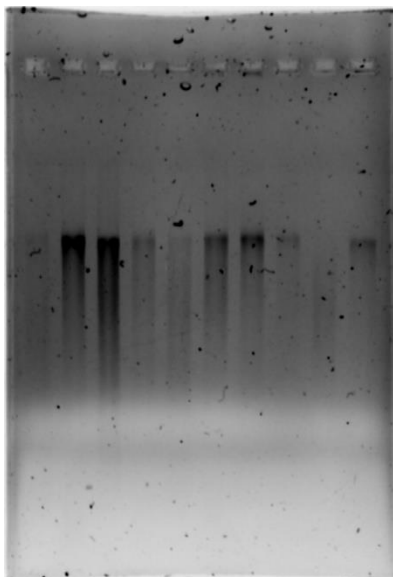


**Figuras Sección 3.** Imágenes de los geles de agarosa al 0.5% para identificar DNA genómico de muestras ISSSTE.

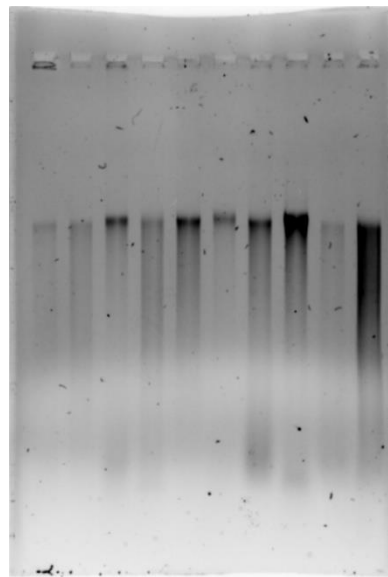
1-2-3-4-5-6-7-8-9-10



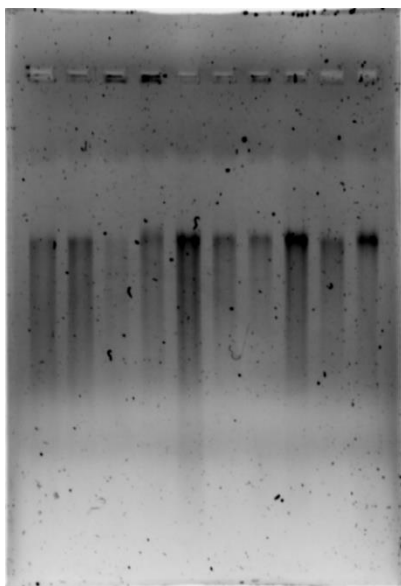
11-12-13-14-15-16-17-18-19-20



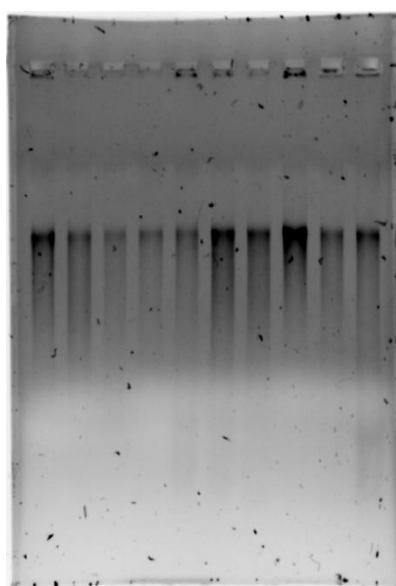
21-22-23-24-25-26-27-28-29-30



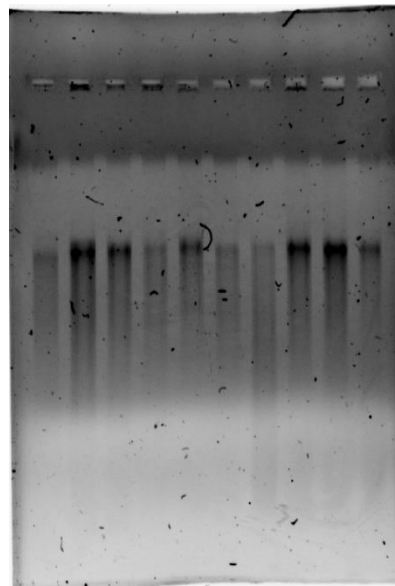
31-32-33-34-35-36-37-38-39-40



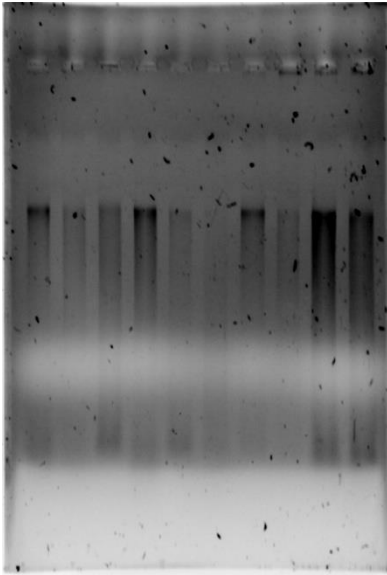
41-42-43-44-45-46-47-48-49-50



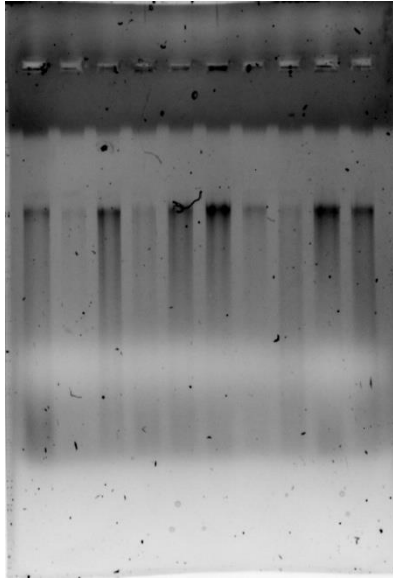
51-52-53-54-55-56-57-58-59-60



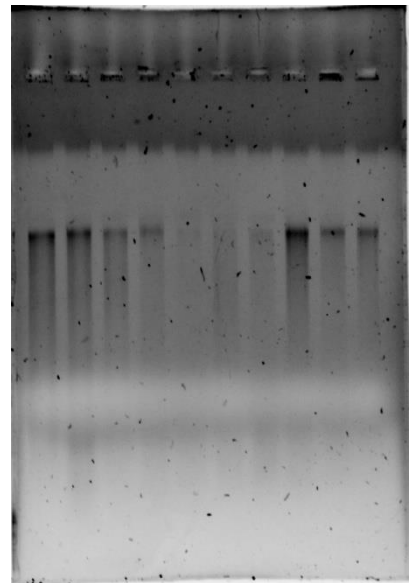
61-62-63-64cont-1-2-3-4-5-6 caso



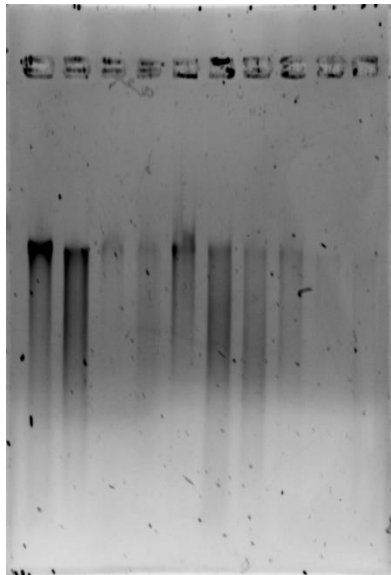
7-8-9-10-11-12-13-14-15-16 CASOS



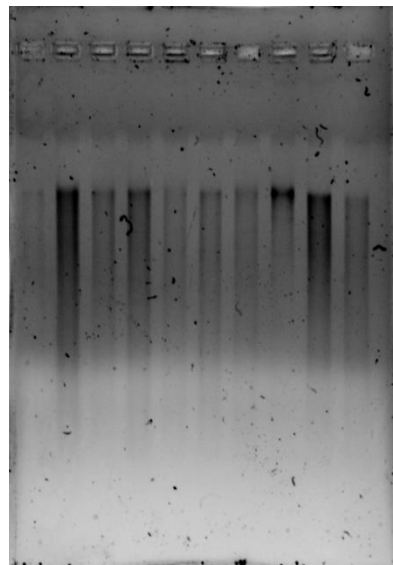
17-18-19-20-21-22-23-24-25-26 CASOS



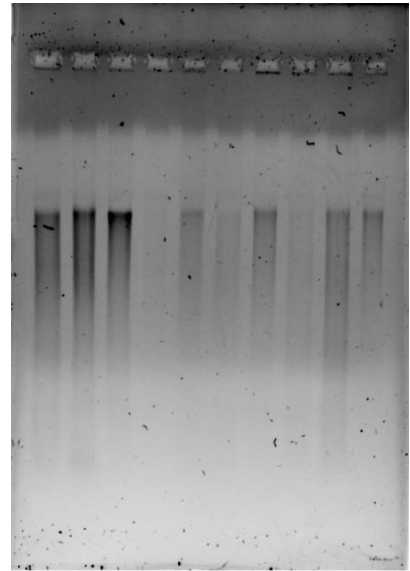
27-28-29-30-31-32-33-34-35-36 CASOS



37-38-39-40-41-42-43-44-45-46 CASOS

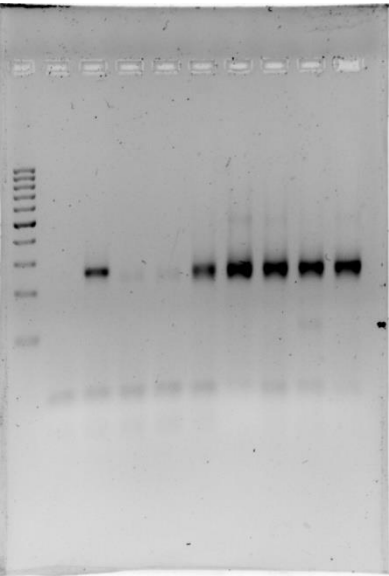


48-49-50-51-52-54-55-56-57-58 CASOS

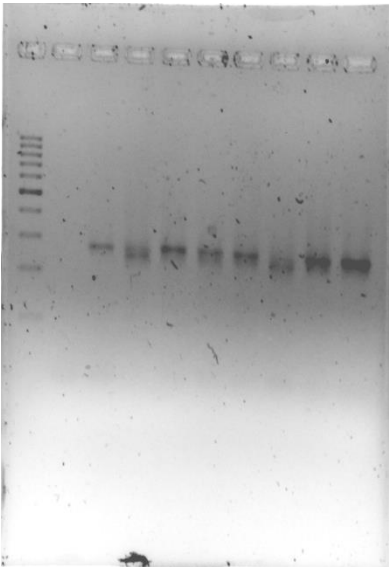


**Figuras Sección 4.** Imágenes de los geles de agarosa al 1.5% para identificar el DNA con barcodes de las muestras del ISSSTE.

