



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ANÁLISIS DE MICROBIOTA INTESTINAL EN
POBLACIÓN ADULTA COLOMBIANA
ASOCIADA A FACTORES DE RIESGO DE
DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OBESIDAD**

Claudia Lorena Cruz Hernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología (IBUN)
Bogotá, Colombia

2022

ANÁLISIS DE MICROBIOTA INTESTINAL EN POBLACIÓN ADULTA COLOMBIANA ASOCIADA A FACTORES DE RIESGO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OBESIDAD

Claudia Lorena Cruz Hernández

Tesis de Maestría como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

PhD. Martha Nancy Calderón Ozuna.

Línea de Investigación:

Comunicación Bacteriana

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología (IBUN)

Bogotá, Colombia

2022

Dedico este trabajo a todos los que se esfuerzan por construir y compartir ciencia.

Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz triunfan sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones se unirán a la larga no para destruir sino para edificar, y que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho por el bien de la humanidad.

Louis Pasteur

Declaración de obra original

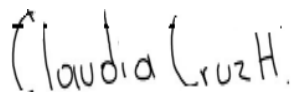
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Claudia Lorena Cruz Hernández

Fecha 06/05/2022

Agradecimientos

Dedico esta tesis de maestría a todos los que me acompañaron y me animaron a continuar este proceso. A mi familia especialmente a mis padres Claudia Elena Hernández Ortiz y Omar Cruz Suarez por su apoyo incondicional y su paciencia con cada decisión que tomo. A mis hermanos, Omar Antonio Cruz Hernández y Lina María Cruz Hernández, por su compañía, sus consejos, su alegría y su forma de asumir la vida con la mejor disposición, a mi hermana le agradezco su asesoramiento estadístico para la realización de este trabajo. A mis tías Alicia y Olga por su constante apoyo, a mis primas Karen y Natalia por ser mi mejor equipo en la realización de mis sueños.

A la Universidad Nacional de Colombia por la formación académica otorgada, a la Vicerrectoría de investigación, al Instituto de Biotecnología y al Departamento de Química. Al programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CyTED), como proyecto de la red IBEROBDIA (918PTE0540) y a nivel nacional al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Colombia (MINCIENCIAS) por permitirme financiar mis estudios de maestría y permitir la realización de una estancia de investigación internacional. Agradezco a cada uno de mis docentes y administrativos de la maestría por participar en mi proceso de formación.

Al grupo de investigación de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM) por permitirme realizar mi proyecto de investigación, especialmente a la docente Martha Nancy Calderón Ozuna por dirigir mi trabajo de tesis, por fortalecer mis capacidades investigativas, por la confianza brindada en la ejecución de este proyecto y por exigirme académicamente.

A los compañeros del grupo de investigación en disbiosis, Haiver Antonio Rodríguez, Julieth Daniela Buell Acosta por compartirme de sus conocimientos en medicina, agradezco también a todos los demás médicos que nos acompañaron en las jornadas de

salud y especialmente al Doctor Sergio Bermeo por su disposición a colaborar y el apoyo a la investigación. Quiero agradecer a mi amiga y compañera Ginneth Lorena Riaño Ayala por compartir sus conocimientos químicos conmigo, por su apoyo, la compañía y la invaluable amistad que me brindo durante toda mi maestría.

Al Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA), del Departamento de Veterinaria de la Universidad Santiago de Compostela (España-Lugo), especialmente a la Doctora Alejandra Cardelle Cobas por su asesoramiento académico en el análisis bioinformático y brindarme herramientas útiles para una carrera investigativa futura, al Doctor Alberto Cepeda por acogernos y a los demás miembros del grupo de investigación. Agradezco especialmente a la estudiante de doctorado Laura Isabelle Sinisterra por su guía y su asesoría en técnicas de secuenciación, también por su amistad, su paciencia y sus consejos.

Agradezco a las entidades y a las personas que nos brindaron la confianza y un espacio para la realización de las jornadas de salud. A cada uno de los voluntarios que participó en las jornadas por su disposición, colaboración y su interés en mejorar sus condiciones de salud.

Resumen

ANÁLISIS DE MICROBIOTA INTESTINAL EN POBLACIÓN ADULTA COLOMBIANA ASOCIADA A FACTORES DE RIESGO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OBESIDAD

La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos del tracto gastrointestinal, la pérdida del equilibrio en ésta se ha relacionado con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y obesidad; dos enfermedades de alta comorbilidad en las últimas décadas. El objetivo fue estudiar perfiles filogenéticos de la microbiota intestinal en adultos colombianos entre 40 y 70 años. Se realizaron jornadas de salud para el reclutamiento de voluntarios; se realizó valoración clínica a 535 participantes, que incluyó medidas de composición corporal y antropometría. Se aplicó la escala de riesgo FINDRISC y se extrajo muestra sanguínea para análisis bioquímicos; se recibió una muestra de materia fecal, para la extracción del ADN de la microbiota intestinal. El 70% de la población enrolada presentó alteración en el índice de masa corporal (IMC), el 50% riesgo a desarrollar DM2 y el 66% presentó riesgo metabólico.

Se seleccionaron 85 voluntarios para el estudio de microbiota intestinal, mediante secuenciación del gen 16S rRNA, utilizando la plataforma Ion Torrent de ThermoFisher. Los análisis bioinformáticos se realizaron sobre los resultados de 40 muestras discriminadas según IMC y el comportamiento glucémico, utilizando el Software QIIME 2™, los análisis de biodiversidad y de biomarcadores microbianos se realizaron en el Software MicrobiomeAnalyst. Los filos bacterianos más abundantes fueron Firmicutes (49%), Bacteroidetes (39%) y Proteobacteria (7%); se observó que predominaron taxones microbianos asociados a un patrón de alimentación occidental. Se logró identificar catorce biomarcadores microbianos diferentes en cada subgrupo; se encontró relación estadística significativa entre familias, géneros y especies con diferentes parámetros clínicos asociados a disbiosis y de riesgo metabólico.

Palabras clave: Factores de riesgo metabólico, Microbiota intestinal, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, secuenciación de nucleótidos.

Abstract

GUT MICROBIOTA ANALYSIS IN COLOMBIAN ADULT POPULATION ASSOCIATED WITH RISK FACTORS OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND OBESITY

The gut microbiota is the community of living microorganisms of the gastrointestinal tract, the loss of balance in it has been related to type 2 diabetes mellitus (DM2) and obesity; two diseases with high comorbidity in recent decades. The objective was to study phylogenetic profiles of the intestinal microbiota in Colombian adults between 40 and 70 years old. Health sessions were held to recruit volunteers; A clinical assessment was performed on 535 participants, which included measurements of body composition and anthropometry. The FINDRISC risk scale was applied, and a blood sample was taken for biochemical analysis; a stool sample was received for DNA extraction from the intestinal microbiota. 70% of the enrolled population presented an alteration in the body mass index (BMI), 50% risk of developing DM2 and 66% presented metabolic risk.

85 volunteers were selected for the intestinal microbiota study, by sequencing the 16S rRNA gene, using ThermoFisher's Ion Torrent platform. The bioinformatic analyzes were carried out on the results of 40 samples discriminated according to BMI and glycemic behavior, using the QIIME 2™ Software, the biodiversity and microbial biomarker analyzes were carried out in the MicrobiomeAnalyst Software. The most abundant bacterial phyla were Firmicutes (49%), Bacteroidetes (39%) and Proteobacteria (7%); it was observed that microbial taxa associated with a western feeding pattern predominated. Fourteen different microbial biomarkers were identified in each subgroup; a significant statistical relationship was found between families, genera and species with different clinical parameters associated with dysbiosis and metabolic risk.

Keywords: Metabolic risk factors, Gut microbiota, obesity, type 2 diabetes mellitus, nucleotide sequencing.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tablas.....	XII
Lista de Símbolos y Abreviaturas	13
Introducción.....	16
1 Marco Teórico	20
1.1 Composición y distribución de la Microbiota intestinal	20
1.2 Funciones de la microbiota intestinal.....	23
1.2.1 Digestión y metabolismo de nutrientes	23
1.2.2 Protección de la mucosa intestinal.....	24
1.2.3 Regulación de la respuesta inmune	25
1.3 Asociación de la microbiota intestinal con DM2 y obesidad	25
1.3.1 Generalidades de la DM2 y la obesidad	25
1.3.2 Relación de la disbiosis en el desarrollo de DM2 y obesidad	27
1.4 Biomarcadores de Microbiota intestinal en DM2 y obesidad.....	28
1.5 Secuenciación de nucleótidos en la microbiota intestinal	30
2 Objetivos	32
2.1 Objetivo General	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3 Materiales y métodos	33
3.1 Reclutamiento de voluntarios	33
3.1.1 Criterios de inclusión	33
3.1.2 Criterios de exclusión.....	34
3.2 Protocolo de reclutamiento.....	34
3.3 Cuestionario de frecuencia de alimentos.....	35
3.4 Toma de muestra sanguínea y PTOG	35
3.5 Recolección de muestra de materia fecal.....	36
3.6 Análisis bioquímicos.....	36
3.7 Extracción de ADN de materia fecal.....	37
3.8 Secuenciación de ADN	37
3.9 Análisis bioinformáticos.....	38
3.10 Análisis estadísticos	40
4 Resultados y discusión.....	42
4.1 Características generales de los voluntarios	42
4.2 Análisis bioquímicos.....	46
4.3 Análisis de índices aterogénicos y FINDRISC	49

4.4	Análisis taxonómico de la microbiota intestinal mediante el gen 16S rRNA.....	53
4.4.1	Frecuencias de abundancia relativa a nivel de filo.....	54
4.4.2	Frecuencias de abundancia relativa a nivel de género	57
4.4.3	Frecuencias de abundancia relativa a nivel de especie	66
4.5	Análisis de diversidad α y β en las muestras de microbiota	71
4.6	Biomarcadores de la microbiota intestinal asociados a DM2 y obesidad.....	75
4.7	Análisis nutricional y asociación con los perfiles bacterianos.	84
5	Conclusiones y recomendaciones.....	87
5.1	Conclusiones	87
5.2	Recomendaciones	91
6	Anexos.....	93
6.1	Anexo A1. Aprobación comité de ética USC Lugo-España	93
6.2	Anexo A2. Aprobación comité de ética Facultad de Ciencias UNAL	94
6.3	Anexo B. Consentimiento informado.....	95
6.4	Anexo C. Cuestionario FINDRISC	99
6.5	Anexo D. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.....	100
6.6	Anexo E. Base de datos de voluntarios seleccionados para el estudio de microbiota intestinal.....	103
6.7	Anexo F. Tamaño de la librería e identificación de biomarcadores microbianos mediante el software MicrobiomeAnalyst	107
6.8	Anexo G. Análisis de correlación entre los perfiles bacterianos y parámetros clínicos mediante el Software R.....	109
	Bibliografía.....	110

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1-1: Distribución de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal..	23
Figura 1-2: Principales pasos en la secuenciación de microbiota.	31
Figura 3-1: Flujograma de trabajo en el análisis taxonómico de muestras de ADN.....	39
Figura 4-1: Comparación del perímetro de cintura alterado entre hombres y mujeres....	45
Figura 4-2: Colesterol LDL en la población analizada.....	48
Figura 4-3: Análisis de frecuencia de abundancia (FAR) a nivel de filo.....	55
Figura 4-4: Análisis de frecuencia de abundancia (FAR) a nivel de género.....	58
Figura 4-5: Relación entre el género <i>Dialister</i> y la grasa visceral	59
Figura 4-6: Relación entre el género <i>Bacteroides</i> y la grasa visceral	62
Figura 4-7: Relación entre el género <i>Prevotella</i> y el IMC (Kg/m2)..	63
Figura 4-8: Relación entre el género <i>Parabacteroides</i> y el IMC.....	64
Figura 4-9: Relación entre el género <i>Desulfovibrio</i> y la glucosa preprandial	65
Figura 4-10: Relación entre la especie <i>Prevotella copri</i> y el IMC	69
Figura 4-11: Relación entre la especie <i>Parabacteroides distasonis</i> y el IMC (Kg/m2)....	71
Figura 4-12: Relación entre la diversidad α (Índice De Shannon) entre subgrupos.....	73
Figura 4-13: Relación entre la diversidad α (índice de Chao 1) entre subgrupos.....	73
Figura 4-14: Curvas de rarefacción en la secuenciación de microbiota intestinal.....	74
Figura 4-15: Análisis PCoA para evaluar la diversidad β en la microbiota intestinal.....	75
Figura 4-16: Taxones bacterianos identificados como biomarcadores entre subgrupos..	77
Figura 4-17: Relación entre la familia Ruminococcaceae y la glucosa preprandial.	77
Figura 4-18: Relación la familia Christensenellaceae con metabolitos e IMC.....	80
Figura 4-19: Abundancia relativa de la especie <i>Bacteroides Caccaae</i>	78
Figura 5-1: Representación de filas, géneros y especies con mayor abundancia.	89