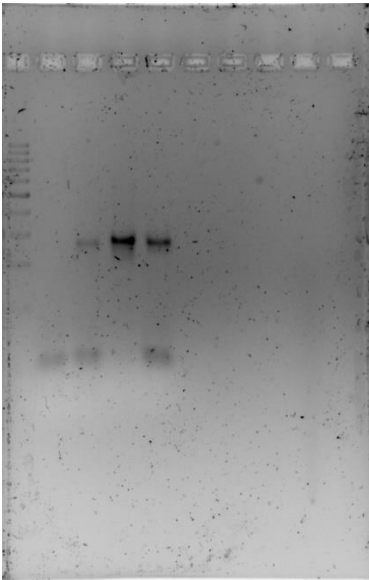
L,-,+,5DILb2,5b2,1b1,2b4,3b5,4b24,5b25



L,-,+,6b29,7b37,8b38,9b45,10b46,11b47,12b48



L,-,+,13b48,lactipanb50

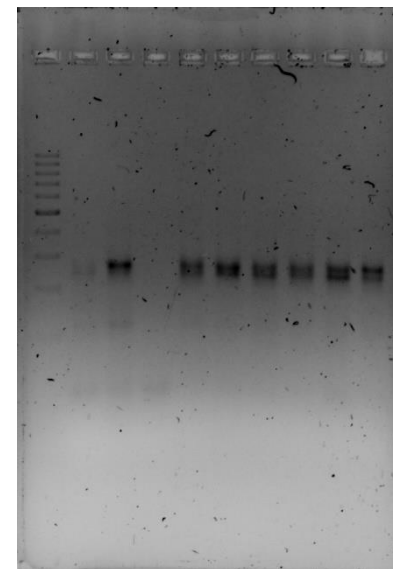
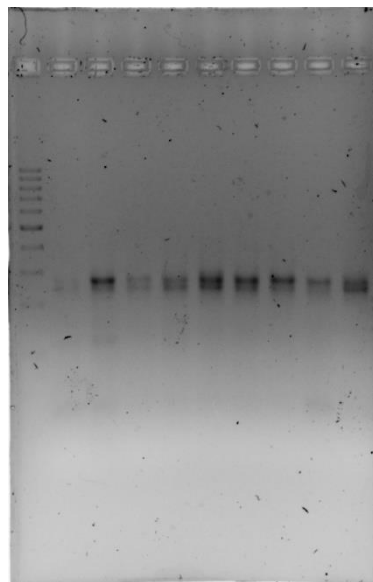
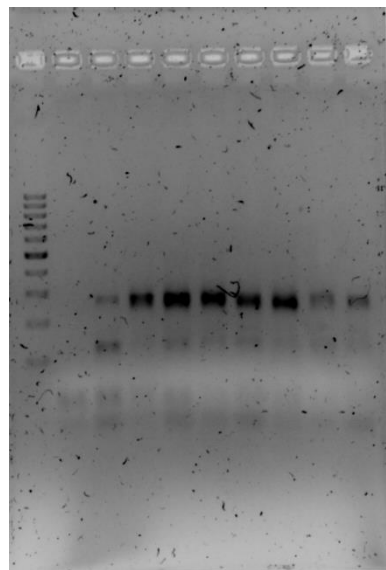
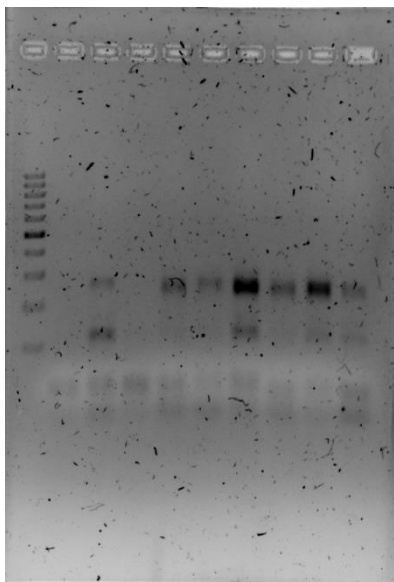


L,-,+,14b1,15b2,16b3,17b4,18b5,19b6,20b7

L,-,+,21b8,22b9,23b10,24b11,25b12,26b13,27b14

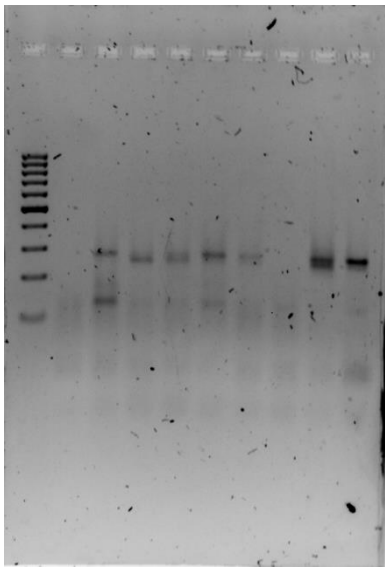
L,,+,28b15,29b16,30b17,31b18,32b19,33b20,34b21

L,,+,35b22,36b23,37b24,38b25,39b26,40b27,41b28

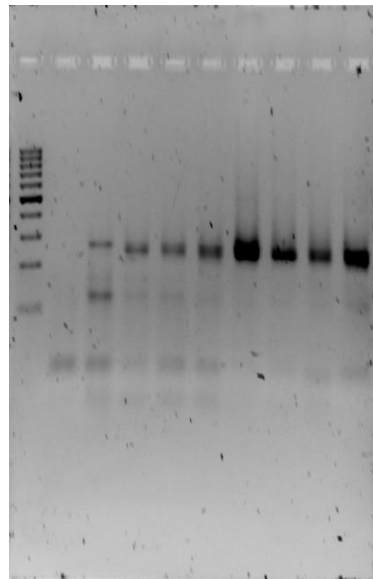




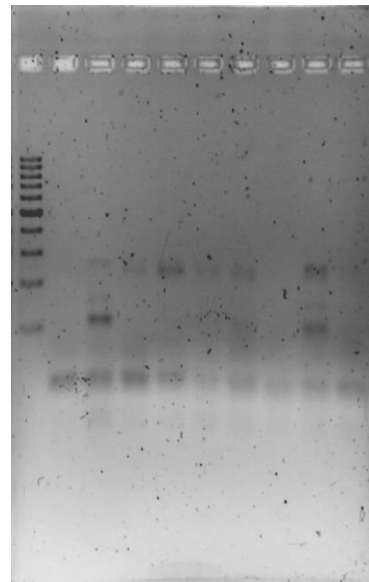
L,-,+,42b29,43b30,44b31,45b32,46b33,47b34,48b35



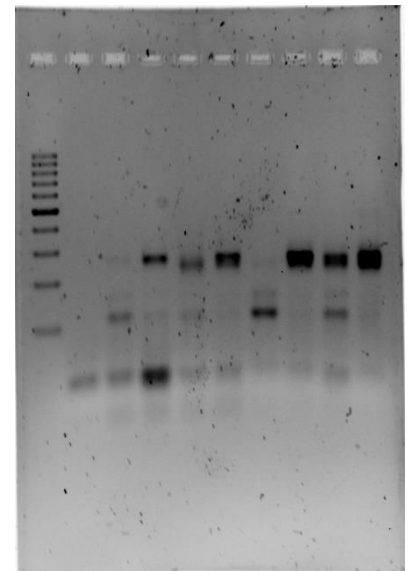
L,-,+,49b36,50b37,51b38,52b39,53b40,54b41,55b42



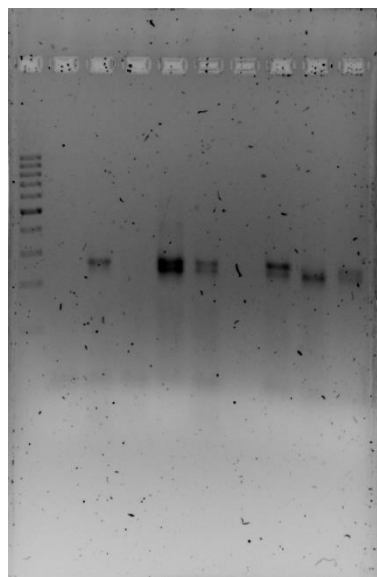
L,-,+,56b43,57b44,58b45,59b46,60b47,61b48,62b49



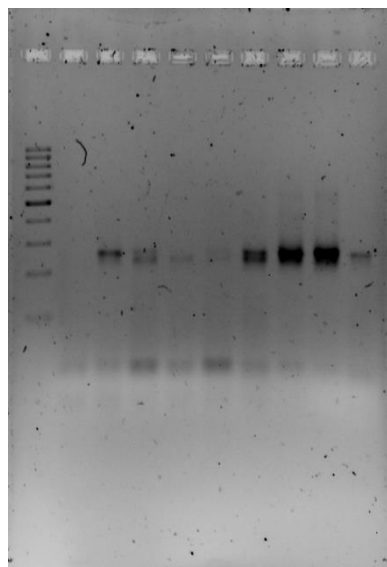
L,-,+,Lactipanb50,63b1,64b2,1b3,2b4,3b5,4b6



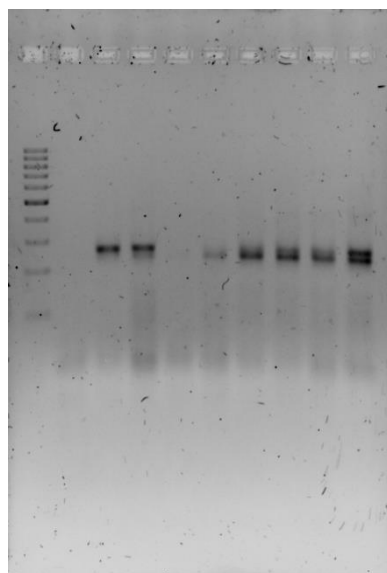
L,-,+,5b13,6b14,7b15,8b16,9b17,10b18,11b19



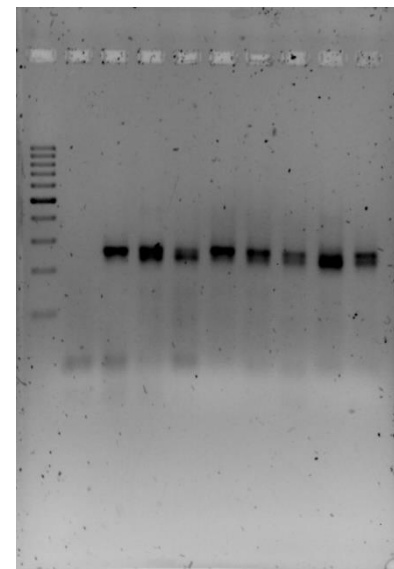
L,-,+,12b20,13b21,14b22,15b23,16b24,17b25,18b26



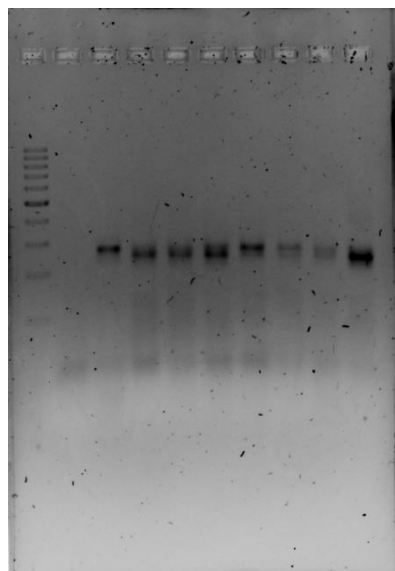
L,-,+,19b27,20b28,21b29,22b30,23b31,24b32,25b33



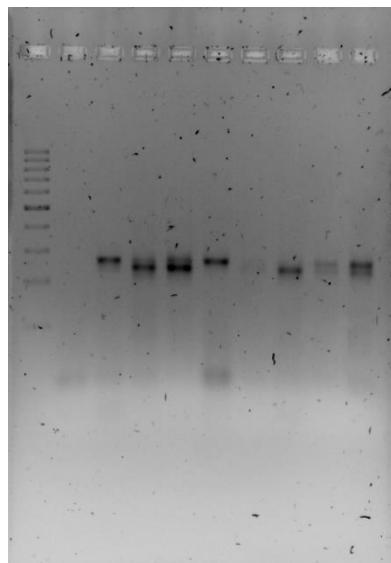
L,-,+,26b34,27b35,28b36,29b37,30b38,31b39,32b40



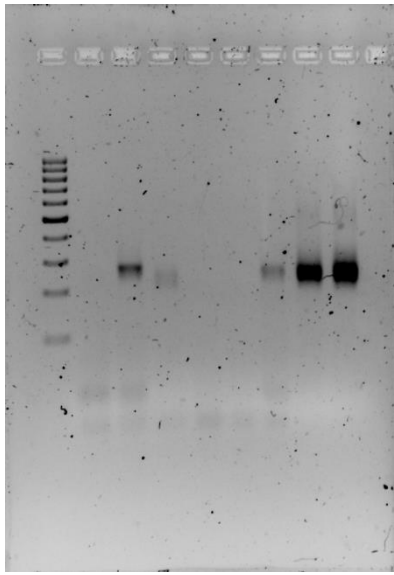
L,-,+,33b41,34b42,35b43,36b44,37b45,38b46,39b47



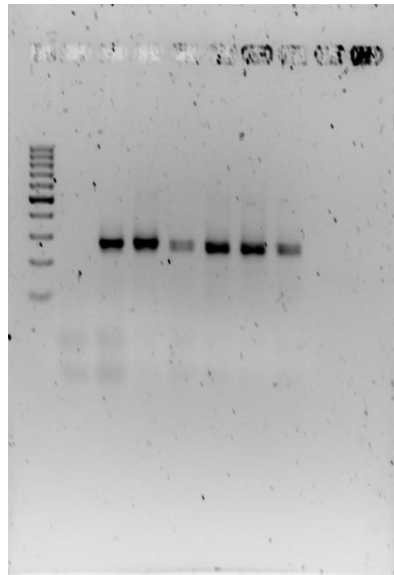
L,-,+,40b48,41b49,lactipanb50,42b1,43b2,44b3,45b4



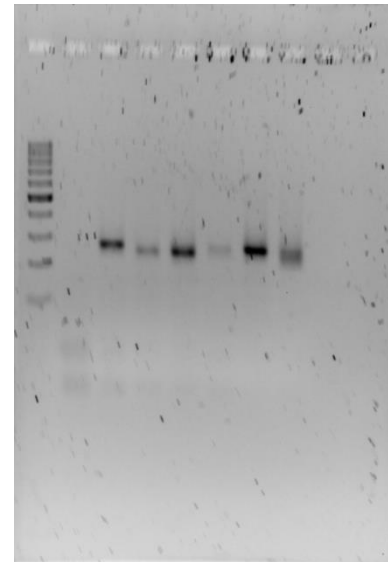
L,-,+,CONTdil10ng60b47,CONT20ng60b47,CONT100ngb47,



L,-,+,50b8,51b9,52b10,54b11,55b12,vacios ISSSTE-CASOS

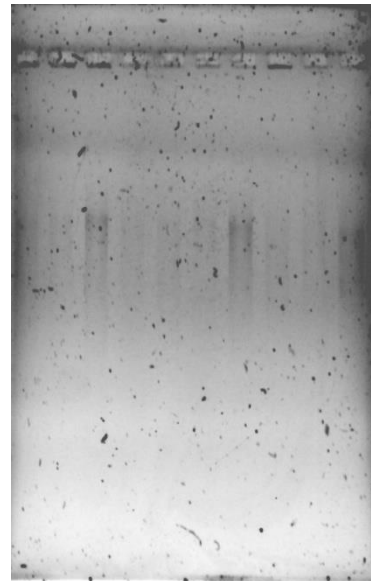
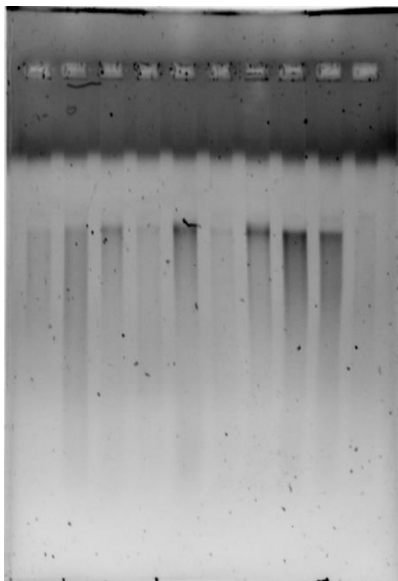
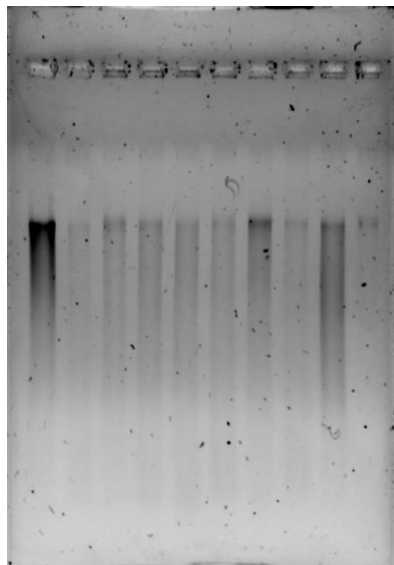


L,-,+,56b13,57b14,58b15,59b16,60b17,vacios ISSSTE-CASOS

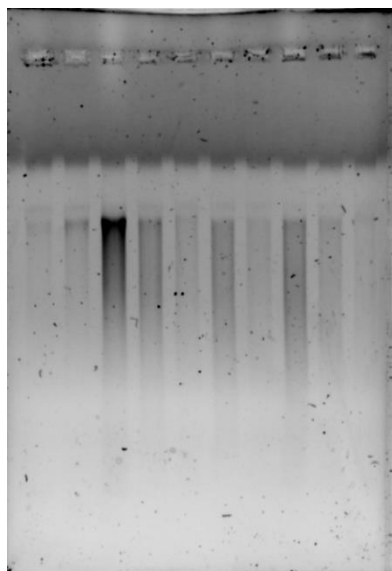


**Figuras Sección 5.** Imágenes de los geles de agarosa al 0.5% para identificar DNA genómico de muestras INPer.

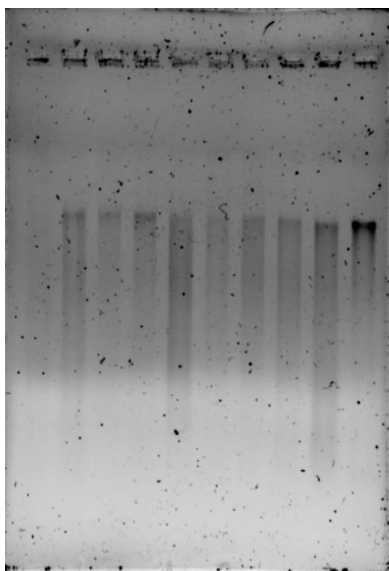
59-ISSSTE CASO-1-2-3-4-5-6-7-8-9-INPER CONT 5-10-11-12-13-14-15-17RJC-17EOC-18 CONT 19-20-21-22-23-24-25-26-27-28 CONT



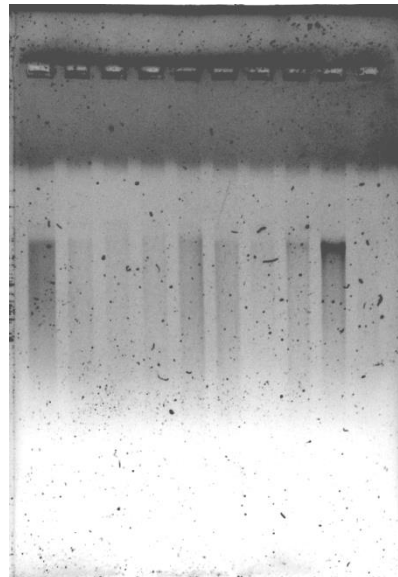
29-30-32-33-34-35-36-37-38-39 CONT



40-41-42-43-44-45-46-47-48-49 CONT



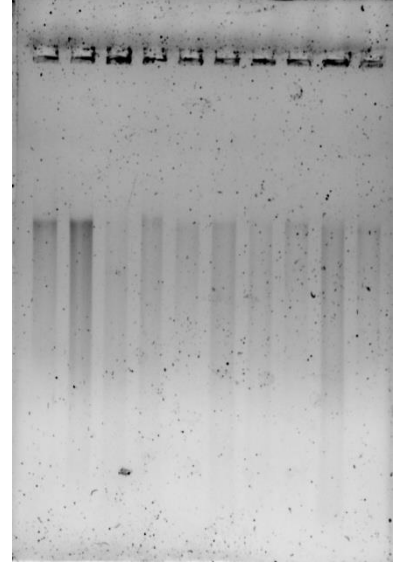
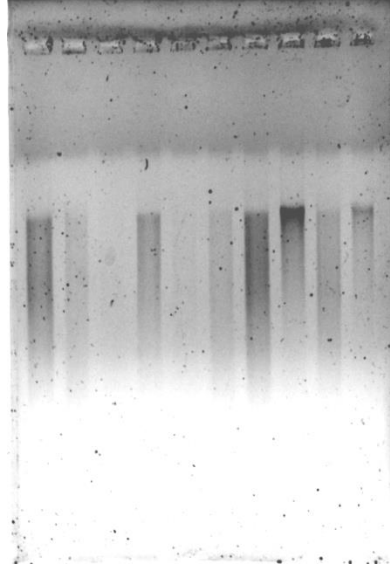
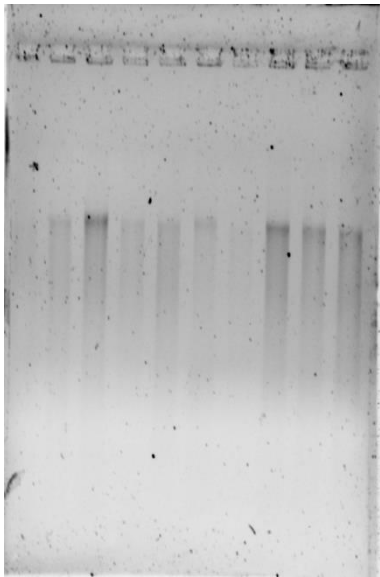
50-51-52-53-55-56-57-58-59-60 CONT



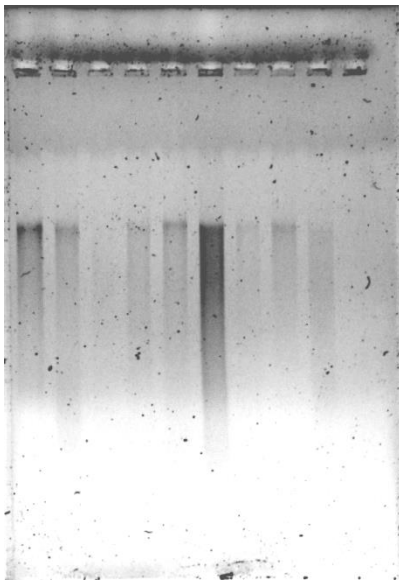
61-62-63-64-65-66-67-68-69-70 CONT

71CONTROL-1CASO-2-3-4-16-6-7-8-9

10-11-12-13-14-15-16-18-19-20 CASOS

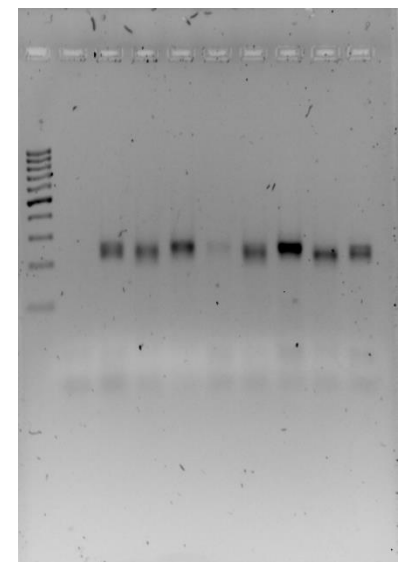
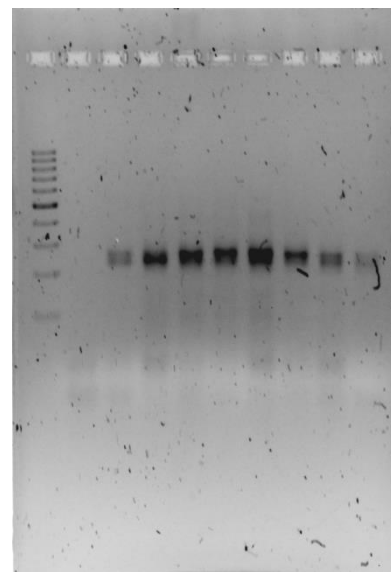
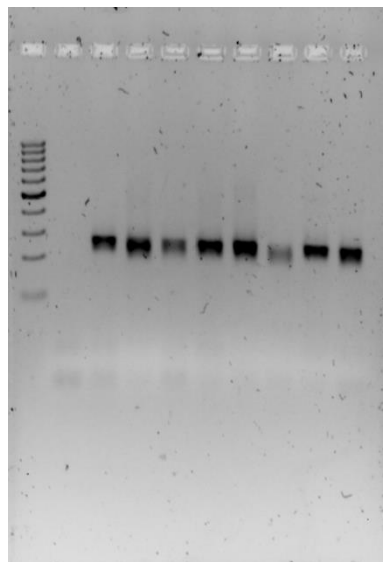
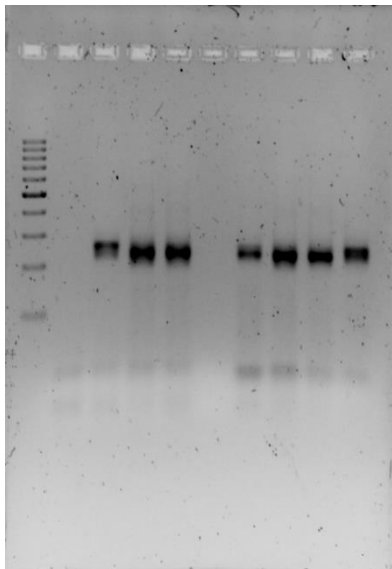