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Estudios de biomarcadores microbianos para DM2 y obesidad	29
Tabla 4-1: Caracterización clínica de los voluntarios	43
Tabla 4-2: Análisis bioquímicos en la población de estudio	49
Tabla 4-3: Descripción de índices aterogénicos y FINDRISC	50
Tabla 4-4: Descripción de los voluntarios del análisis de microbiota.....	53
Tabla 4-5: Abundancia relativa de los géneros más abundantes	67
Tabla 4-6: Abundancia relativa a nivel de especie	68
Tabla 4-7: Resumen del análisis LEfSe	84
Tabla 4-8: Consumo diario de energía, macronutrientes y colesterol.....	84

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
μL	Volumen microlitros
mg	Unidad de masa miligramo
dL	Unidad de volumen decilitro
ng	Unidad de masa nanogramo
g	Unidad de masa gramo
x g	Gravedades
γ	Gamma
α	Alfa
β	Beta

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ASVs	Variantes de secuencias amplificadas (del inglés, amplicon sequence variants)
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada (del inglés, branched chain amino acid)
BSH	Enzima hidrolasa de sales biliares
CD14	Cluster de diferenciación 14
c-HDL	Colesterol HDL
c-LDL	Colesterol LDL
CT	Colesterol total
c-VLDL	Colesterol VLDL
CyTED	Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosforilado
EC	Enfermedades cardiovasculares
ENSIN	Encuesta Nacional de Situación Nutricional
F/B	Relación Firmicutes/Bacteroidetes
FAR	Frecuencia de abundancia relativa
FFQ	Cuestionario de frecuencia de alimentos
FINDRISC	Encuesta Finnish Diabetes Risk Score
G+C	Guanina y citocina

GABA	Neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico
GC	Grasa corporal
GT	Grasa total
GV	Grasa visceral
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HMP	Human Microbiome Project
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IFN- γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgAS	Inmunoglobulina isotipo A secretora
IMC	Índice de Masa Corporal
RI	Resistencia a la insulina
ISFET	Ion-Sensitive Field-Effect Transistor
LDA	Análisis discriminativo lineal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEfSe	Análisis estadístico de discriminación lineal
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisácaridos
MetaHit	Metagenomics of the Human Intestinal Tract
N Glu	Voluntarios normoglicémicos
NF- κ B	Cadenas κ de las células B activadas
NGS	Tecnologías de secuenciación de nueva generación (del inglés, Next generation sequencing)
NOS	Enzima óxido nítrico sintasa
NP	Voluntarios con normopeso
NP N Glu	Voluntarios en normopeso-normoglucémico
NP Pre DM2	Voluntarios en normopeso-prediabéticos
OB	Voluntarios con obesidad
OB DM2	Voluntarios con obesidad y DM2
OB N Glu	Voluntarios con obesidad y glucosa normal
OB Pre DM2	Voluntarios con obesidad-prediabéticos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTUs	Unidades taxonómicas operativas abreviadas
PC	Perímetro de cintura
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pre Glu	Voluntarios prediabéticos
PTOG	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PYY	Péptido YY
R	Coeficiente de correlación de Pearson
Rho	Coeficiente de correlación de Spearman
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SB	Síndrome de Behcet
Score	Puntaje
SP	Voluntarios con sobrepeso
SP N Glu	Voluntarios con sobrepeso-prediabéticos
SP Pre DM2	Voluntarios con sobrepeso y DM2
TAD	Tensión arterial diastólica

TAS	Tensión arterial sistólica
TG	Triglicéridos
TGF- β	Factor de crecimiento transformador-beta
Th17	Células colaboradoras 17 (del inglés T helper 17)
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, tumor necrosis factor)
USD	Dólares
V1-V9	Regiones hipervariables
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VR	Valor de referencia
IL-6	Interleuquina 6
GLP-2	Glucagón-2
GLP-1	Glucagón-1
IL-1	Interleuquina 1
IL-1 β	Interleuquina 1 β
16S rRNA	Gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano
918PTE0540	Proyecto de la red IBEROBDIA del CyTED

Introducción

El término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado, como lo es el tracto gastrointestinal. [1]. La composición de la microbiota del intestino humano es específica de cada persona, evoluciona a lo largo de la vida y es susceptible a modificaciones exógenas y endógenas. Dentro de las modificaciones endógenas está el sexo, la edad, el sistema inmune y la genética propia de cada individuo; en las modificaciones exógenas se encuentran la dieta, la exposición a medicamentos y las cirugías [1].

La metagenómica y la ciencia de la microbiota son la vanguardia de la biología, se han desarrollado dos grandes proyectos a nivel mundial para evaluar la composición del microbioma intestinal y su relación con diversas enfermedades. El primero de los proyectos fue el Human Microbiome Project (HMP) que se aprobó en mayo de 2007 y que fue ejecutado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos. La investigación incluyó el análisis de 242 muestras de adultos y se reportaron 5177 perfiles taxonómicos [2] [3]. El segundo fue el proyecto Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHit) de la Unión Europea iniciado en el año 2008 [4]. Estos estudios demostraron que el tracto gastrointestinal contiene alrededor de 10^{14} microorganismos y el número de genes microbianos supera de 150 a 500 veces al número de genes humanos [5].

La microbiota intestinal consta de más de 1500 especies bacterianas, distribuidas en más de 50 filos diferentes; se tiene documentado que *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Fusobacteria* son los filos más dominantes y representan hasta el 90% de la población microbiana de una persona adulta [6]. La microbiota intestinal ejerce diferentes funciones que van a beneficiar la salud del hospedero, entre ellas la protección de la colonización de las superficies mucosas de diferentes patógenos [6], la secreción de sustancias antimicrobianas reforzando el sistema inmune [7], funciones nutricionales y metabólicas [8], mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, la proliferación y diferenciación de células epiteliales [9] y la participación en la comunicación cerebro-intestino interviniendo en el estado mental y neurológico [8][9][10].

Cuando se pierde la dinámica entre las especies bacterianas intestinales por diferentes situaciones asociadas al hospedero ocurre un proceso denominado disbiosis [11]. En esta alteración el aumento de bacterias patógenas modifican funciones metabólicas afectando la homeostasis general y específicamente la del epitelio intestinal, el desarrollo de células inmunes, el soporte de angiogénesis, la digestión de alimentos, metabolismo de las grasas y los carbohidratos [12]. La disbiosis puede producirse en cuestión de días, particularmente después de la ingesta de antibióticos, pero también está directamente relacionada con la dieta de cada individuo [13]. Los procesos de disbiosis microbiana se han vinculado a enfermedades intestinales y extraintestinales como la diabetes y la obesidad [11][13].

La obesidad se define como una enfermedad metabólica caracterizada por el aumento de la grasa corporal [14]. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que para el año 2016 el sobrepeso y la obesidad alcanzaron una prevalencia del 39% y el 13% respectivamente, se estima que hay más de 650 millones de personas obesas en el mundo [15]. En Colombia la última Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN) en el año 2015, reportó que en la población de 18 a 64 años uno de cada tres jóvenes y adultos tiene sobrepeso (37,7%), mientras que uno de cada cinco es obeso (18,7%) llegando a la alarmante cifra de que el 56,4% de la población colombiana presenta exceso de peso [16]. Este estudio sugirió que la obesidad es más frecuente en las mujeres (22,4%) que en los hombres (14,4%) [16]. Esta enfermedad se clasifica según el índice de masa corporal (IMC), que es la relación entre el peso en kilogramos y la talla en metros elevado al cuadrado. Un IMC superior a 30 kg/m² es indicativo de obesidad [17]. Diferentes reportes han demostrado que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [18].

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un desorden metabólico caracterizado por altos niveles de glucosa en la sangre como resultado de la combinación de una insuficiente secreción de la insulina pancreática o la resistencia a la acción de esta hormona [19]. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en su Atlas del año 2021 se reportó que 537 millones de adultos entre 20 y 79 años tienen diabetes, de ellos el 79,4% viven en países de ingresos bajos y medios. En América del Sur y América central 341 millones de personas tienen diabetes y 39 millones presentan intolerancia a la glucosa [20]. Los pacientes con DM2 pueden tener complicaciones agudas y crónicas que la convierten en una de las enfermedades más costosas, a nivel global se invierten 966 billones de dólares (USD) en su tratamiento [20]. En Colombia la mayor proporción de casos incidentes de diabetes está en el grupo etario de 55 a 69 años con el 43,77%, situación preocupante tratándose de una población económicamente activa [21]. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de obesidad y DM2 son (i) genéticos; (ii) una ingesta de alimentos ricos en calorías representados por azúcares, pero pobres en vitaminas, minerales, fibra y otros micronutrientes; y (iii) llevar un estilo de vida sedentario con poca actividad física [22][23]

En los últimos años diversas investigaciones han estudiado el papel fundamental de la microbiota intestinal en el desarrollo de obesidad y DM2; sin embargo, no se ha logrado llegar a un consenso sobre que grupos bacterianos están asociados directamente con el desarrollo de estas dos enfermedades metabólicas [24][25]. La complejidad de los estudios indica que la microbiota es dependiente de factores genéticos y epigenéticos propios de cada población [26]. La aparición de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han facilitado el estudio del gen 16S rRNA bacteriano, permitiendo la descripción metagenómica de estas comunidades microbianas [27]. En Colombia son pocos los reportes relacionados con la microbiota intestinal y se debe profundizar en la caracterización de las relaciones de diversidad bacteriana para relacionarla con las alteraciones metabólicas que presenta la población [28].

Por lo justificado anteriormente se planteó como objetivo principal, el estudio de los perfiles filogenéticos de la microbiota intestinal en adultos colombianos entre 40 a 70 años con factores de riesgo a DM2 y obesidad. El desarrollo y ejecución de la presente Tesis de Maestría hizo parte del macroproyecto “Obesidad y diabetes en Iberoamérica: Factores de

riesgo y nuevos biomarcadores patogénicos y predictivos”, financiado por el programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CyTED), como proyecto de la red IBEROBDIA (918PTE0540). A nivel nacional fue financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Colombia (MINCIENCIAS) y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia. Las actividades de reclutamiento de voluntarios y la caracterización de cada uno de ellos a nivel bioquímico y antropométrico se comparten con otros trabajos de investigación.

Marco Teórico

1.1 Composición y distribución de la Microbiota intestinal

En la actualidad existen tecnologías ómicas que ayudan en la elucidación de marcadores específicos de enfermedades y nuevos objetivos de diagnóstico, también para describir alteraciones funcionales en la fisiopatología de varias enfermedades y analizar la relación entre la microbiota intestinal y los metabolitos del hospedero [29]. El término microbioma hace referencia al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos; el complejo formado por el material genético del microbioma y del hospedero se conoce como metagenoma [27]. La metagenómica es el análisis del material genético de las bacterias intestinales [30][31].

La microbiota humana es un ecosistema complejo que incluye bacterias, hongos, arqueas, protozoos y virus; estos microorganismos logran una sinergia con su hospedero [30]. La organización, distribución y localización de la microbiota intestinal no es uniforme a lo largo del tracto gastrointestinal. La conformación de un ecosistema intestinal dinámico depende de varias propiedades fisicoquímicas como los diferentes gradientes de pH, micronichos y presiones parciales de oxígeno [32]. Actualmente se sabe que la microbiota intestinal también es dependiente de factores que van a determinar la diversidad y la estabilidad de la microbiota saludable. Estos factores son el modo de parto, patrones de alimentación del neonato, la genética del hospedero, ubicación geográfica, el estrés, consumo de dietas occidentalizadas, actividad física, el envejecimiento, estados patológicos (uso inapropiado de antibióticos) y una serie de factores intrínsecos especialmente la secreción de ácido gástrico, la secreción de inmunoglobulina A, la producción de péptidos antimicrobianos y la motilidad gástrica [26].

La colonización microbiana y el establecimiento de una microbiota intestinal se da principalmente durante el parto natural, los recién nacidos son colonizados por los microorganismos vaginales y rectales maternos. Las bacterias que hacen parte de esa se describen principalmente como *E. coli*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Prevotella*; esta

microbiota va a generar unas condiciones que permiten el establecimiento de una mayor diversidad, como lo son los miembros del filo Bacteroidetes [33]. En un parto por cesárea son las bacterias presentes en la piel materna las que van a colonizar el intestino del recién nacido como *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* [34].

El tipo de alimentación influirá en el establecimiento de la microbiota, cuando un bebé es alimentado con leche materna aumenta el género *Bifidobacterium* ejerciendo un efecto beneficioso intestinal; mientras que los neonatos que son alimentados con fórmula tienen una microbiota intestinal más diversa con la presencia de *Bacteroides*, *Lactobacillos* y *Clostridium*, sin embargo, se ha asociado a eventos repetitivos de alteración gastrointestinal [33]. La microbiota intestinal fluctúa durante los tres primeros años de vida con una variabilidad interindividual y una baja diversidad que se va volviendo más estable con el tiempo a medida que se van introduciendo diferentes alimentos en la dieta. A la edad de dos años la microbiota intestinal está conformada principalmente por los filos Firmicutes y Bacteroidetes, empezando a parecerse más a la microbiota de una persona adulta [35].

En la microbiota intestinal de una persona adulta el 90% de las bacterias pertenecen a dos filos principalmente, Bacteroidetes y Firmicutes. Las Actinobacterias, Proteobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia completan el 10% restante [32]. El grupo de los Firmicutes incluye bacterias Gram positivas, anaerobias obligadas con un bajo contenido de los nucleótidos guanina y citocina (G+C). Los principales géneros que se describen en el filo de los Firmicutes son *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Butyrivibrio* [36]. El segundo filo más abundante, los Bacteroidetes, incluye bacterias Gram negativas, anaerobias o aerobias y los géneros principalmente descritos son *Bacteroides*, *Prevotella* y *Porphyromonas* [37]. Las Actinobacterias son bacterias Gram positivas, con un alto contenido de G+C, anaerobias obligadas que cuenta con los géneros *Bifidobacterium*, *Colinsella* y *Atopobium* [38].

La carga microbiana a lo largo del tracto gastrointestinal humano no tiene un comportamiento homogéneo y a medida que se recorre desde el esófago hasta el recto distal hay una marcada diferencia en la diversidad y el número de bacterias [33]. El número

de microbios presentes por gramo en el esófago es de 10^1 , en el estómago y en el duodeno de 10^3 , de 10^4 a 10^7 en el yeyuno y finalmente de 10^{11} a 10^{14} en el colon [39]. En el esófago distal, el duodeno y el yeyuno el género bacteriano dominante es *Streptococcus*, en el estómago la mayoría de las bacterias no sobreviven por el pH bajo del medio, sin embargo, podemos encontrar los géneros bacterianos *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia* y la especie *Helicobacter pylori* [33] [40]. La microbiota del colon es la más diversa constituyendo más del 70% de todos los microorganismos que se encuentran en el cuerpo y está compuesta principalmente por bacterias anaerobias siendo los géneros predominantes *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Enterococcus* y también la familia Enterobacteriaceae. En la figura 1-1 se describe la distribución de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal

La literatura científica reporta que la dieta tiene un efecto rápido sobre la composición de la microbiota de una persona adulta, promoviendo el crecimiento de ciertos grupos bacterianos sobre otros [41]. La dieta mediterránea se caracteriza por una combinación de fibra (carbohidratos complejos), ácidos grasos poliinsaturados, compuestos bioactivos como flavonoides, fitoesteroles, terpenos y polifenoles; este tipo de dieta se ha asociado con el aumento de las familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Bifidobacteria*. Se describe una mayor diversidad bacteriana que favorece un mejor funcionamiento y control de la permeabilidad intestinal [42].

La dieta occidental se caracteriza por un alto contenido de grasas saturadas, cereales refinados, azúcar, sal, proteína animal, alcohol junto con un consumo reducido de frutas, verduras, micronutrientes como las vitaminas A, C, D, E y oligoelementos como el zinc, el fósforo, calcio, magnesio y potasio [42]. Esta dieta se ha asociado con una menor diversidad microbiana y con la abundancia del género *Prevotella* y *Xylanibacter*, así como también de bacterias tolerantes a la bilis, como *Alistipes*, *Bilophila* y *Bacteroides* [43]

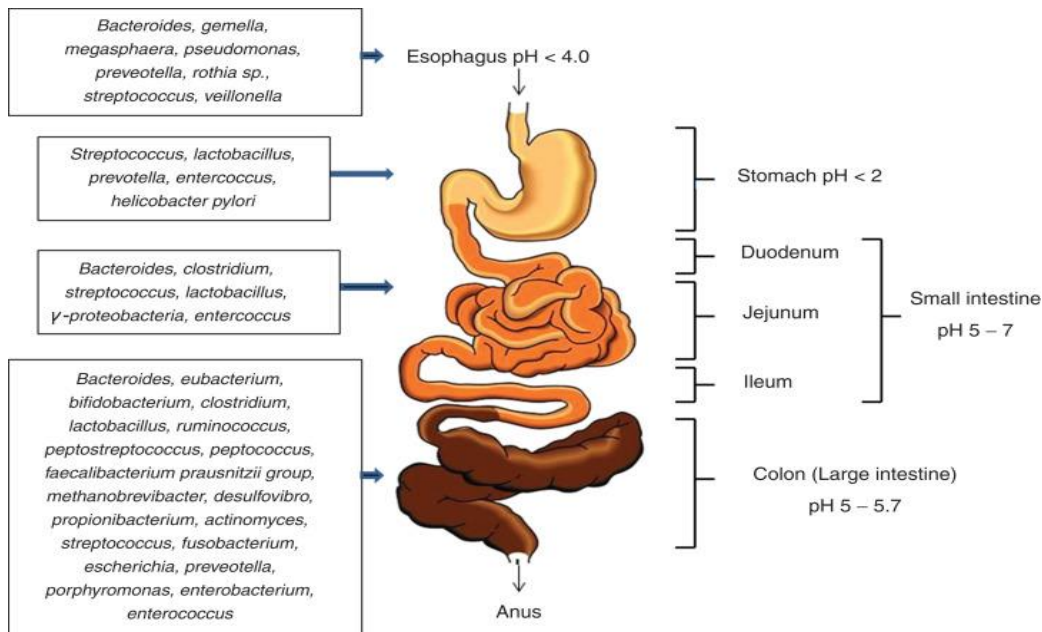


Figura 1-1: Distribución de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal. Tomado de Tunglund, et al, 2018 [33].

1.2 Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal cumple múltiples procesos beneficiosos para la salud del hospedero, participa directamente en la digestión de nutrientes, en el balance energético, la protección de la mucosa intestinal, la regulación del sistema neuroendocrino y del sistema inmunitario; en la producción de metabolitos y vitaminas vitales en el desarrollo del hospedero [5][30][44].

1.2.1 Digestión y metabolismo de nutrientes

Una parte de los carbohidratos que se consumen en la dieta como los oligosacáridos, la fibra dietética (polisacáridos no amiláceos como celulosas, hemicelulosas, pectinas y gomas) no son digeridos completamente por acción de las enzimas humanas. Esos residuos de oligosacáridos llegan al colon y son fermentados por la microbiota intestinal anaerobia que produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), de estructuras diversas como el formiato, propionato, acetato, butirato, valerato, isovalerato, hexanoato; otros ácidos orgánicos como el lactato y el succinato; la producción de alcoholes como el

metanol y el etanol; así también la liberación de gases como metano, hidrógeno y dióxido de carbono [45].

Los AGCC predominantes son el acetato, el propionato y el butirato. El acetato se encuentra en la sangre, sirve como fuente de energía para los tejidos periféricos en la lipogénesis y la biosíntesis de colesterol en el hígado [45]. El butirato sirve como fuente de energía de los colonocitos; en la regulación de la homeostasis energética, al estimular las células enteroendocrinas intestinales para la producción de leptina proveniente de los adipocitos; en la producción del péptido similar al glucagón en las células L y se ha visto también que reduce el efecto de los metabolitos nocivos de los ácidos biliares y los fenoles [46]. El propionato es transportado a través de los colonocitos y dirigido hasta el hígado donde es derivado a acetato [45]. Las bacterias que se reconocen como principales productoras de AGCC son *Roseburia spp*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii* y los grupos *Clostridiales IV* y *XIV* [47]. La microbiota intestinal produce vitamina K, y contribuye con las vitaminas del complejo B (B1, B8, B9 y B12). Se han reconocido que las cepas de bifidobacterias son las principales productoras de vitaminas del complejo B [48].

1.2.2 Protección de la mucosa intestinal

El tracto gastrointestinal es una barrera selectiva que incluye enterocitos (90-95%), células enteroendocrinas, calciformes, M o de Peyer y de Paneth. Las células calciformes son las encargadas de secretar glicoproteínas de mucina, las células de Paneth son las responsables de la secreción de péptidos antimicrobianos como las defensinas y las Reg-*gamma* que van a inhibir el crecimiento de determinados microorganismos [32]. La microbiota intestinal comensal es aquella habita de manera constante, siendo autóctona y que no provoca daño en el hospedero [49]. Esta microbiota regula la expresión de los genes que codifican la mucina (MUC-2, MUC-3) modificando su patrón de glicosilación, producción de péptidos antimicrobianos regulando la adhesión y la colonización de bacterias patógenas [32][50]. La microbiota intestinal comensal produce señales captadas por el sistema inmune innato ejerciendo un efecto trófico colaborando con la proliferación de células epiteliales y el mantenimiento de las uniones intercelulares estrechas fortaleciendo la integridad y la función del epitelio como barrera física frente a la entrada de bacterias patógenas [50][51].

1.2.3 Regulación de la respuesta inmune

La microbiota intestinal comensal se encuentra en un continuo estado de simbiosis con su hospedero, condición denominada eubiosis. Múltiples factores como el consumo prolongado de diversos medicamentos entre ellos los antibióticos, el estrés, factores genéticos, dietas ricas en grasas o con un alto índice glucémico y el estilo de vida pueden inducir a que se pierda este equilibrio simbiótico. En este estado hay pérdida de la diversidad microbiana, situación conocida como disbiosis. Cualquier alteración en la microbiota que genere disbiosis repercute directamente en el favorecimiento de diferentes patologías entre ellas la DM2 y la obesidad [32].

En eubiosis existe una comunicación constante entre el sistema intestinal y el inmune, debido a que la barrera intestinal contiene altas concentraciones de inmunoglobulina isotipo A secretora (IgAS), producida por las células de Peyer en la luz intestinal. Esta inmunoglobulina va a formar complejos específicamente con las bacterias comensales que pertenecen a la luz intestinal para empezar a presentar selectivamente los componentes bacterianos a las células dendríticas que inducen la producción de IL-10 de propiedades antiinflamatorias [52].

1.3 Asociación de la microbiota intestinal con DM2 y obesidad

1.3.1 Generalidades de la DM2 y la obesidad

La DM2 es una enfermedad metabólica caracterizada por la presencia de niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia) [20], esta condición se da por el desarrollo de resistencia a la insulina (RI) [53]. La insulina es una hormona secretada por el páncreas con acciones fisiológicas principalmente en el hígado, el músculo y el tejido adiposo responsables del metabolismo y almacenamiento de energía en el organismo [54].

La RI causa que las células β pancreáticas secreten más insulina en un proceso conocido como hiperinsulinemia compensatoria, que a la larga ocasiona un deterioro de las células β dando lugar a una hiperglucemia sostenida [54]. Adicionalmente va a contribuir al desarrollo de dislipidemia, hipertensión y aterosclerosis. A nivel molecular la RI es el

resultado de alteraciones en la señalización de la hormona, debido a mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de proteínas efectoras localizadas corriente abajo del mismo [55].