21-22-23-24-25-26-27-28-54-vacío CASOS

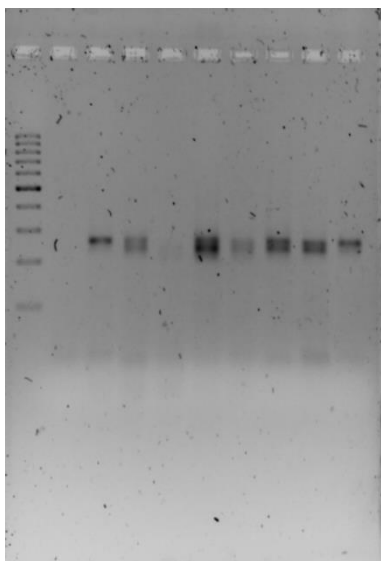


**Figuras Sección 6.** Imágenes de los geles de agarosa al 1.5% para identificar el DNA con barcodes de las muestras del INPer.

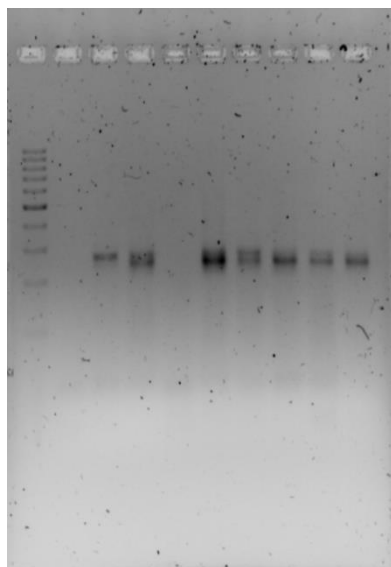
L,-,+,1b18,2b19,VACÍO,4b21,5-VHMGb22,6b23,7b24    L,-,+,8b25,9b26,10b27,5-MFMEb28,11b29,12b30,13b31    L,-,+,14b32,15b33,17-CRIGb34,17-EOCb35,18b36,19b37,20b38    L,-,+,21b39,22b40,23b41,24b42,25b43,26b44,27b45



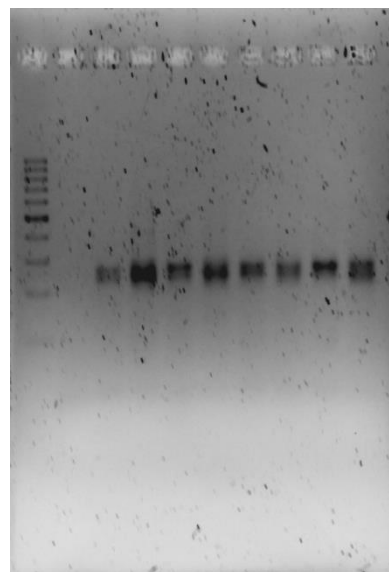
L,-,+,28b46,29b47,30b48,32b49,33b41,34b2,35b3



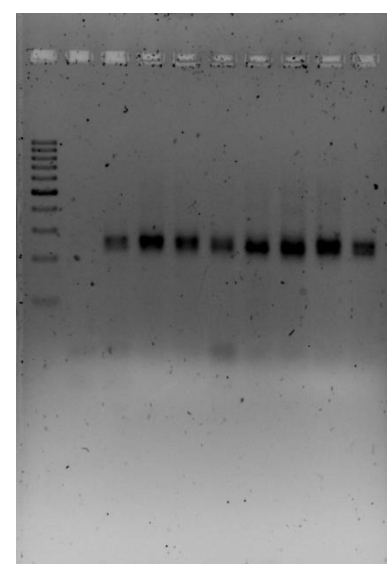
L,-,+,36b4,37b5,38b6,39b7,40b8,41b9,42b10



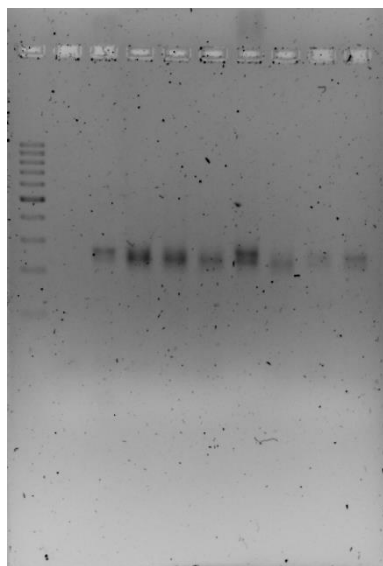
L,-,+,43b11,44b12,45b13,46b14,47b15,48b16,49b17



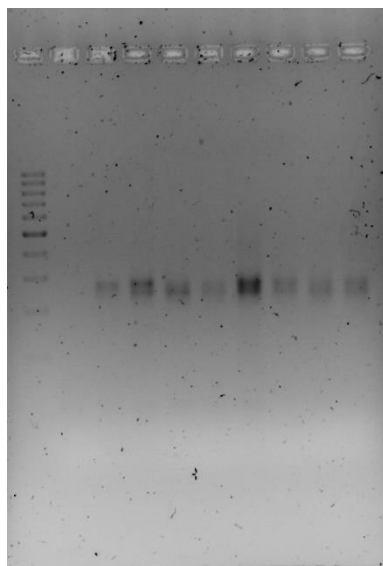
L,-,+,50b18,51b19,52b20,53b21,55b22,56b23,57b24



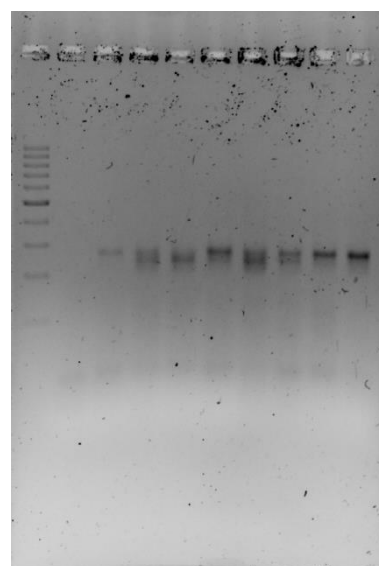
L,-,+,58b25,59b26,60b27,61b28,62b29,63b30,64b31



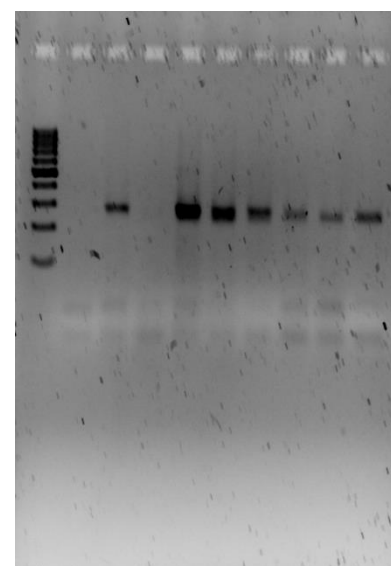
L,-,+,65b32,66b33,67b34,68b35,69b36,70b37,71b38



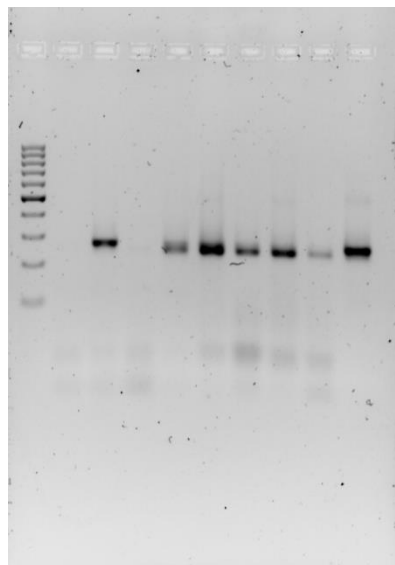
L,-,+,1b39,2b40,3b41,48b42,16b43,6b44,7b45



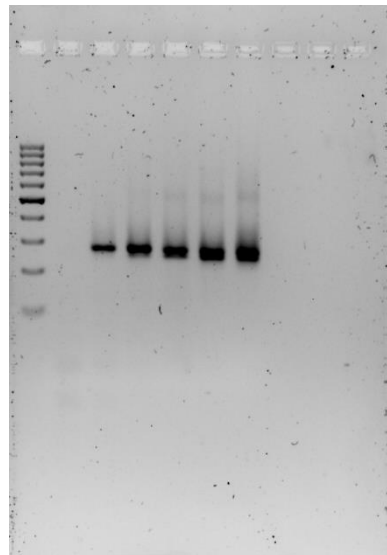
L,-,+,8b46,9b47,10b48,11b49,12b1,13b2,14b3



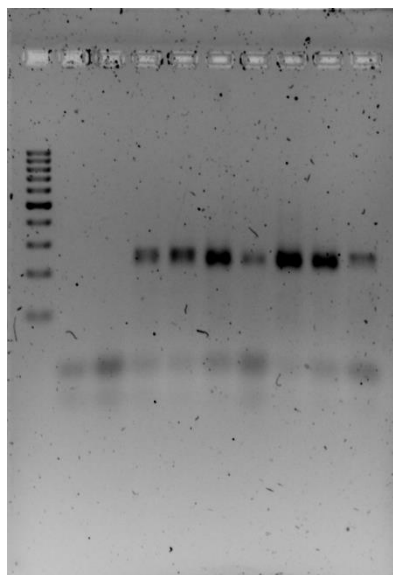
L,-,+,50ngcontrol29b47,dil10ngcontrol29b47,50ngcontrol3b20,  
dil10ngcontrol3b20,50ngcontrol37b5,dil10ngcontrol37b5,  
50ngCASO9b47



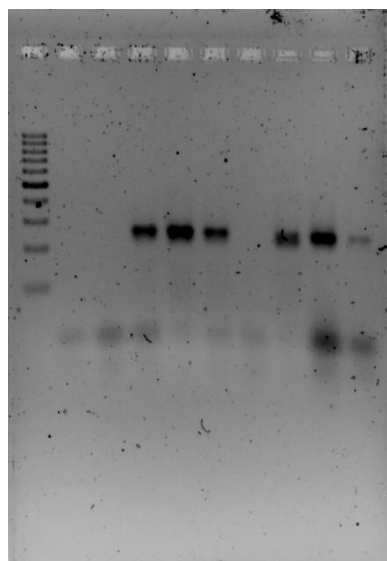
L,,+,dil10ngCASO9b47,CASO12b11,CAS  
O13b12,CASO14b13,Vacíos



L,-,+,16b15,dil16b15,21b20,dil21b20,22b21,dil22b21,23b22



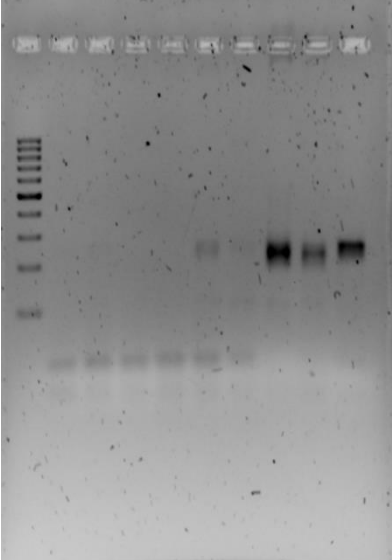
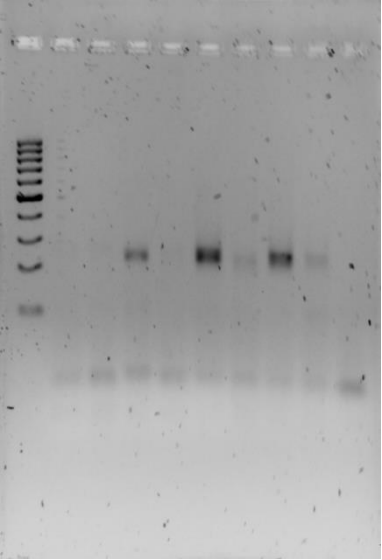
L,-,+,dil23b22,25b24,dil25b24,8b46,20b19,lacti3b50,lacti7b50





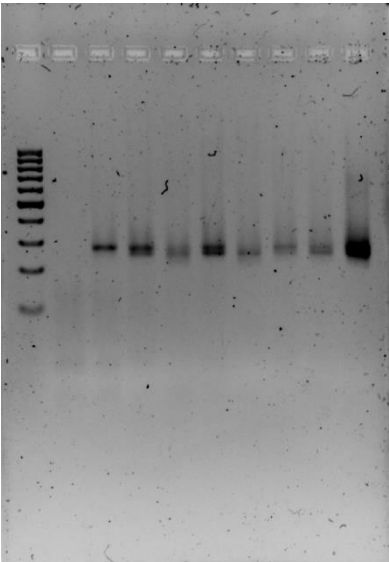
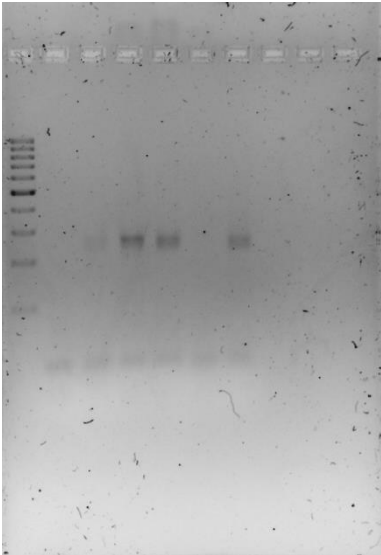
L,-,+,15b14,16b15,54b16,18b17,19b18,20b19,21b20

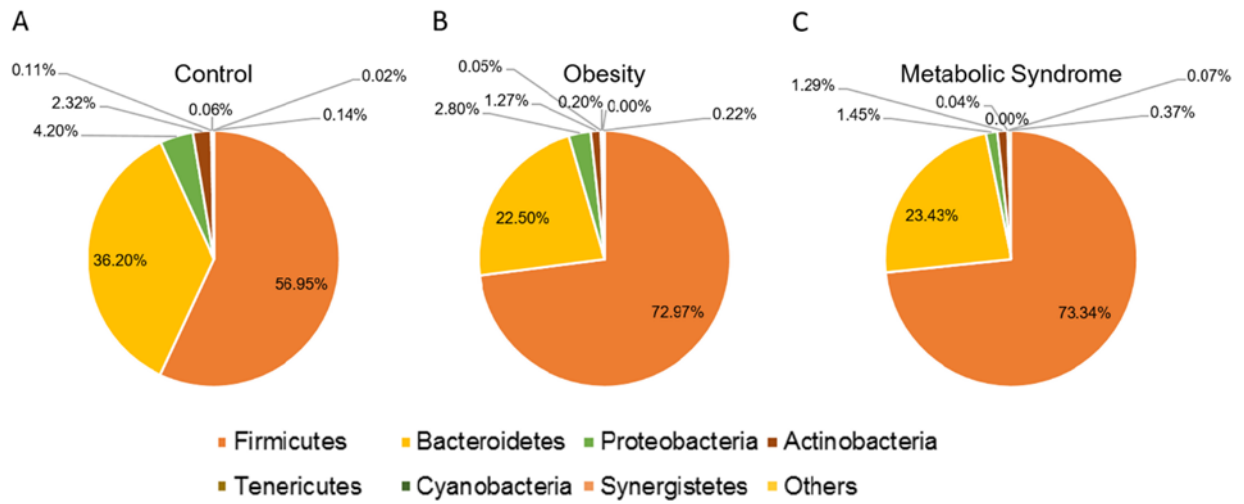
L,-,+,22b21,23b22,24b23,25b24,26b25,27b26,28b27



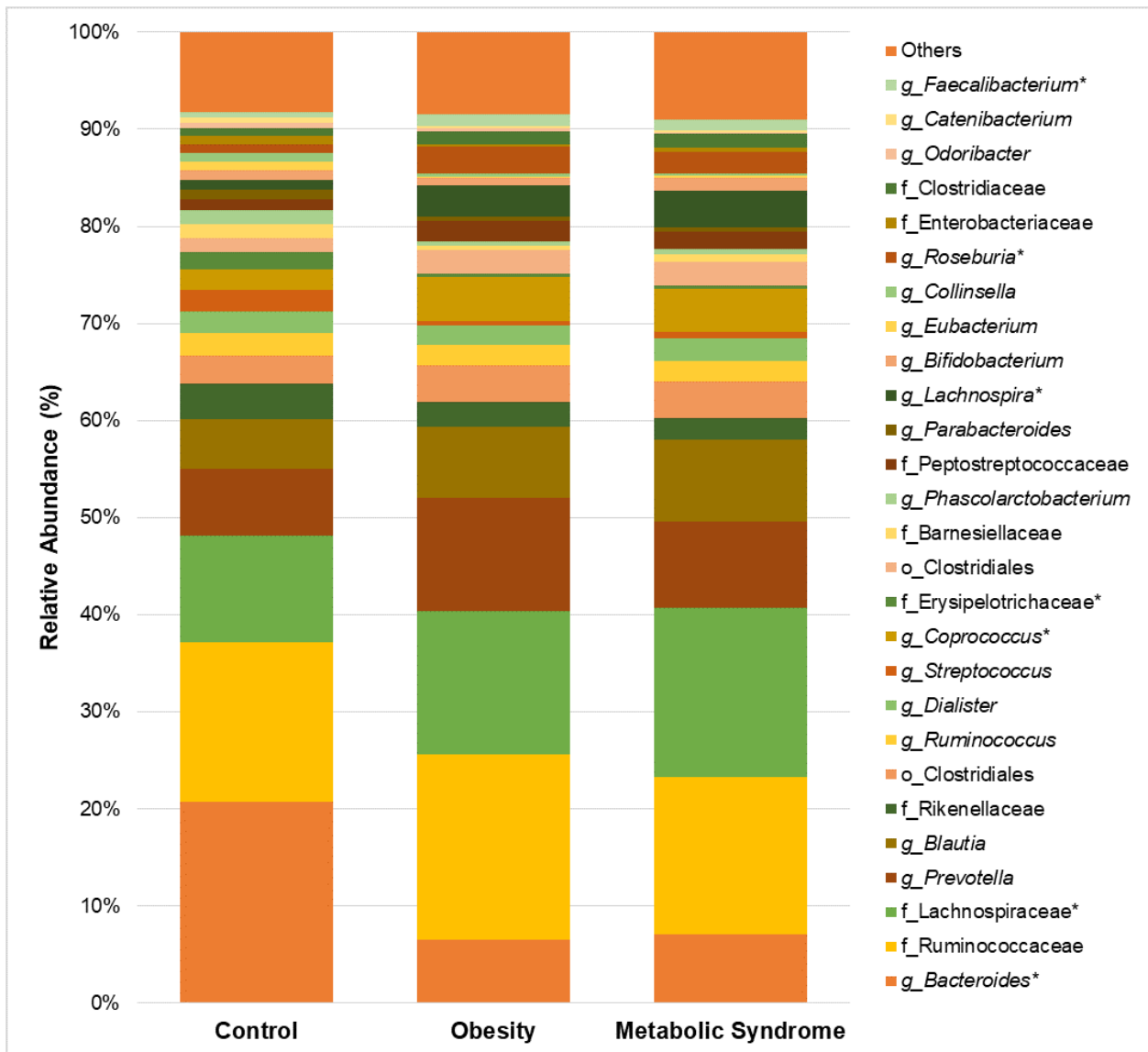
L,-,+,50ngCASO8b47,dil10ngCASO8b47,100ngCASO8b47,10ngCASO8b47