Los criterios de diagnóstico para DM2 establecidos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) son glucosa en sangre en ayunas ≥ 126 mg/dL, una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) ≥ 200 mg/dL, hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ y una glucometría aleatoria ≥ 200 mg/dL [56]. La condición de prediabetes hace referencia a un estado metabólico intermedio entre la homeostasis normal de la glucosa y la DM2 [57]. Son indicadores de prediabetes valores alterados de glucosa en sangre en ayunas entre 100 y 125 mg/dL, una PTOG entre 140 y 199 mg/dL y valores de 5,7% a 6,4% de HbA1c [56]. La prediabetes es un estado metabólico reversible, por ello es importante su detección y tratamiento temprano para evitar la progresión a DM2. Los parámetros más importantes en el manejo de la prediabetes son los cambios en el estilo de vida, valoración de los factores de riesgo cardiovasculares, medidas para normalizar el peso y el tratamiento de la hiperglucemia [58].

Una herramienta de tamizaje del riesgo a desarrollar DM2 es la encuesta Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC), diseñada en el año 2001 en un estudio prospectivo en población finlandesa [59]. Esta encuesta consta de preguntas relacionadas con la edad, medidas antropométricas, antecedentes familiares, estilo de vida, consumo de medicamentos para hipertensión arterial y control glucémico. A cada respuesta se le asigna un puntaje cuyo valor total se relaciona directamente con el porcentaje de factor de riesgo al desarrollo de DM2 en diez años. En Colombia la guía de práctica clínica de DM2 indica que un FINDRISC ≥ 12 puntos ya es de alerta por lo es recomendable control glicémico preprandial (en ayuno) [60].

La obesidad se define como la acumulación excesiva o la distribución anormal de la grasa corporal, que lleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 β (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL-6). La consecuencia del aumento en esas citoquinas promueve el estrés oxidativo, con disminución en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que conlleva a un estado inflamatorio permanente [61]. La obesidad se clasifica en obesidad grado I o moderada con un IMC de 30,0-34,9; obesidad grado II o severa con un IMC de 35,0-39,9 y de grado III o mórbida con un IMC $\geq 40,0$ [22][62]. La obesidad aumenta el riesgo de trastornos asociados con

alta mortalidad y morbilidad, como diabetes, hipertensión, cardiopatía coronaria, dislipidemia, enfermedad de la vesícula biliar y ciertas neoplasias malignas [63].

1.3.2 Relación de la disbiosis en el desarrollo de DM2 y obesidad

La evidencia de que la microbiota intestinal podría estar implicada en el desarrollo de DM2 y obesidad inició con estudios en modelos murinos [5]. Se transplantó heces de ratones con microbiota intestinal en condiciones fisiológicas a ratones libres de germen; se observó que estos últimos aumentaron en un 60% su tejido adiposo, desarrollaron RI, además de detectarse un incremento en los niveles de leptina y glucosa [64]. También se estudió la microbiota intestinal de ratones obesos con deficiencia en leptina, éstos presentaron bacterias con mayor expresión génica para enzimas que participan en la extracción de nutrientes, aumento de la fermentación a nivel intestinal y disminución de las calorías residuales en las deposiciones. Al trasplantar la materia fecal de ratones deficientes de leptina a ratones normopeso, estos últimos desarrollaron obesidad [65].

La disbiosis favorece el desarrollo de endotoxemia metabólica por los lipopolisacáridos (LPS) provenientes de bacterias Gram negativas; éstos aumentan cuando hay una ruptura de la barrera intestinal y una elevada permeabilidad intestinal [66]. Los LPS son transportados al torrente sanguíneo por medio de quilomicrones, que están elevados a raíz de dietas ricas en grasas [67][68]. Los LPS promueven el estado inflamatorio debido a que son reconocidos por dos receptores de membrana el Cluster de diferenciación 14 (CD14) y el receptor tipo Toll 4 (TLR4), expresados en la superficie de la membrana plasmática de los macrófagos; este reconocimiento activa la ruta de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas κ de las células B activadas (NF- κ B) lo que lleva a la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1, IL-6) [69].

En condición de eubiosis se promueve la producción de AGCC, éstos son ligandos de los receptores GPR41 y GPR43 que se encuentran en las células L enteroendocrinas intestinales. La respuesta efectora a la unión ligando-receptor, estimula la producción del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), del péptido similar al glucagón-2 (GLP-2) y el péptido YY (PYY) [70]. El aumento de GLP-1 promueve la secreción de insulina dependiente de la glucosa, la biosíntesis de insulina, la inhibición de la secreción del glucagón, el vaciado

gástrico, disminuye la inflamación y la apoptosis [71]. El GLP-2 interviene en el ensamblaje lipídico, mejora la función de la barrera intestinal y se cree que accede a distintas reservas de lípidos en el intestino para su movilización; el PYY se relaciona con el aumento del tránsito intestinal y la reducción del apetito [72][73]. En condición de disbiosis se altera la homeostasis metabólica dado que se pierde la regulación hormonal intestinal mencionada anteriormente.

El metabolismo de lípidos y lipoproteínas también se ve alterado en la situación de disbiosis. La microbiota intestinal participa en el metabolismo de ácidos biliares primarios a ácidos biliares secundarios, éstos se unen a los receptores FXR y TGR5 en el hígado. La señalización de la unión a los receptores FXR y TGR5 promueve el ensamblaje de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de densidad intermedia (IDL) y de baja densidad (LDL) [74].

1.4 Biomarcadores de Microbiota intestinal en DM2 y obesidad

Un biomarcador es un evento que se produce en un sistema biológico y se interpreta como indicador del estado de salud o del riesgo de enfermedad [75]. Se ha detectado en obesidad y DM2 un aumento del filo Firmicutes, sobre el filo Bacteroidetes [76]. En general los estudios indican que hay una disminución de las bacterias productoras de butirato, especialmente *Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii*; paralelamente se reporta el aumento de patógenos oportunistas como *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium hathewayi*, entre otros [77]. La tabla 1-1 describe biomarcadores de microbiota intestinal que se han correlacionado como posibles indicadores de obesidad y DM2.

Tabla 1-1: Estudios de biomarcadores microbianos para DM2 y obesidad

Tipo de estudio	Participantes	Indicadores clínicos.	Biomarcadores microbianos encontrados.	Referencia
Estudio analítico, transversal.	Género: masculino y femenino n=20 gemelos monocigóticos con DM2 y obesidad Edad:30-48 años	IMC, glucosa, perfil lipídico, insulina, HbA1c, PCR, ALT, AST, albumina	↑ del filo Firmicutes principalmente el género Roseburia. ↓ del filo Verrucomicrobia especialmente la especie <i>Akkermansia muciniphila</i>	[78]
Estudio experimental, transversal	Género: femenino n= 145 Edad: ≥ 70 años	Glucosa, PTOG,HbA1c,Péptido C, Perfil lipídico.	Voluntarias con DM2: ↑ <i>Clostridium clostridioforme</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Streptococcus mutans</i> <i>Clostridium hathewayi</i>	[79]
Estudio experimental, transversal	Género: masculino y femenino n= 123 normopesos y 169 obesos	IMC, leptina, adiponectina perfil lipídico, ácidos grasos libres, insulina y PCR.	Voluntarios obesos: ↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Anaerostipes</i>	[80]
Estudio experimental, transversal	Género: masculino y femenino n= 441 Edad: ≥ 18 a 62 años	Perfil lipídico, glucosa HbA1c,PCR, proteína de unión a LPS, IMC, perímetro de cintura.	Voluntarios sanos: ↑ <i>Akkermansia-Bacteroidales</i> y <i>Ruminococcaceae</i> Voluntarios obesos: ↑ <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterobacter hormaechei</i>	[28]
Estudio de cohorte	Género: masculino y femenino n= 484 Edad: ≥18 a 59 años	Insulina,HbA1c,HOMA-B,glucosa,PTOG,vitamina D.	Voluntarios prediabéticos y diabeticos: ↑ <i>Clostridium clostridioforme</i> y <i>Clostridium bolteae</i> ↓ <i>Faecalibacterium</i> , <i>Alistipes</i> , <i>Pseudoflavonifractor</i> , <i>Oscillibacter</i>	[81]
Estudio experimental, transversal	Género: masculino y femenino n= 32 obesos y 32 normopeso Edad: 18 a 25 años	Glucosa Perfil lipídico Niveles de LPS en suero.	Voluntarios obesos: ↑ <i>Clostridium leptum</i> y el género <i>Lactobacillus</i> . ↓ <i>Prevotella</i> y la especie <i>E. coli</i>	[82]

En la columna de biomarcadores ↑ indica el aumento y ↓ indica la disminución del filo, género o especie.

1.5 Secuenciación de nucleótidos en la microbiota intestinal

La metodología utilizada tradicionalmente para el estudio de bacterias intestinales es el cultivo, sin embargo, éste presenta grandes limitaciones como el tiempo requerido para el aislamiento bacteriano, la baja sensibilidad, y la reproducibilidad de los resultados [83]. Actualmente, gracias al avance de técnicas moleculares se ha logrado identificar que solo entre un 10% al 30% de las bacterias intestinales son cultivables [84].

Las técnicas moleculares han permitido el estudio y la secuenciación del gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (16S rRNA) [85]. Este gen 16S rRNA tiene una longitud de aproximadamente 1.550 pb y está compuesto por regiones hipervariables y conservadas; es utilizado con fines filogenéticos ya que tiene una estructura caracterizada por regiones hipervariables (V1-V9), flanqueadas por regiones ultraconservadas críticas para las funciones ribosómicas. Las regiones hipervariables actúan como marcadores filogenéticos para la diferenciación de especies bacterianas, mientras que las regiones conservadas sirven para el diseño y la unión de primers o cebadores universales [83]. Para llevar a cabo el proceso de secuenciación se seleccionan regiones al comienzo del gen, en la región de 540 pb o al final de la secuencia completa del gen en el diseño de los primers [86].

Durante este siglo se desarrollaron las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés next-generation sequencing). Se caracterizan por el aumento exponencial en la producción de datos de secuenciación, gracias a que se analizan masiva y paralelamente varias muestras a la vez. Las plataformas de segunda generación o de “lectura corta” tienen como principales representantes al sistema Illumina y al sistema Ion Torrent [87][88]. La tecnología de secuenciación Ion Torrent utiliza un chip semiconductor y se basa en la detección de iones de hidrógeno cargados positivamente que van a generar un cambio de pH y de voltaje que son detectados por un sensor ISFET (Ion-Sensitive Field-Effect Transistor) [89].

Para lograr la secuenciación en estudios de microbiota intestinal con Ion Torrent, se debe realizar una librería genética que incluye la fragmentación del ADN, la amplificación del ADN con primers específicos del gen 16S rRNA, ligación de adaptadores (barcoding), reparación del ADN y la preparación de un templado que se obtiene mediante PCR

(proceso de reacción en cadena de la polimerasa) en emulsión. En esa metodología de PCR, cada fragmento de ADN se deposita en micromicelas, que provienen de una emulsión aceite - agua [89][90]. Las reacciones de secuenciación se realizan en fase sólida, al adicionar microesferas que en su superficie están marcadas con la secuencia complementaria de los adaptadores. Se promueve la unión de los millones de fragmentos ADN a secuenciar con las microesferas; la muestra enriquecida es cargada dentro de los pozos del Ion Chip. La amplificación de las secuencias se realiza incorporando un único desoxirribonucleótido trifosforilado (dNTP), con liberación del anión pirofosfato y un ion de hidrógeno. Ese protón genera el cambio de voltaje que se detecta como la lectura del nucleótido incorporado. La figura 1-2 esquematiza los principales pasos para la secuenciación de la microbiota [87].



Figura 1-2: Principales pasos en la secuenciación de microbiota. En (1) el ADN extraído de las heces se utiliza para amplificar las regiones hipervariables de la subunidad 16S ribosomal; en (2) los amplificados son codificados por la unión a secuencias de marcaje conocidas; en (3) esas codificaciones o librerías se purifican y se ajusta su concentración mediante PCR en tiempo real; (4) las librerías se amplifican mediante PCR en emulsión y (5) se realiza la secuenciación de nucleótidos en la plataforma Ion Torrent.

Las plataformas Ion Torrent fueron las primeras de secuenciación comercial que no requirieron de fluorescencia ni luminiscencia, que dio como resultado una mayor velocidad de secuenciación, maneja diferentes chips que difieren en cuanto a la cantidad de pozos permitiendo una producción de datos hasta máximo de 50 Gb/día, el tiempo de secuenciación oscila entre 7 a 19 horas [91]. Dentro de las desventajas que presenta la secuenciación con Ion Torrent es que debido a su principio de detectar iones de hidrógeno, se dificulta la detección de varias bases idénticas consecutivas en un fragmento de ADN conocidas como homopolímeros [90].