L,-,+,12b28,13b29,14b30,15b31,dil10ng16b32,control31-10ngb33,control31-50ngb33

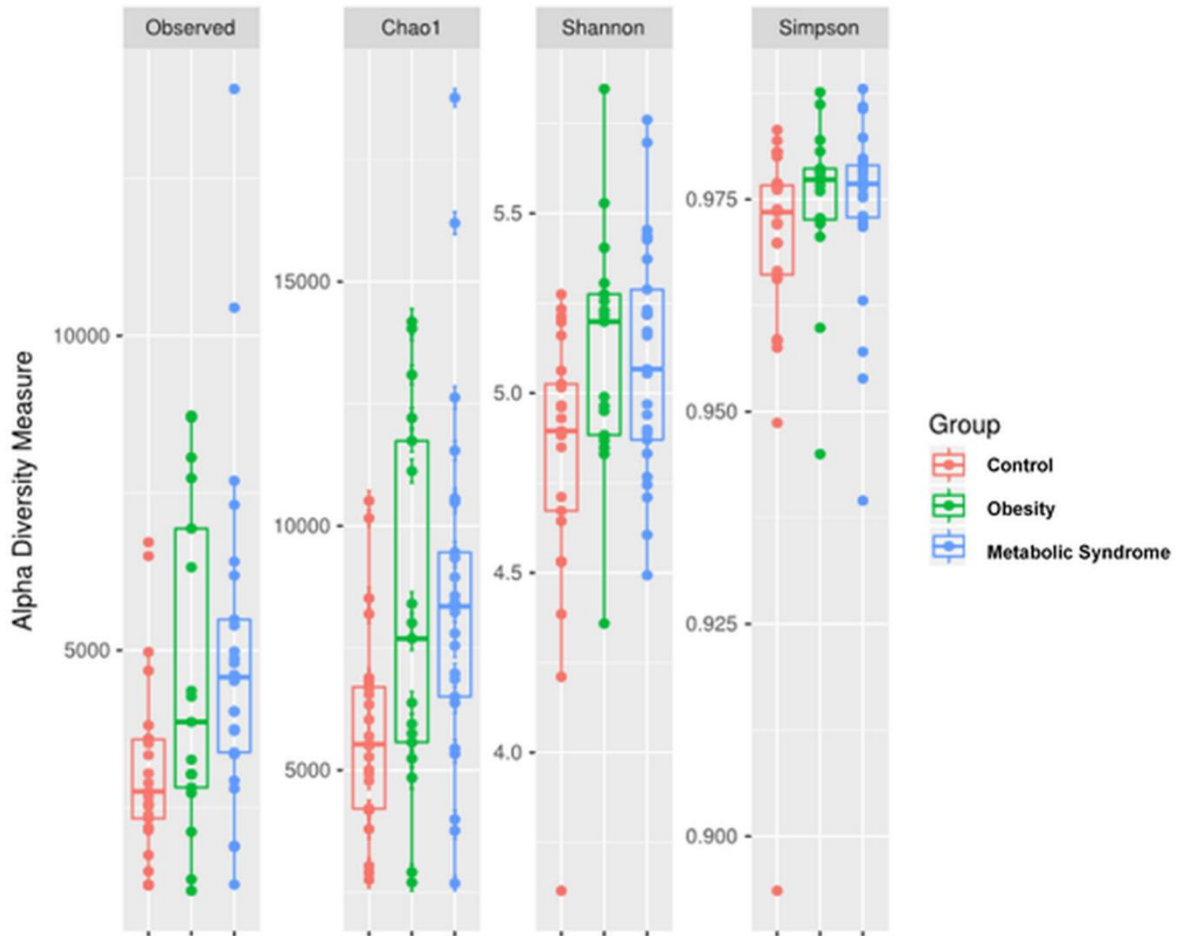




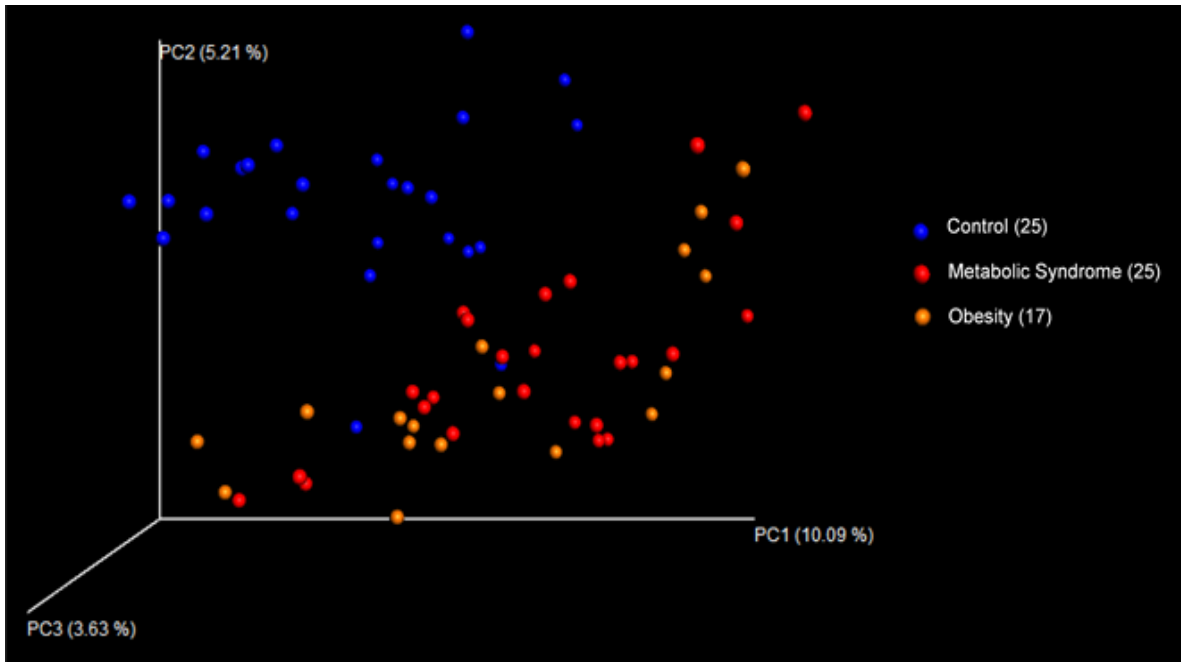
**Figura 1. Abundancia relativa de Fila bacterianos de la microbiota del colon de los participantes.** La figura muestra gráficos circulares de la abundancia relativa de Fila bacteriano relevante en las tres categorías fenotípicas. Un control; B. Obesidad y C. Síndrome metabólico. Los Fila se identifican por colores como se indica debajo de los gráficos. Otros incluyen Fila como Verrucomicrobia, Spirochaetes y Fusobacteria. Los números son la abundancia relativa en porcentaje.



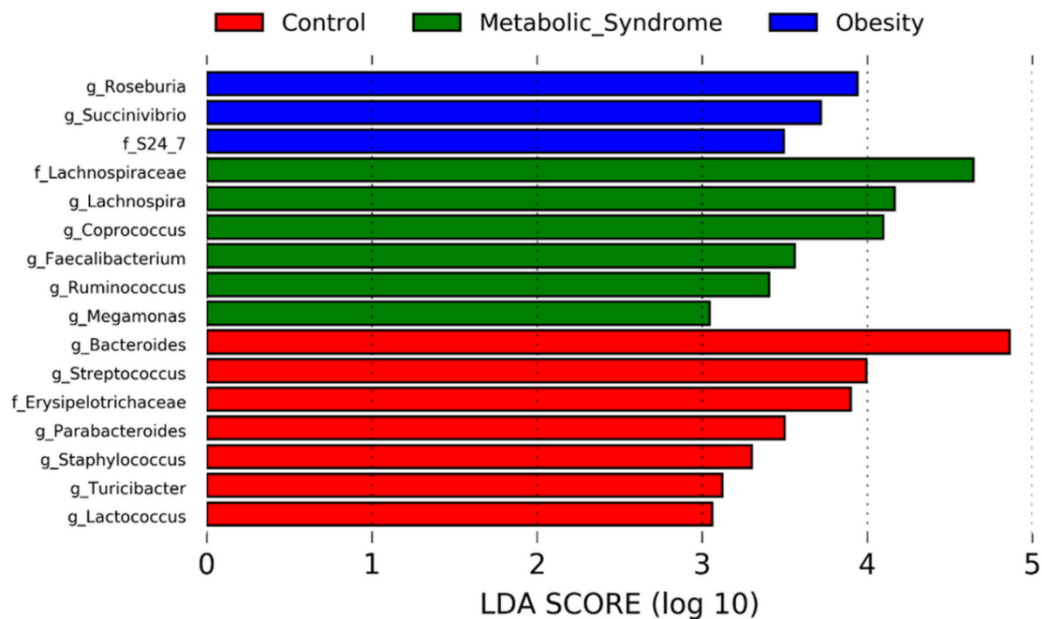
**Figura 2. Diversidad bacteriana en peso normal, obesidad y síndrome metabólico.** La figura muestra gráficos de barras de abundancia relativa para órdenes, familias y géneros bacterianos relevantes, presentes en las tres categorías fenotípicas. Cada jerarquía taxonómica se identifica por colores como se indica al lado de las barras. Un asterisco muestra bacterias con un cambio significativo en la abundancia relativa.



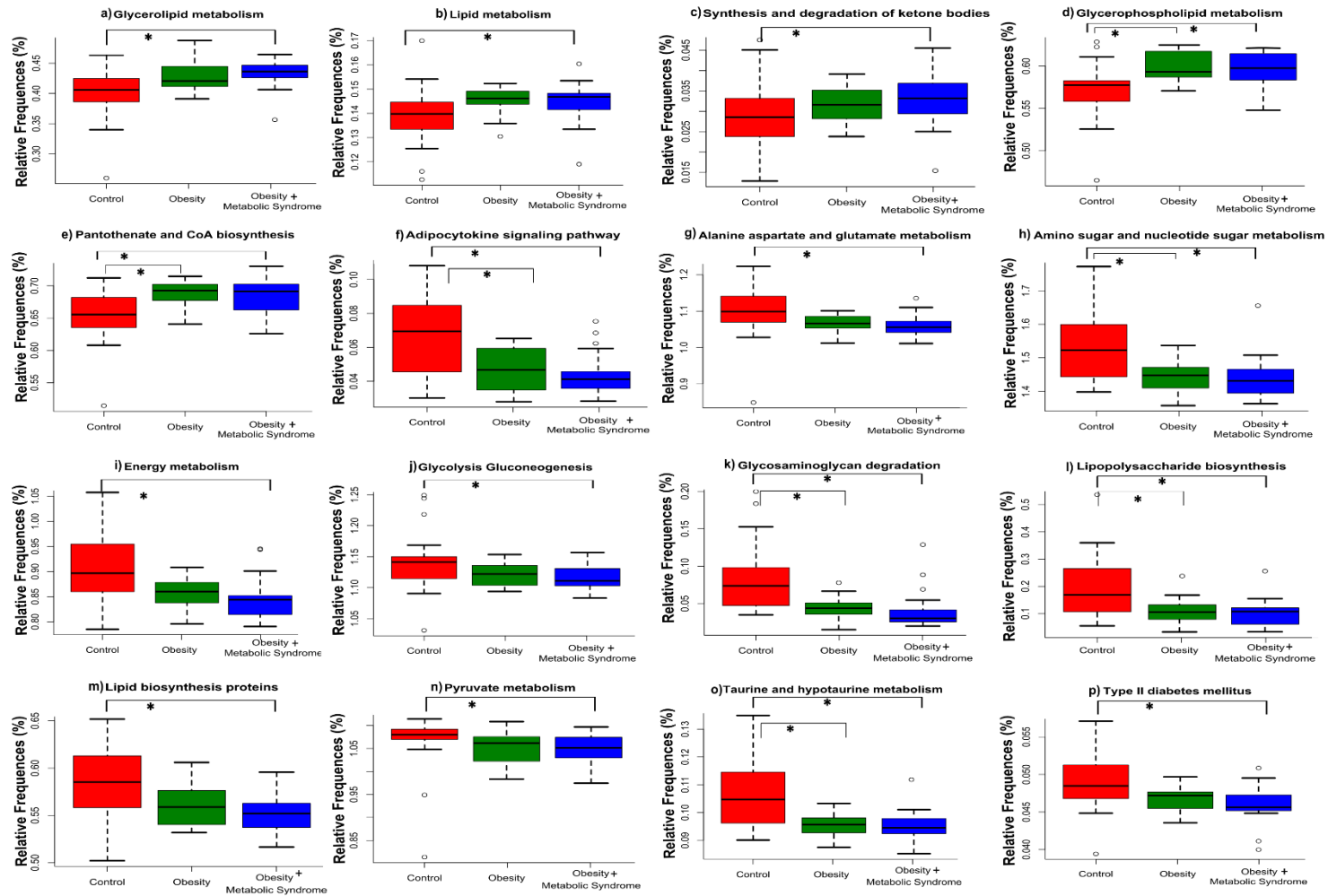
**Figura 3. Diversidad alfa bacteriana.** Las figuras del diagrama de caja muestran la diversidad alfa de las comunidades bacterianas en los tres grupos de estudio Control, OB y OSM por medio de los índices Chao1, Shannon y Simpson. En el gráfico se trazan los rangos inter cuartiles (IQR y recuadros), las medianas (líneas en los recuadros) y los valores más bajos y más altos para el primer y el tercer cuartil. Cada categoría fenotípica se identifica por colores como se indica en el lado derecho de la figura. Cada muestra está representada por un punto de color.



**Figura 4. Diversidad beta bacteriana.** La figura muestra un gráfico de dispersión tridimensional, generado mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA) de análisis UniFrac no ponderados, que muestra la distancia de comunidades microbianas entre mujeres con peso normal y mujeres con obesidad y síndrome metabólico. Cada grupo se identifica por colores como se indica en el lado derecho de la figura.

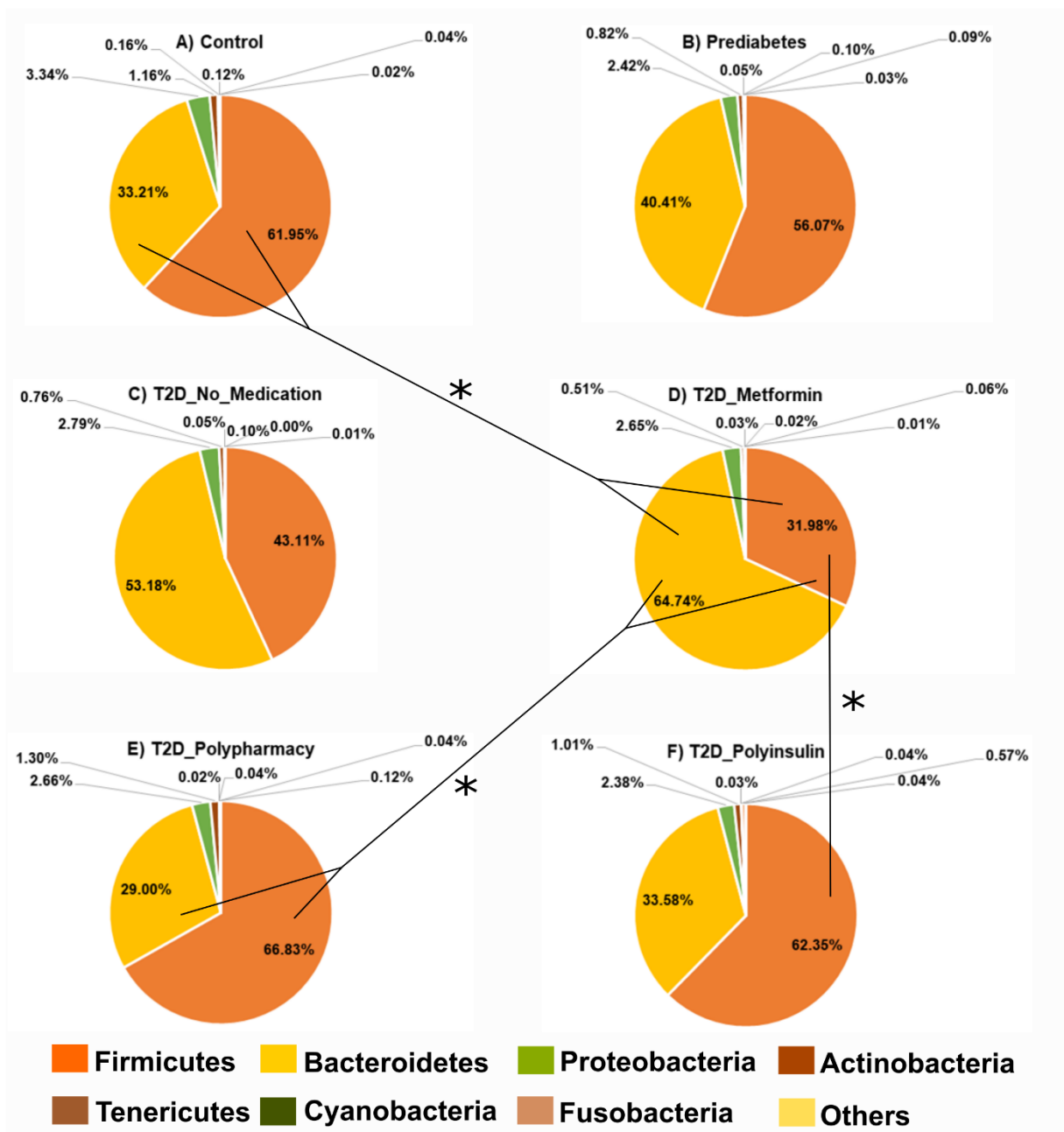


**Figura 5. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) para las comunidades bacterianas.** El gráfico LEfSe muestra familias bacterianas enriquecidas y géneros significativamente asociados con las tres categorías fenotípicas. Siete bacterias se enriquecieron en el grupo de control (rojo), seis bacterias en el grupo de síndrome metabólico (verde) y tres bacterias en el grupo de obesidad (azul). La puntuación LDA o el tamaño del efecto se muestra a escala logarítmica debajo de las barras. Cada grupo se identifica por color en la parte superior de la figura.

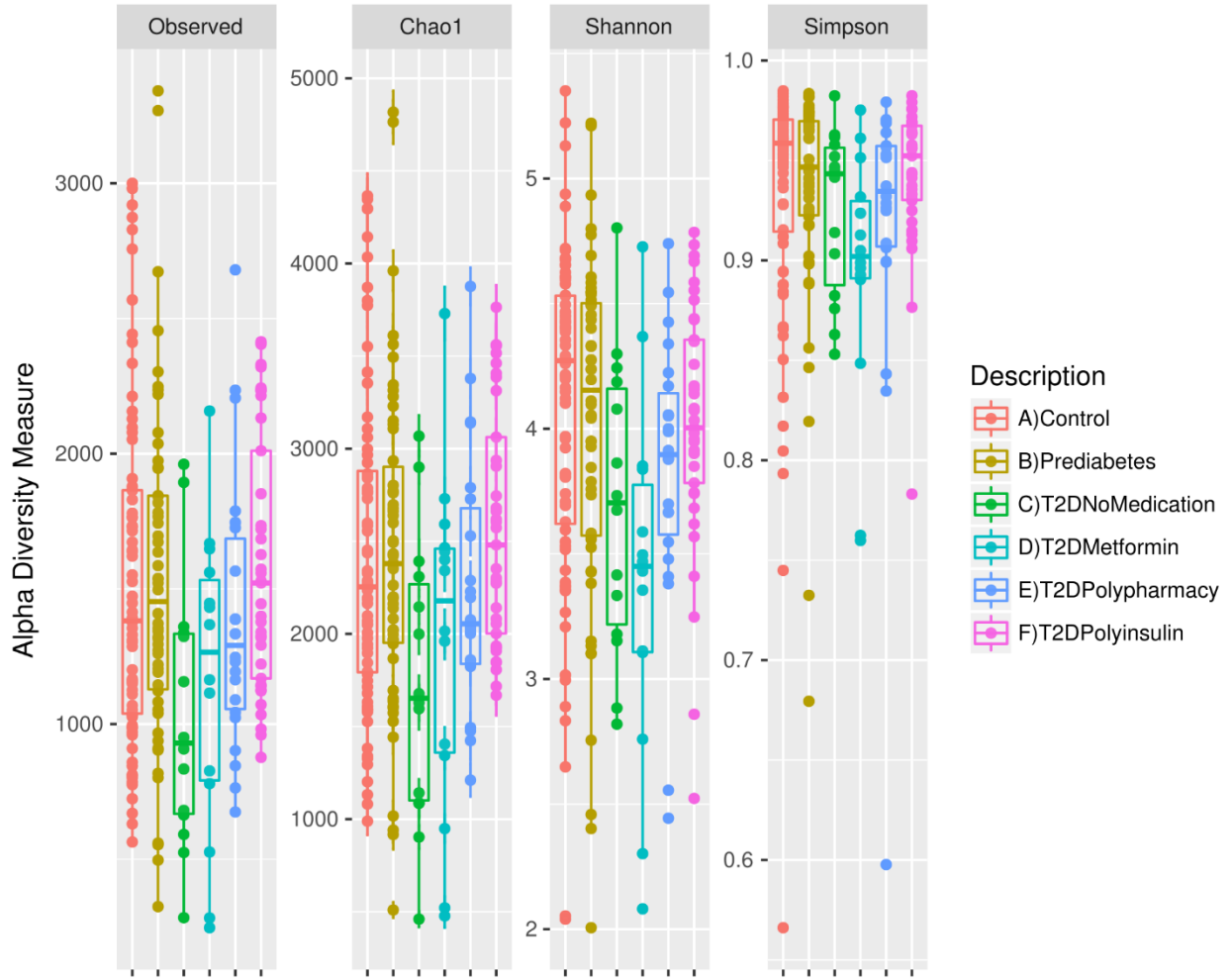


**Figura 6. Predicción comparativa del genoma funcional de la microbiota bacteriana intestinal.** La figura muestra una representación gráfica de la proporción de secuencias predichas seleccionadas utilizando PICRUST mediante el análisis de la tabla OTU correspondiente generada por QIIME para las comunidades bacterianas. El eje Y muestra la abundancia relativa de la predicción del contenido de genes, y el eje X muestra las categorías Control (color rojo), Obesidad (color verde) y Obesidad más Síndrome Metabólico (color azul).

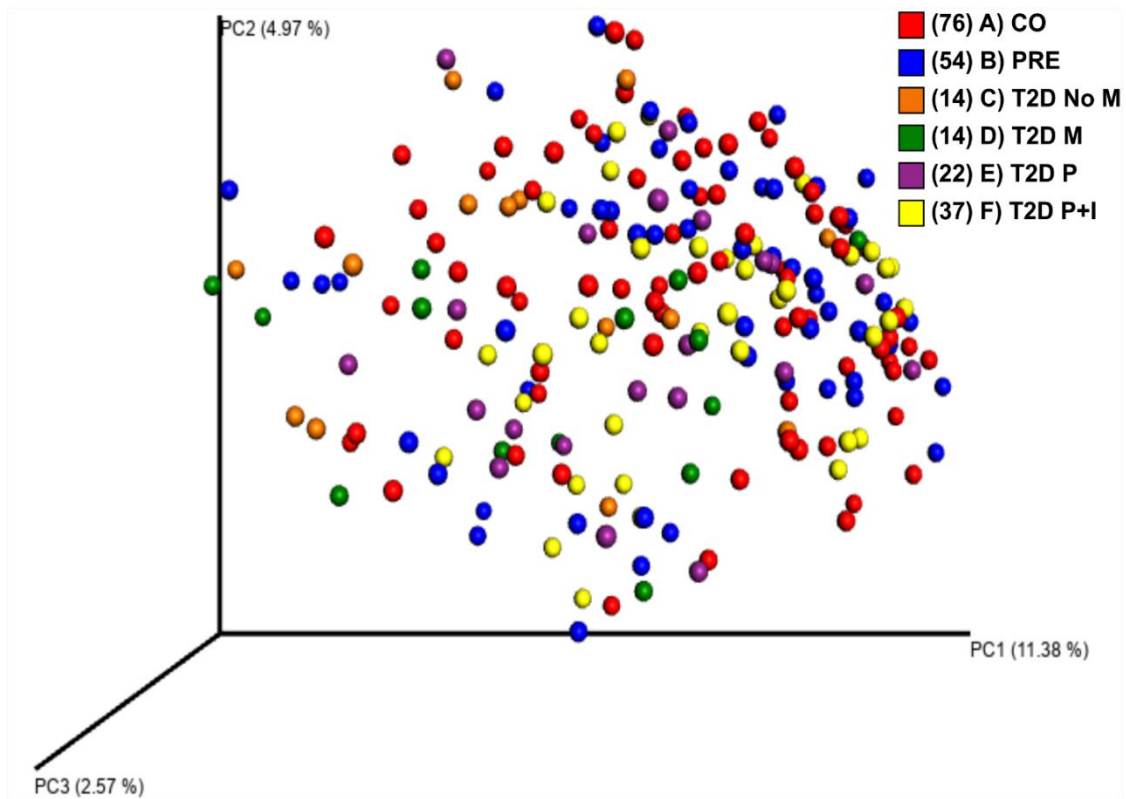




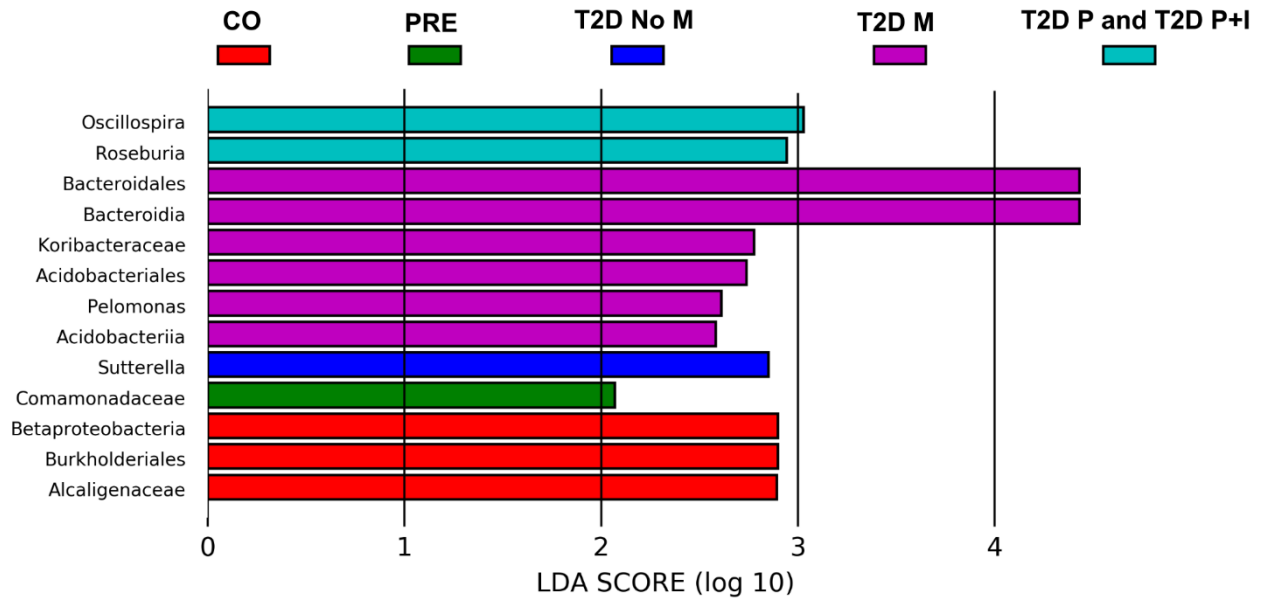
**Figura 7. Abundancia de Filo bacteriano en la microbiota de los 6 grupos de estudio.** Las gráficas circulares de la figura muestran las abundancias relativas (%) de Filo bacterianos relevantes de la microbiota intestinal en los seis grupos estudiados en este trabajo. Control (CO), Prediabetes (PRE), DT2 Sin medicación (DT2 No M), Metformina DT2 (DT2 M), Polifarmacia DT2 (DT2 P) y Polifarmacia DT2 + Insulina (DT2 P + I). Filo se identifican por colores como se indica debajo de los círculos. "Otros" incluye Filo como Synergistetes, Fusobacteria y Tenericutes. Las líneas negras sólidas con asteriscos, vinculan a Filo con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