Objetivos

2.1 Objetivo General

Estudiar perfiles filogenéticos de la microbiota intestinal en adultos colombianos entre 40 a 70 años con factores de riesgo a diabetes mellitus (DM2) y obesidad.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Analizar el perfil genético de la microbiota intestinal en muestras de materia fecal.

2.2.2 Identificar perfiles diferenciales de la microbiota intestinal y su relación patogénica con DM2 y obesidad.

2.2.3 Correlacionar la microbiota intestinal con los parámetros nutricionales de los voluntarios.

2.2.4 Correlacionar la microbiota intestinal con los parámetros clínicos de los voluntarios.

Materiales y métodos

La ejecución de este proyecto se desarrolló en el grupo de investigación de Bioquímica y Biología Molecular de Micobacterias (BBMM) del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, y en el Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos (LHICA). de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Santiago de Compostela (Lugo-España).

El desarrollo de las actividades experimentales obtuvo dictamen favorable con código de registro 2018/270 del 20 de septiembre de 2018 del Comité Autonomo de Ética de Investigación de Galicia (Santiago de Compostela) (Anexo A1) y por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia por medio del acta 02 del año 2019 (Anexo A2). El diseño experimental del presente estudio es de tipo descriptivo, analítico y de corte transversal. Se hizo el reclutamiento de voluntarios provenientes de diferentes geografías del país, de ellos se obtuvieron las muestras biológicas de sangre para los análisis bioquímicos y de heces para análisis genómicos.

3.1 Reclutamiento de voluntarios

Los voluntarios se reclutaron de marzo del 2019 a marzo del 2020, se usó material de divulgación que incluyó un video interactivo, folletos, pendones y volantes informativos que se compartieron en el correo institucional de la Universidad Nacional, con familiares de pacientes diabeticos de la Asociación Colombiana de Diabetes y redes sociales. Se realizaron jornadas de salud gratuitas desarrolladas en las ciudades de Bogotá, Medellín e Ibagué y en los municipios de Cáqueza, La Vega, Usme y Une del departamento de Cundinamarca y también en Circasia (Quindío). Con la llegada de la emergencia sanitaria por Covid-19 no fue posible realizar jornadas en otras zonas geográficas colombianas.

3.1.1 Criterios de inclusión

Se seleccionaron voluntarios hombres y mujeres colombianos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión (i) un rango de edad entre 40 y 70 años; (ii) sin diagnóstico

de diabetes y sin medicación para esta patología y *(iii)* estar en estado de ayuno no mayor a 8 horas.

3.1.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión de la investigación incluyó a voluntarios con las siguientes características *(i)* ser menor de 40 años o mayor de 70 años; *(ii)* mujeres en estado de embarazo; *(iii)* personas con discapacidad mental; *(iv)* con consumo reciente o a la fecha de la toma de muestra de medicamentos hipoglucemiantes, antibióticos, antihipertensivos, alfa-adrenérgicos, anfetaminas, betabloqueadores, calcio-antagonistas, opiáceos, neurolépticos, fenotiazinas y antidepresivos tricíclicos y también probióticos, prebióticos como tratamiento médico; *(v)* voluntarios que no entregaban muestras de heces o la cantidad fue insuficiente para el análisis; *(vi)* voluntarios con historias clínicas o con el cuestionario de frecuencia de alimentos incompleto.

Los voluntarios recibieron un documento que contenía la información del proyecto y el consentimiento informado (Anexo B). En éste se describían las muestras biológicas que serían donadas a la investigación y los procedimientos a realizar; también se indicaba la posibilidad de abandonar el proyecto en cualquier momento. Cada voluntario con su firma autorizó la toma de muestras, los procedimientos de análisis y el tratamiento de datos según la ley 1581 del año 2012. A cada consentimiento informado se le asignó un código para la identificación de las muestras biológicas. Este documento quedó bajo custodia del grupo de investigación.

3.2 Protocolo de reclutamiento

Luego de firmar el consentimiento informado cada voluntario pasaba a la valoración médica que incluyó, *(i)* la medida de la tensión arterial (tensiómetro Welch Allyn); *(ii)* la talla (tallímetro-estadímetro portátil SECA modelo 213); *(iii)* el perímetro de cintura se midió entre el borde inferior de la décima costilla y el borde superior de la cresta ilíaca en espiración, el procedimiento se realizó después de una espiración normal con una cinta métrica plástica con una precisión de 1mm (LORD) LDC-338; *(iv)* diligenciamiento de la historia clínica; *(v)* glucometría en ayunas (glucómetro Roche y kit Accu-check).

Las medidas antropométricas se realizaron en una balanza Omron modelo Hbf-514c (healthcare, Inc USA). Luego de ser calibrado el equipo, a cada voluntario se le solicitó el retiro de calcetines, y elementos metálicos, colocando los pies sobre los electrodos de la balanza, en posición erguida con mirada al frente y empuñando los electrodos para cerrar el circuito. En el formulario se diligenciaron los valores de masa corporal (Kg), IMC (Kg/m^2), porcentajes de grasa corporal total, grasa visceral y musculo.

Con los datos correspondientes se diligenció el cuestionario FINDRISC (Anexo C), según el puntaje obtenido en este cuestionario se le explicó a cada voluntario su nivel de riesgo a desarrollar DM2 en 10 años.

El universo de la población reclutada fue 620 mujeres y hombres colombianos, de éstos completaron el protocolo 535 voluntarios. Se seleccionaron para el análisis genómico de microbiota 85 voluntarios, en general caracterizados por FINDRISC, antecedentes familiares de DM2 e IMC.

3.3 Cuestionario de frecuencia de alimentos

Cada voluntario diligenció un cuestionario de frecuencia de alimentos (FFQ) validado en población colombiana anteriormente para conocer la ingesta de macro, micronutrientes y el consumo energético en kilocalorías (kcal) [92]. Este cuestionario consta de una lista de 60 alimentos agrupados según su contenido nutricional, con una frecuencia de consumo diaria, semanal, mensual y anual (Anexo D), para calcular la ingesta individual de nutrientes se usó la herramienta NutCal® versión 1.2. Hasta la fecha se han analizado 511 voluntarios, el proceso de alimentación del Software continua bajo la asesoría del Doctor Oscar Fernando Herrán de la Universidad Industrial de Santander

3.4 Toma de muestra sanguínea y PTOG

Los voluntarios que accedieron a donar muestra sanguínea se les extrajo sangre por punción venosa utilizando el sistema vacutainer en tubos secos tapa amarilla con gel separador para extraer suero. Luego de la formación del coagulo las muestras de sangre se centrifugaron a $1600 \times g$ por 10 minutos para la separación de suero que fue almacenado a -70°C en alícuotas de 500 μl hasta su uso.

Los voluntarios que presentaron FINDRISC ≥ 12 con glucometría < 126 mg/dl, y que accedieron realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), se les suministró una carga de glucosa del 21,4% (75g GLU anhidra en 350 mL de agua) inmediatamente después de la extracción de sangre venosa. A estos voluntarios se les indicó que no consumieran ningún tipo de alimento o bebida, que no fumaran y que permanecieran en estado de reposo por 2 horas. Al cabo de este tiempo se les volvió a tomar una muestra sanguínea, en tubo seco, para determinar la concentración de glucosa en suero como confirmación de un posible diagnóstico de DM2 o intolerancia oral a la glucosa [60].

3.5 Recolección de muestra de materia fecal

Previo a la fecha de la jornada de salud, a cada voluntario se le solicitó traer una muestra de materia fecal lo más fresca posible. Las cajas coprológicas fueron entregadas con anterioridad a la jornada y se acompañó de un boletín con las indicaciones para la recolección de la muestra recalando un previo aseo, que se evitara la contaminación con orina y que la muestra se entregara marcada con el nombre del voluntario y con la fecha de recolección. Para las muestras recolectadas varias horas antes se les solicitó que fueran refrigeradas hasta el momento de la entrega, estas se codificaron de acuerdo con el consentimiento informado de cada voluntario y se congelaron a -80°C hasta el momento de su uso.

3.6 Análisis bioquímicos

A cada voluntario se le determinaron los siguientes metabolitos en suero, glucosa (GLU), colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol HDL (c-HDL), colesterol LDL (c-LDL) y colesterol VLDL (c-VLDL). Para el protocolo de análisis de estos metabolitos se utilizó kits de la casa comercial Spinreact, cuyo mecanismo es de reacciones enzimático colorimétricas y con detección espectrofotométrica a 505 nm. Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante; en cada prueba se incorporaron controles normales y patológicos de marca Spinreact. El cálculo del colesterol VLDL se realizó dividiendo el valor de los TG entre 5, dado que el resultado fue expresado en términos de mg/dL. Para el cálculo del colesterol LDL se aplicó la fórmula de Friedewald [93], que indica que esta lipoproteína es igual al resultado proveniente de sumar el c-HDL con el c-VLDL y ese valor restarlo del CT, $[\text{c-LDL} = \text{CT} - (\text{c-HDL} + \text{c-VLDL})]$.

3.7 Extracción de ADN de materia fecal

Mediante el kit DNeasy Power Soil (Qiagen, Inc Alemania) se realizó la extracción de ADN presentes en las heces, siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones que permitieron optimizar la concentración y pureza del ADN. El protocolo inició pesando aproximadamente 300 mg de las heces en los tubos que contienen las perlas de vidrio. Para la fase de lisis se incubaron las muestras con 60 µl de la enzima lisozima a 10 mg/ml por 10 minutos a temperatura ambiente; se adicionaron 60 µl de SDS al 10% y junto con la acción mecánica de las perlas de vidrio y vortex fuerte por 10 minutos se garantizó la lisis bacteriana. Luego de centrifugar a 10.000 xg por 1 minuto se hizo la recolección del sobrenadante en un tubo eppendorf estéril; se realizó la fase de pretratamiento con reactivos precipitantes para eliminar restos celulares, diferentes macromoléculas y residuos sólidos que fueron retirados por centrifugación. Se garantizó la solubilidad total del ADN mediante cloruro de guanidinio - isopropanol (buffer de unión), esta disolución se aplicó a la columna de sílica gel retirando el filtrado por centrifugación. La fase de lavado de la sílica- ADN se realizó con etanol al 70%, mediante centrifugación. La elución del ADN se realizó con 100 µl del buffer Tris HCl 20mM pH 8,5. Se midió la concentración y calidad del ADN en términos de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 por espectrofotometría (NanoDrop) y fluorométricamente mediante el sistema Qubit (kit 1X dsDNA High Sensitivity). Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.8 Secuenciación de ADN

Se utilizó la plataforma Ion Torrent S5 de ThermoFisher y el kit Ion 16 STM Metagenomics de catálogo A26216, para la secuenciación de nucleótidos de la población bacteriana proveniente de la microbiota de los voluntarios. Las regiones hipervariables del gen 16S rRNA se amplificaron mediante el kit Ion 16STM Metagenomics (ThermoFisher Scientific, Inc USA), por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El kit consta de dos juegos de primers específicos del gen 16S rRNA, patentados por la casa comercial. El primer grupo de primers está dirigido a las regiones hipervariables 2, 4 y 8; el segundo grupo está dirigido a las regiones hipervariables 3,6,7 y 9, por lo que se amplifican 7 regiones hipervariables, generalmente para el primer set de primers se tienen longitudes de amplicones de ~ 250 pares de bases (pb), ~ 288 pb y ~ 295 pb, respectivamente y para

el segundo juego de primers se tienen longitudes de amplicon de ~ 215 pb, ~ 260 pb, y ~ 209 pb. Estos juegos de primers fueron diseñados para cubrir >80% de las secuencias encontradas en diferentes bases de datos [94]. Se usó como control positivo de amplificación ADN proveniente de la cepa *E.coli* DH10B y como control negativo agua grado molecular. Los experimentos de amplificación se realizaron por duplicado para las muestras y controles, el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los amplicones fueron purificados usando el kit de perlas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc USA) y etanol al 70%; éstos fueron cuantificados mediante el sistema Qubit. La producción de las librerías genéticas se realizó utilizando el kit Ion Plus Fragment Library (ThermoFisher Scientific) y 80 ng de cada amplicon en un volumen de 79µl. Las librerías se caracterizan por el marcaje de cada amplicon con unas secuencias cortas de ADN conocidas como barcodes que permiten la diferenciación entre muestras. Luego del proceso de marcaje se hace una purificación usando el kit de perlas AMPure XP y etanol al 70%. Con el objetivo de determinar la concentración de la librería genética de la microbiota, previamente se preparó una curva de calibración utilizando como patrón cuatro diluciones seriadas en base 10 de la librería de *E. coli* DH10B 6,8 pM (estándar incluido en el kit Ion Universal Library Quantitation de ThermoFisher Scientific). Se preparó una dilución 10^3 de las librerías de microbiota y junto con las diluciones del patrón se amplificaron, por duplicado, mediante qPCR en el equipo QuantStudio 12K Flex (ThermoFisher Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante. Luego del procesamiento de los datos, las librerías de microbiota se ajustaron a una concentración de 10 pM.