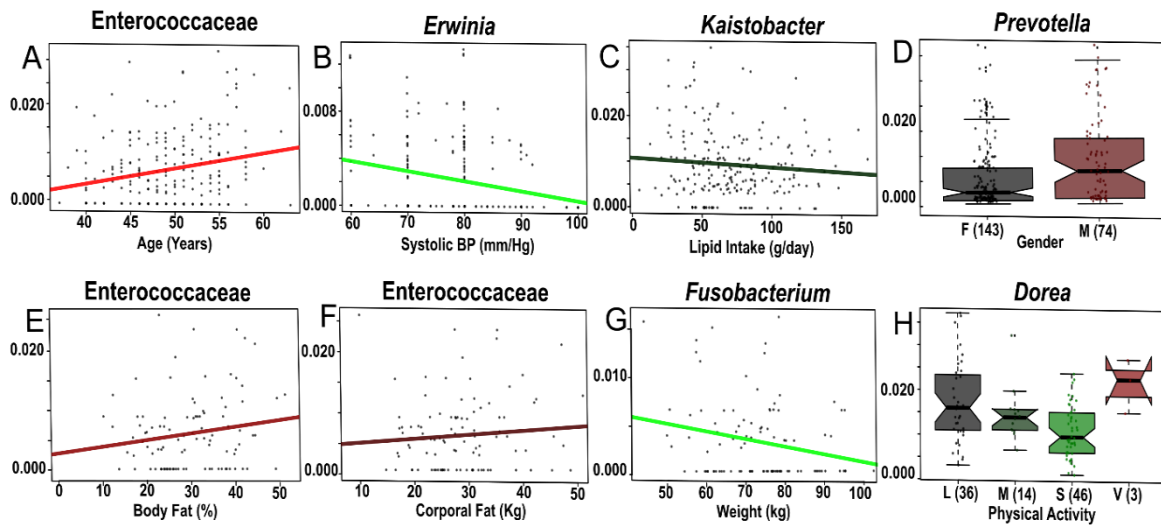
**Figura 8. Diversidad alfa bacteriana.** Las figuras del diagrama de caja muestran la diversidad alfa de las comunidades bacterianas en los seis grupos de estudio: control (CO), prediabetes (PRE), DT2 sin medicación (DT2 no M), Metformina DT2 (DT2 M), polifarmacia DT2 (DT2 P) y DT2 Polifarmacia + Insulina (DT2 P + I) por medio de índices de diversidad observada, Chao1 (riqueza) y Shannon y Simpson. En el gráfico se trazan los rangos inter cuartiles (parte inferior y superior de las casillas), las medianas (líneas medias en las casillas) y los valores más bajos y más altos para el primer y tercer cuartil. Los puntos representan individuos individuales, y cada grupo se identifica por colores como se indica en la leyenda en el lado derecho de la figura.



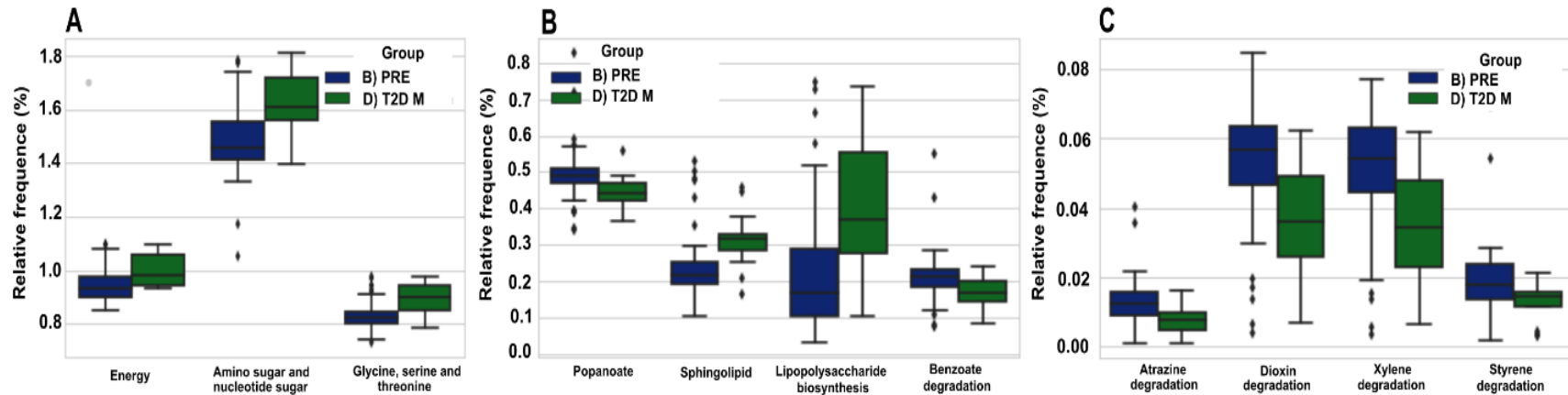
**Figura 9. Diversidad beta bacteriana.** La Figura muestra una gráfica de dispersión tridimensional, generada usando el análisis de coordenadas principales (PCoA) del análisis UniFrac no ponderado, que muestra la distancia de las comunidades microbianas entre los seis grupos. Cada grupo Control (CO), Prediabetes (PRE), DT2 Sin medicación (DT2 No M), Metformina DT2 (DT2 M), Polifarmacia DT2 (DT2 P) y Polifarmacia DT2 + Insulina (DT2 P + I) se identifica por colores como indicado en las etiquetas superiores derechas de la figura.



**Figura 10. Gráfico del Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) para las comunidades bacterianas.** El gráfico LEfSe muestra familias bacterianas enriquecidas significativamente asociadas en cinco grupos de la siguiente manera; 1. Control (CO), 2. Prediabetes (PRE), 3. DT2 Sin medicación (DT2 No M), 4. Metformina DT2 (DT2 M) y 5. Polifarmacia DT2 (DT2 P) con polifarmacia DT2 + Insulina (DT2 P + I). Las bacterias del árbol se enriquecieron en el grupo Control (CO) en color rojo, una bacteria se enriqueció en el grupo Prediabetes (PRE) en color verde, una bacteria se enriqueció en el grupo DT2 Sin medicación (DT2 No M) en color azul oscuro, Seis bacterias se enriquecieron en el grupo Metformina DT2 (DT2 M) en color púrpura y dos bacterias en el grupo DT2 Polifarmacia + Insulina (DT2 P + I) en color azul claro. La puntuación LDA o el tamaño del efecto se muestra a escala logarítmica debajo de las barras. Los nombres de las familias de bacterias se muestran junto a las barras horizontales. Cada grupo de estudio se identifica por color en la parte superior de la figura.



**Figura 11. Asociación multivariada de la microbiota intestinal con todas las variables medidas usando MaAsLin.** La figura muestra gráficos de la asociación significativa entre metadatos y mediciones microbianas para 217 individuos de todos los grupos junto con variables tales como: edad y familia de Enterococacceae (A), presión arterial sistólica y género Erwinia (B), ingesta de lípidos y género Kaistobacter (C) y género y género Prevootella (D). Los análisis adicionales muestran una asociación significativa entre metadatos y mediciones microbianas utilizando una submuestra de 99 individuos seleccionados con composición corporal y metadatos de actividad física: grasa corporal (%) y familia Enterococacceae (E), grasa corporal (Kg) y familia Enterococacceae (F), peso (Kg) y el género Fusobacterium (G), y la actividad física y el género Dorea (H). En la figura, las líneas de color con pendientes positivas o negativas muestran la tendencia de asociación; los diagramas de caja en el gráfico muestran los rangos intercuartílicos (parte inferior y superior de los recuadros), las medianas (líneas medias en los recuadros) y los valores más bajos y más altos para los cuartiles primero y tercero. Los puntos representan individuos individuales, y cada categoría se identifica por colores. Ejes, indica abundancias relativas para cada taxón, X-ejes, indica los metadatos. Para Género, F es 143 mujeres, y M es 74 hombres; para actividad física, L es luz (36), M es moderada (14), S es sedentaria (46) y V es vigorosa (3), los números entre paréntesis indican participantes.



**Figura 12. Predicción comparativa del genoma funcional de la microbiota bacteriana intestinal.** La figura muestra representaciones gráficas cuadradas de la proporción de secuencias predichas seleccionadas utilizando PICRUST para las comunidades bacterianas. El eje Y muestra las abundancias relativas (%) de la predicción del contenido del gen, y el eje X muestra los grupos Prediabetes (PRE) (color azul) y Metformina DT2 (DT2 M) (color verde). Las principales vías metabólicas que se muestran en la parte inferior de cada gráfico son: A) Metabolismo energético, metabolismo amino azúcar y nucleótido azúcar y metabolismo glicina serina y treonina, B) Metabolismo de propanoato, metabolismo de esfingolípidos, biosíntesis de lipopolisacáridos y degradación de Benzoato, y C) Atrazina, degradaciones de dioxina, xileno y estireno. Los diagramas de caja muestran los rangos inter cuartiles (parte inferior y superior de las casillas), las medianas (líneas medias en las casillas) y los valores más bajos y más altos para el primer y tercer cuartil. Los puntos representan individuos individuales, y cada categoría se identifica por colores.

## 14. Lista de Abreviaturas

**ACC:** Alejandra Chávez Carbajal

**ADA:** por sus siglas en inglés: *American Diabetes Association*.

**AGCC:** Ácidos Grasos de Cadena Corta

**ATP-III:** Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol.

**cm:** Centímetros.

**CO:** controles o personas sanas.

**DT1:** Diabetes tipo 1.

**DT2 M:** personas con Metformina como tratamiento para DT2.

**DT2 No M:** personas debutantes de DT2 sin tratamiento farmacológico.

**DT2 P + I:** personas con combinación de dos fármacos como tratamiento para DT2 + insulina.

**DT2 P:** personas con combinación de dos fármacos como tratamiento para DT2, se denominó polifarmacia.

**DT2:** Diabetes tipo 2.

**ECV:** Enfermedad Cardiovascular.

**ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

**FID:** Federación Internacional de Diabetes.

**GPAQ:** por sus siglas en inglés: *Global Physical Activity Questionnaire*.

**HbAc1:** hemoglobina glucosilada.

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad.

**IBERO:** Universidad Iberoamericana.

**INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

**INPer:** Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes.

**ISSSTE:** Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad.

**METs:** Equivalentes Metabólicos.

**OB:** Obesidad.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OSM:** obesidad + síndrome metabólico.

**OSM:** Obesidad y Síndrome Metabólico.

**OUT's:** Unidades Taxonómicas Operacionales.

**PCoA:** Análisis de coordenadas principales.

**PRE:** prediabetes.

**SM:** Síndrome Metabólico.

**SNP:** Polimorfismo de un solo nucleótido.

*-fin-de-texto-*