El proceso de secuenciación de nucleótidos se realizó en el equipo Ion Torrent S5; previamente se utilizaron los kits Ion One Touch2™ y el Ion PGM™ Hi-Q™ que incluye las Ion esferas (contienen las secuencias complementarias de las regiones hipervariables). Junto con estas Ion esferas y las librerías de microbiota diluidas hasta 0.064 pM se generó el templado que fue cargado en el Ion chip utilizando Ion 520™ Chip Kit (Thermo Fisher Scientific, Taiwan). En cada Ion Chip la cantidad máxima de muestras que se pueden secuenciar son 48 y el tiempo total de secuenciación la plataforma Ion S5 es de 7 horas.

3.9 Análisis bioinformáticos

Se utilizó el sistema operativo Ubuntu para la instalación del software QIIME 2™ necesario para el análisis de los resultados de la secuenciación de nucleótidos. Los archivos en formato BAM y en formato FASTQ se obtuvieron del software Torrent suit (v.5.12.2.), las secuencias en formato FASTQ fueron analizadas por el software QIIME 2™ versión 2021.8 [92]. Para obtener el número de lecturas y la visualización de la calidad, los archivos FASTQ fueron comprimidos y demultiplexados dado el uso de barcodes en el sistema Ion Torrent. EL algoritmo DADA2 permitió filtrar las secuencias en función de su calidad, en este caso se eliminaron aquellas con un Q score ≤ 30 , lo que permite eliminar el ruido o posibles quimeras. Las secuencias únicas que presentaron una abundancia total menor de diez taxones fueron removidas, asimismo, aquellas que solo aparecían en una única muestra también fueron eliminadas. Finalizado el proceso de denoising o de limpieza se llevó a cabo la asignación taxonómica utilizando “qiime feature-classifier classify-consensus-vsearch” por comparación con la base de datos Greengenes (13_8) con el 99% de identidad de secuencias. Se generaron barplots interactivos en QIIME 2 de las unidades taxonómicas (OTUs), para la visualización de la clasificación taxonómica. El flujo de trabajo para los análisis taxonómicos se describe en la figura 3-1.

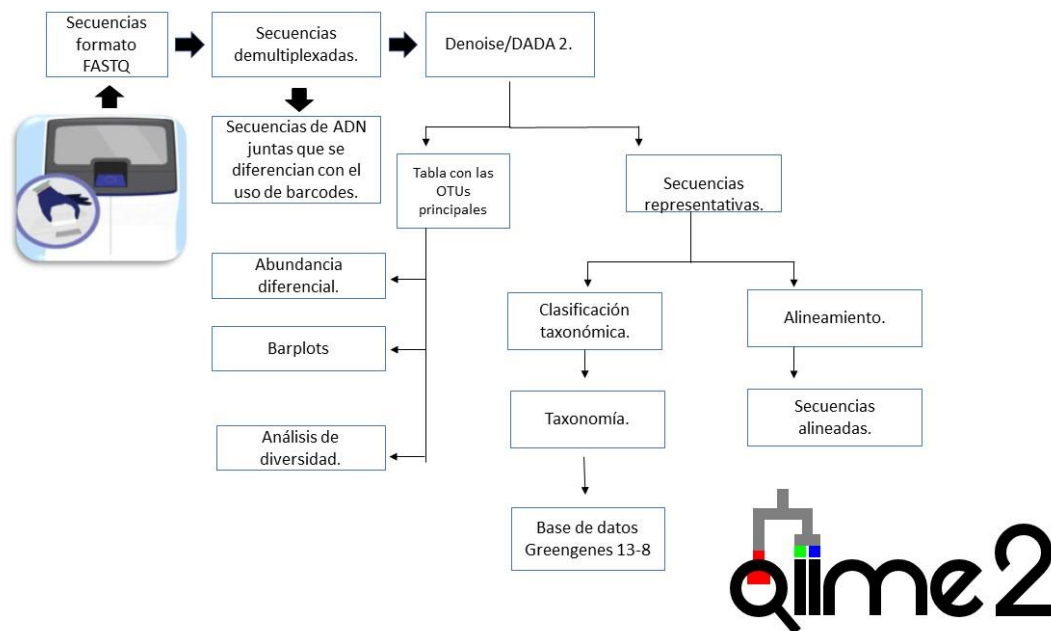


Figura 3-1: Flujograma de trabajo en el análisis taxonómico de muestras de ADN.(adaptada del software QIIME 2™ V. 2021.8 [95].

3.10 Análisis estadísticos

Los datos básicos y los resultados de las pruebas bioquímicas obtenidos de las muestras de suero de los voluntarios fueron analizados estadísticamente en el Software STATGRAPHICS Centurion XVI.I. La distribución se determinó variable a variable, el IMC y su discriminación en normopeso (NP), sobrepeso (SP) y obesidad (OB) fue la variable con la que se contrastaron las demás. Se aplicó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos. El cálculo de p permitió determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos; se utilizó el test de análisis de varianza ANOVA para variables con distribución normal, para el cálculo de p . El test de Kruskal wallis para variables con una distribución no normal fue utilizado para el cálculo de p . Se asignó el rango para $p \leq 0,05$ en un intervalo de confianza \geq del 95% [96].

En el análisis de microbiota se determinó la posible relación entre las frecuencias de abundancia relativa (FAR) de los taxones microbianos con diferentes variables de interés. Se utilizó el Software de uso libre R 4.1.2, para conocer si las variables tenían una distribución normal o no, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, esto con el fin de saber que coeficiente de correlación se adecuaba más con los datos. Se concluyó que el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) era el indicado para el análisis a excepción del análisis que se realizó con la familia Ruminococcaceae en relación con los niveles de glucosa de los voluntarios con el que se usó el coeficiente de correlación de Pearson, debido a que las dos variables presentaron una distribución normal (Anexo G).

Los análisis diversidad alfa y beta de los perfiles génicos del 16S rRNA se realizaron en el Software MicrobiomeAnalyst. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA, en la determinación de los índices de Shannon y el Chao1 para evaluar la diversidad alfa. Se realizó un análisis PERMANOVA con la prueba de Barty Curtis para calcular la diversidad beta. Estas pruebas estadísticas se realizaron a nivel de las OTUs Se usaron los archivos correspondientes a la taxonomía en formato.txt, la OTU/ASV tabla y un archivo "Metadata", con la información de las muestras, también en formato txt, obtenidas en el análisis bioinformático.

Los posibles biomarcadores diferenciales de la microbiota intestinal fueron valorados mediante la prueba estadística LEfSe que aplica un análisis discriminativo lineal (LDA). Basado en el efecto del tamaño. Para que sea significativo se empleó un algoritmo del LDA

score de 2.0 con aplicación de corrección del valor p valor por el método FDR (False Discovery Rate), con un nivel de significancia del 90% (Anexo F).

Resultados y discusión

4.1 Características generales de los voluntarios

La población de voluntarios atendidos en las jornadas de salud fue de 620, mujeres y hombres con edad entre 40 y 70 años. Luego de la valoración médica que incluyó las medidas de glucometría, tensión arterial, antropométricas e historia clínica se excluyó el 14% de los participantes (n=85). Generalmente estos voluntarios padecían de enfermedades crónicas o agudas diagnosticadas previamente, y/o estaban consumiendo medicación para éstas. Se excluyeron aquellos que no donaron muestra de sangre o fue insuficiente para completar los análisis bioquímicos; de igual forma, quienes no donaron la muestra de materia fecal también debieron ser excluidos.

Los voluntarios que cumplieron el protocolo básico de reclutamiento (para análisis metabólico) fueron 535 (86%); de éstos 348 (65%) correspondieron a mujeres y 187 (35%) fueron hombres. Las características generales de la población se describieron en términos de las medidas realizadas en la valoración médica (tabla 4-1), los análisis bioquímicos (tabla 4-2) y FINDRISC e índices aterogénicos (tabla 4-3).

Las medidas de masa corporal según el género muestran que las mujeres tuvieron un promedio de $66,4 \pm 11,7$ Kg y los hombres de $75,8 \pm 13,2$ Kg; la asociación de los datos entre cada grupo tiene una significancia estadística con valor $p = < 0,0001$. La tabla 4-1 muestra diferencia estadística entre la masa corporal desde los voluntarios normopesos a los obesos. Los valores promedio para la talla (1,56 a 1,60 m) reflejan una estatura media baja dada a la alta participación de mujeres en el estudio. La estatura promedio en los hombres fue de $1,67 \pm 0,07$ m y en las mujeres de $1,54 \pm 0,7$ m.

Tabla 4-1: Caracterización clínica de los voluntarios

Variable	Normopeso (IMC 18,0-24,9 kg/m ²) n=158 (30%)	Sobrepeso (IMC 25,0-29,9 kg/m ²) n=238 (44%)	Obesidad (IMC > 30,0 kg/m ²) n=139 (26%)	Valor p*
Masa corporal (kg)	58,6 ± 7,5 57,5 (45,0 - 83,5)	70,4 ± 8,3 69,3 (52,6 - 97,4)	81,8 ± 12,9 78,6 (60,7 - 137,6)	< 0,0001
Talla (m)	1,60 ± 0,09 1,59 (1,42 - 1,85)	1,60 ± 0,09 1,60 (1,40 - 1,83)	1,56 ± 0,09 1,55 (1,40 - 1,88)	< 0,0001
IMC (Kg)/m ²)	22,6 ± 1,6 22,8 (18,5 - 24,9)	27,3 ± 1,3 27,4 (25,0 - 29,9)	33,1 ± 3,6 31,8 (30,0 - 49,6)	< 0,0001
Edad (años)	55 ± 8 55 (40 - 70)	55 ± 8 56 (40 - 70)	55 ± 8 55 (40 - 70)	0,6548
Tensión arterial sistólica (TAS) VR (120 mmHg)	114 ± 12 112 (92 - 160)	120 ± 10 120 (70 - 160)	125 ± 15 124 (80 - 200)	2,67*10 ⁻¹²
Tensión arterial diastólica (TAD) VR (80 mmHg)	75 ± 9 73 (56 - 100)	78 ± 12 78 (58 - 100)	79 ± 9 79 (58 - 120)	< 0,0001
Perímetro de cintura (PC) (cm)	82 ± 7 82 (66 - 96)	93 ± 7 94 (71 - 110)	104 ± 10 104 (77 - 144)	< 0,0001
Grasa total (%)	29,2 ± 8,3 31,3 (8,4 - 63,0)	36,2 ± 8,3 38,6 (19,0 - 46,7)	43,7 ± 7,0 45,6 (25,6 - 59,7)	< 0,0001
Grasa visceral (%) VR ≤9%	6 ± 2 6 (2 - 10)	10 ± 2 10 (6 - 17)	13 ± 4 12 (8 - 30)	< 0,0001
Músculo (%)	29,5 ± 5,3 27,4(20,3 - 42,0)	27,7 ± 4,8 26,5 (19,7 - 39,6)	24,7 ± 4,1 23,8 (15,2 - 33,6)	< 0,0001

* Cálculo del valor *p*, se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas y el test de ANOVA para variables paramétricas. Valores de *p*>0,05 no tienen significancia estadística. Para las celdas que representan las variables la primera línea corresponde al promedio ± la desviación estándar y la segunda línea (en cursiva) reporta la mediana y en paréntesis valores mínimo-máximo. VR indica valor de referencia [15] [97].

El IMC es la relación entre la masa y la talla al cuadrado; tiene relevancia por su asociación con patologías metabólicas como la obesidad y diabetes [98]. Para la población de estudio se determinó que mujeres y hombres presentaron un valor promedio de 27,7 ± 4,0 Kg/m²; con un valor mínimo de 18,5 Kg/m² y máximo de 49,6 Kg/m². Los resultados indicaron que no se registraron participantes con algún grado de desnutrición, representado por IMC< 18,5 Kg/m². La población se discriminó de acuerdo con el IMC, en normopeso (NP) con el 30% de los voluntarios (n=158), en sobrepeso (SP) el 44% (n=238) y con obesidad (OB) el 26% (n=139). La condición de obesidad fue valorada en 139 voluntarios (26%), de estos varios padecían obesidad grado III o mórbida representado por IMC ≥ 40 Kg/m².

Los resultados evidencian que el 70% de la población analizada tiene alteración a nivel de este indicador antropométrico, hacia un exceso de masa corporal. En el año 2015 la encuesta nutricional ENSIN reportó en población colombiana de 18 a 65 años que el 56,5 % de los participantes se encontraron en sobrepeso u obesidad, este valor reveló un aumento del 5,2% en la prevalencia de estas dos condiciones respecto a lo reportado en el año 2010 .[16][99][100].

El rango de edad para la población reclutada fue entre 40 y 70 años el promedio y la mediana fue de 55 años en los tres grupos (NP, SP, OB) dado que aquellos voluntarios cercanos a los 70 años fueron de los más excluidos por la presencia de patologías o consumo de medicamentos entre ellos para la hipertensión arterial (HTA). La medida exploratoria de tensión arterial sistólica (TAS) y diastólica (TAD) se encontró dentro de los valores de referencia fisiológicos, sin embargo, hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos discriminados por IMC, se observa que la tensión arterial va en aumento de normopeso a sobrepeso y de sobrepeso a obesidad (tabla 4-1). Los estudios indican que el 60% de la hipertensión arterial es atribuible a un exceso de masa corporal; la obesidad contribuye a la HTA principalmente por mecanismos como el desarrollo de la resistencia a la insulina (RI) y el incremento en el gasto cardíaco [101].

El perímetro de cintura (PC) es un indicador de obesidad abdominal, está relacionado con la RI y el síndrome metabólico [102]. De acuerdo con reportes en población colombiana, los valores de PC que mejor discriminaron la presencia de RI son para mujeres ≥ 89 cm y hombres ≥ 91 cm [103][104]. Los resultados en la población analizada mostraron diferencias estadísticamente significativas para el PC entre los diferentes grupos de IMC, especialmente el grupo de obesidad que superó el valor de referencia con un promedio 104 ± 10 cm, de acuerdo con la literatura ese rango estaría prediciendo RI en esos voluntarios [105][106].

Teniendo en cuenta el género, el 58% de la población femenina (n= 201) presentó valores mayores a 89 cm de perímetro de cintura, de éstas el 27% (n= 93) estaban en condición de obesidad; el 28% (n= 99) sobrepeso e incluso se detectó que el 3% de las mujeres con normopeso n= 9 tuvieron alteración del PC. Se ha reportado que los accidentes cardiovasculares y la muerte súbita son más frecuentes en los hombres, especialmente en aquellos que están entre la quinta y la sexta década, altos valores de PC se han asociado con estos eventos cardiovasculares [107]. Los resultados mostraron que la población

masculina presentó mayor alteración del PC que las mujeres, en ellos se registró un 87% (n= 162) con PC mayor a 91 cm, incluso en la población normopeso se evidenció esta alteración en un 24% (n= 44), en los sobrepeso en un 43% (n= 81) y en los obesos en un 20% (n= 37) (figura 4-1).

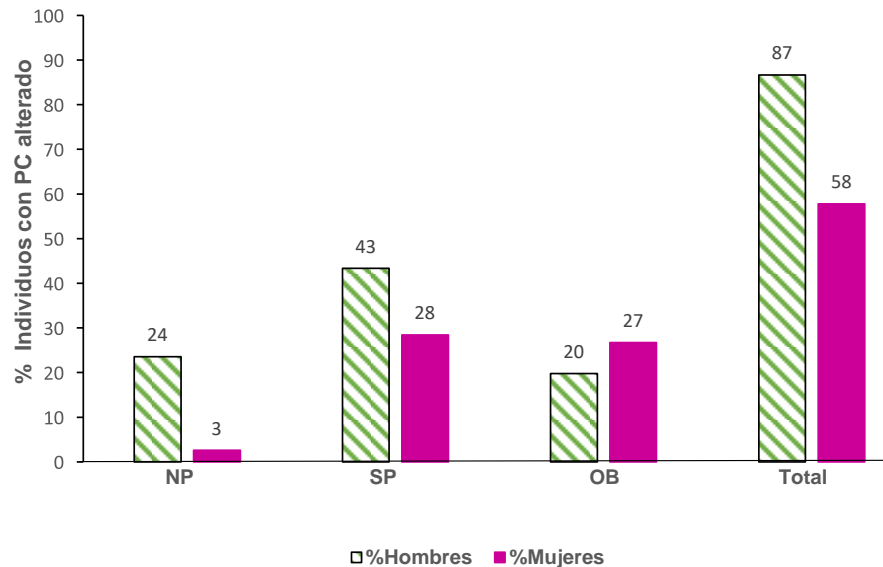


Figura 4-1: Comparación del perímetro de cintura alterado (PC) entre hombres y mujeres. Para los tres grupos discriminados por IMC. NP (normopeso), SP (sobrepeso), OB (obesidad). Valor de $p < 0,001$ en comparación entre mujeres de los tres grupos. $p < 0,001$ comparación entre los hombres para los tres grupos y $p = 0,0006$ comparación entre hombres y mujeres.

Como medidas de composición corporal se reporta la grasa total (GT), la grasa visceral (GV) y el músculo. Para las dos primeras variables GT y GV, se encontraron diferencias estadísticamente significativas $p < 0,0001$ (tabla 4-1) entre los grupos analizados y se asociaron con el aumento de la masa corporal, del PC y del IMC. Acorde con la literatura científica la grasa corporal fue mayor en las mujeres ($40,8\% \pm 6,8\%$) que en los hombres ($27,2\% \pm 7,8\%$) [108]. Se reporta que para las mujeres el valor de referencia normal es de 23,0-33,9 %, es elevado entre 34,0-39,9% y muy elevado mayor de 40,0% siendo esta última la condición representada en el promedio de las mujeres que participaron en el estudio. En los hombres se reporta valores fisiológicos entre 11,0-21,9%, elevado 22,0-27,9% y muy elevado $\geq 28,0\%$; se observa que los hombres que participaron tienen un promedio de % GT categorizado como elevado. Los voluntarios en condición de obesidad

presentaron $13\% \pm 4\%$ de grasa visceral (GV), superando el valor de referencia ($\leq 9\%$); aquellos en sobrepeso tuvieron un valor promedio de $10\% \pm 2\%$ de GV y los de normopeso de $6\% \pm 2\%$; los datos muestran que se reclutaron individuos que aún en condición de normopeso superaron el valor referencia para GV. La grasa visceral es un importante predictor de riesgo cardiovascular y DM2 [109]; con base en diferentes estudios se sugiere que los voluntarios que superan el valor de referencia de GV son más propensos a sufrir insulinoresistencia, aterosclerosis, procesos protrombóticos e inflamatorios [108][110].

Los resultados muestran una relación inversamente proporcional entre el perímetro de cintura, la grasa total y la grasa visceral con los porcentajes de músculo ($p < 0,0001$). En las mujeres el promedio de músculo fue de $(24,8\% \pm 3,8\%)$, justo al límite del valor de referencia recomendado ($> 24,1\%$). Los hombres presentaron un promedio de músculo de $(32,6\% \pm 4,0\%)$, que comparado con el valor de referencia menor a $33,1\%$ se clasificó como bajo [111]. Se sabe que a medida que aumenta el IMC y la GT hay una pérdida de masa muscular proceso conocido como sarcopenia, condición en la que se presenta baja fuerza muscular y bajo rendimiento físico [112].

4.2 Análisis bioquímicos

Los análisis bioquímicos que se presentan en la tabla 4-2 de la población analizada incluyeron una glucometría en ayunas como prueba exploratoria, la glucosa preprandial y el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total y en las diferentes lipoproteínas). Los datos muestran que el promedio de la glucosa preprandial en los tres grupos de estudio (NP, SP y OB) estuvieron dentro del rango del valor de referencia (< 100 mg/dL), presentando una diferencia estadística significativa con valor $p= 0,007$. Cuando se hace el análisis del rango total de concentraciones medido para la glucosa se determinó que el 23% ($n= 125$) de los participantes presentaron alteración de este metabolito. En las jornadas de salud se detectó que el 21% ($n= 113$) de los voluntarios estaban en una condición de prediabetes, está fue corroborada mediante la prueba de PTOG, además se registraron 12 (2%) voluntarios con DM2 no diagnosticada previamente. Estas jornadas de salud permitieron hacer un pesquiasje de riesgo hacia DM2 que llevó a la detección de morbilidad oculta en el 23% de los voluntarios quienes no conocían de su condición de enfermedad y fueron alertados a asistir con carácter prioritario a su entidad promotora de salud.

Los triglicéridos (TG) junto con la glucosa son fuente de reserva energética en el cuerpo [113]. En el estudio los resultados mostraron que los triglicéridos aumentan cuando se tiene una alteración del IMC, superando el valor de referencia (<150 mg/dL) . En la tabla 4-2 se reporta que el promedio de triglicéridos en el grupo de sobrepeso fue de 155 ± 77 mg/dL y en obesidad de 178 ± 73 mg/dL, estos datos presentan diferencia estadísticamente significativa ($p= 5,86 \times 10^{-12}$). Se observó que el 43,4% (n= 232) de la población tenía alteración en sus niveles de TG entre 150 y 576 mg/dL; el 56,6% (n= 303) presentaron niveles óptimos de TG (<150 mg/dL). Reportes sugieren que el aumento de lípidos circulantes en el torrente sanguíneo y su oxidación causan insensibilidad del receptor de insulina empeorando la condición de RI; esta genera cambios en la producción y activación del complejo proteico de la lipoproteína lipasa (LPL), componente esencial en la movilización y catabolismo de los TG, esto contribuye a una cascada de trastornos cardiometabólicos. La condición de hipertrigliceridemia también se ha asociado con el desarrollo de pancreatitis, aterosclerosis y pérdida de la movilidad articular en especial a concentraciones mayores de 500 mg/dL [114].

El colesterol total y el colesterol LDL no tuvieron asociación con el IMC, ni mostraron diferencias significativas entre los tres grupos (NP, SP, OB) (tabla 4-2). En este estudio se observó que la mayoría de la población reclutada presentó un promedio hacia valores más altos del valor de referencia de colesterol total (≥ 200 mg/dL). La molécula de colesterol es importante para la fisiología y la fisiopatología humana ya que es necesario en la formación de hormonas, metabolismo de la vitamina D, participa en la absorción de calcio, regulación de procesos celulares que van desde la fluidez y la permeabilidad de la membrana hasta la transcripción de genes [115]. En el torrente sanguíneo el colesterol se encuentra asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) de tipo aterogénico y a las de alta densidad (HDL) de calidad protectora.

El colesterol LDL es uno de los metabolitos más estudiados por ser un buen predictor de la enfermedad cardiovascular y coronaria [116], las guías de práctica clínica han definido unos valores de riesgo cardiovascular según los niveles de c-LDL, los resultados indicaron que solo el 27% de la población presentaron valores óptimos (<100 mg/dL) (figura 4-2), en consecuencia el 73% de la población puede considerarse con algún porcentaje de riesgo.

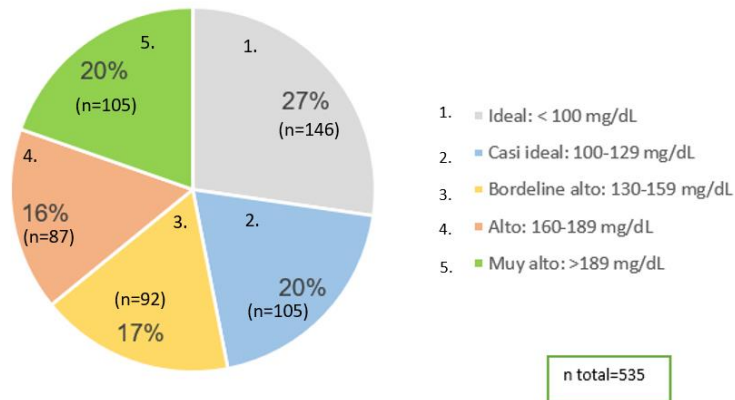


Figura 4-2: Colesterol LDL en la población analizada. Discriminación según las metas reportadas en la guía de práctica clínica de dislipidemia.[117].

El colesterol HDL es considerado un factor antiaterogénico, con capacidad antioxidante y protector cardiovascular [118]. Los resultados indican que existe una relación inversa entre el c-HDL y el IMC con significancia estadística ($p < 0,0001$), los niveles de c-HDL se encontraron disminuidos en los tres grupos especialmente en el grupo de obesidad (41 ± 12 mg/dL). En la práctica clínica se ha establecido una meta en los niveles de c-HDL para las mujeres ≥ 50 mg/dL y para los hombres ≥ 40 mg/dL, en este estudio los resultados indicaron que solo el 33% de las mujeres ($n=116$) tienen un nivel de c-HDL óptimo y el 46% de los hombres ($n= 86$) alcanzan la meta ideal de c-HDL; mientras que el 67% de las mujeres ($n= 232$) y el 54% de los hombres ($n= 101$) no cumplieron esta meta, a estos voluntarios se les recomendó iniciar actividad física para mejorar sus niveles de c-HDL. Estos resultados están acorde con la condición de sobrepeso y obesidad que presentó la población de estudio, se ha indicado que entre el 40% y el 60% de la variación del colesterol HDL está determinado genéticamente y más de cincuenta genes podrían participar en la variación del rasgo fenotípico [119]. El colesterol VLDL mostró diferencias significativas con $p= 9,9 \cdot 10^{-12}$ (tabla 4-2). Esta lipoproteína superó el valor de referencia en los grupos de sobrepeso y obesidad, estando directamente relacionado con el valor de TG.

Tabla 4-2: Análisis bioquímicos de la población de estudio

Variable	Normopeso (IMC 18,0-24,9 kg/m ²) n=158 (30%)	Sobrepeso (IMC 25,0-29,9 kg/m ²) n=238 (44%)	Obesidad (IMC > 30,0 kg/m ²) n=139 (26%)	Valor p*
Glucometría en ayunas (mg/dL)	91 ± 18 <i>88 (70 - 267)</i>	95 ± 16 <i>93 (69 - 232)</i>	98 ± 15 <i>96 (69 - 206)</i>	3,6*10 ⁻¹⁰
Glucosa preprandial VR (70-99mg/dL)	89 ± 23 <i>86 (51 - 297)</i>	93 ± 23 <i>90 (54 - 254)</i>	92 ± 21 <i>91 (57 - 200)</i>	0,007
Triglicéridos(mg/dL) VR (<150 mg/dL)	124 ± 62 <i>112 (44 - 450)</i>	155 ± 77 <i>141 (50 - 576)</i>	178 ± 73 <i>170 (65 - 354)</i>	5,9*10 ⁻¹²
Colesterol Total (mg/dl) VR (<200 mg/dL)	213 ± 64 <i>200 (92,3 - 381,3)</i>	216 ± 59 <i>206 (92 - 400)</i>	219 ± 65 <i>206 (108 - 506)</i>	0,701
colesterol HDL (mg/dl) VR (35-65 mg/dL)	47 ± 13 <i>46 (20 - 88)</i>	44 ± 14 <i>43 (16 - 90)</i>	41 ± 12 <i>41 (18 - 81)</i>	< 0,0001
colesterol LDL (mg/dl) VR (<150 mg/dL)	142 ± 61 <i>133 (36 - 296)</i>	141 ± 60 <i>139 (30 - 334)</i>	141 ± 63 <i>134 (28 - 374)</i>	0,955
colesterol VLDL (mg/dl) VR (<30 mg/dL)	25 ± 13 <i>22 (9 - 90)</i>	31 ± 15 <i>28 (10 - 115)</i>	36 ± 15 <i>34 (13 - 71)</i>	9,9*10 ⁻¹²

Valores >0,05 no tienen significancia estadística. Para las celdas que representan las variables la primera línea corresponde al promedio ± la desviación estándar y la segunda línea (en cursiva) reporta la mediana y el valor mínimo-valor máximo. VR indica el valor de referencia para la glucosa preprandial y perfil lipídico [60][117].

4.3 Análisis de índices aterogénicos y FINDRISC

Las alteraciones metabólicas entre ellas las asociadas al catabolismo de los lípidos, que llevan a RI y síndrome metabólico, son la base para el desarrollo de patologías como la DM2 y la obesidad, que a su vez pueden favorecer el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (EC) [120]. Las EC tienen una alta prevalencia en todo el mundo, constituyendo una de las primeras causas de morbilidad [121]; el origen directo de estas enfermedades es la aterosclerosis, que es un proceso en el que se observa acumulación de lípidos en las arterias. La acumulación de lípidos oxidados ocasiona migración de monocitos y linfocitos T que promueve la proliferación de células musculares lisas; este proceso lleva al aumento de colágeno y matriz que compromete el flujo en los vasos sanguíneos ocasionando oclusión total o parcial y las complicaciones trombóticas [122]. Para mejorar la predicción de estas enfermedades cardiovasculares surgen los índices aterogénicos que proporcionan información sobre factores de riesgo

antropométricos y reflejan mejor las interacciones clínicas y metabólicas de las fracciones lipídicas. El uso de estos índices aún no se ha generalizado en la práctica clínica, sin embargo, los diferentes estudios indican su reproducibilidad en la detección del riesgo cardiovascular [123], con la gran ventaja de ser herramientas que no generan un costo adicional al sistema de salud.

Uno de los índices con mayor asociación a riesgo cardiovascular independientemente de la etnia es la relación antropométrica entre cintura (cm)/altura (cm) con valor de referencia óptimo hasta 0,5 [124]. Los resultados mostraron una relación directa entre este índice con el IMC, con una diferencia estadística significativa ($p < 0,0001$) en los tres grupos de estudio (NP, SP, OB) (tabla 4-3). Los datos indicaron que los promedios de este índice superan el valor de referencia en todos los grupos incluso en el de los normopeso ($0,50 \pm 0,04$); en el de sobrepeso ($0,58 \pm 0,04$) y en el de obesidad ($0,67 \pm 0,06$); en conclusión, el 82% de la población ($n = 439$) supera el valor de referencia del índice cintura/altura. Este índice antropométrico es medido independientemente de la composición corporal y las pruebas bioquímicas; sin embargo, los resultados se correlacionan al aumento de los niveles de colesterol total, colesterol LDL y los porcentajes de grasa. Una revisión sistemática realizada en el 2012 con más de trecientos mil individuos concluyó que este índice es mejor herramienta de tamizaje para detectar factores de riesgo cardiometabólico en ambos sexos y en varias etnias, demostrando mayor exactitud que el IMC [124]. El IMC se ve afectado por la distribución de la grasa corporal independientemente de la masa corporal [125]. Este índice ha sido descrito como un potencial marcador de resistencia a la insulina y de dislipidemia en sujetos normopeso a quienes se les tiende a sobrevalorar su riesgo metabólico por tener una masa corporal “saludable” [126].

El índice TG/HDL se ha asociado con RI, DM2, síndrome metabólico, enfermedad renal y estados de prehipertensión [127]. Se observó diferencia estadística significativa en los tres grupos estudiados ($p = 2,7 \cdot 10^{-11}$) (tabla 4-3); para este índice se ha establecido como valor de referencia límite 3,5 [128] y se ha asociado con concentraciones altas de insulina [128]. Se evidenció un aumento en el promedio de este índice en el grupo de sobrepeso ($4,1 \pm 3,0$) y en el de obesidad ($4,9 \pm 3,0$); sin embargo, en los tres grupos se detectaron participantes con este índice aterogénico aumentado en 57,2 % de la población total ($n = 306$) con alta dispersión en los datos. El aumento obedeció a los niveles altos de triglicéridos que presentaron algunos de los participantes.

Tabla 4-3: Descripción de índices aterogénicos y FINDRISC

Variable	Normopeso (IMC 18,0-24,9 kg/m ²) n=158 (30%)	Sobrepeso (IMC 25,0-29,9 kg/m ²) n=238 (44%)	Obesidad (IMC > 30,0 kg/m ²) n=139 (26%)	Valor p*
Índice Cintura(cm)/ Altura (cm) VR (0,5)	0,50 ± 0,04 <i>0,51 (0,40 - 0,63)</i>	0,58 ± 0,04 <i>0,58 (0,47 - 0,70)</i>	0,67 ± 0,06 <i>0,66 (0,54 - 1,00)</i>	< 0,0001
Índice TG/HDL VR (3,5)	2,96 ± 1,96 <i>2,35 (0,78 - 10,44)</i>	4,05 ± 3,04 <i>3,25 (0,56 - 22,23)</i>	4,86 ± 2,97 <i>4,16 (0,93 - 17,71)</i>	2,72*10 ⁻¹¹
Índice CT/HDL VR (4,5)	4,87 ± 2,04 <i>4,48 (1,66 - 14,18)</i>	5,41 ± 2,51 <i>4,96 (1,71 - 17,75)</i>	5,73 ± 2,30 <i>5,33 (2,12 - 13,50)</i>	0,003
Índice LDL/HDL VR (2,5)	3,31 ± 1,80 <i>2,99 (0,47 - 12,68)</i>	3,62 ± 2,21 <i>3,26 (0,52 - 14,59)</i>	3,76 ± 1,98 <i>3,39 (0,56 - 11,38)</i>	0,1308
FINDRISC (Puntaje)	8 ± 4 <i>8 (0 - 18)</i>	13 ± 4 <i>12 (3 - 23)</i>	16 ± 4 <i>16 (9 - 25)</i>	< 0,0001

Valores de $p > 0.05$ no tienen significancia estadística. Para las celdas que representan las variables la primera línea corresponde al promedio \pm la desviación estándar y la segunda línea (en cursiva) reporta la mediana (valor mínimo - valor máximo). VR significa valor de referencia para cada uno de los índices.[129].

El índice CT/HDL también conocido como Castelli I, mostró diferencia estadística significativa en los tres grupos ($p = 0,003$). Para este índice se consideran cifras de riesgo coronario en la prevención primaria valores $> 4,5$ [130]. En los tres grupos de análisis los promedios superan este valor de referencia en los normopeso con ($4,9 \pm 2,0$), en los sobrepeso ($5,4 \pm 2,5$) y en obesidad ($5,7 \pm 2,3$); la tabla 4-3 muestra la relación de este índice con el IMC. El 60% de la población ($n = 319$) presentó valores mayores al rango óptimo siendo un reflejo de un colesterol total alto con valores bajos de colesterol HDL, que estaría representando un alto riesgo cardiovascular en la población. Valores superiores del valor de referencia indica e inicio el inicio del tratamiento hipolipemiente [130].

El índice c-LDL/c-HDL también se le conoce como índice de Castelli II, este índice señala el riesgo cardiovascular inminente dada la capacidad aterogénica del c-LDL y en un aumento de éstas, la pérdida de la capacidad antioxidante y aterogénica del c-HDL [131]. Se ha establecido como límite referencia $< 2,5$ para este índice y se ha sugerido que el valor meta u objetivo para la regresión de la aterosclerosis debe ser inferior a 2,0 en la prevención primaria; en la prevención secundaria debe ser menor a 1,5 [132]. Para la población estudiada se evidenció que el 65% ($n= 348$) supero el valor de referencia; no se encontraron diferencias significativas entre género o cuando los valores se discriminaron de acuerdo con el IMC ($p= 0,130$). El valor promedio en todos los grupos fue mayor a 2,5 (tabla 4-3); al igual que lo descrito para los anteriores índices, el c-LDL/c-HDL confirma el riesgo cardiovascular incluso en voluntarios normopeso con una falsa apreciación de un estado saludables.

El cuestionario de riesgo FINDRISC que permite identificar pacientes con riesgo de desarrollar DM2 en un lapso de 10 años, con la ventaja de ser una herramienta de pesquisa no invasiva y de mínimo costo para el sistema de salud está siendo muy utilizada a nivel mundial. En este se asigna un puntaje a diferentes factores de riesgo predictores de DM2 que finalmente es asociado a un porcentaje de riesgo para la enfermedad [59]. Este cuestionario se le aplicó a toda la población que participó en las jornadas de salud y se determinó que el 57% de la población ($n= 303$) presentó un puntaje ≥ 12 . Puntajes entre 12 y 14 para FINDRISC discriminan un 17% de riesgo para desarrollar DM2 en un lapso de diez años, y se clasifica como un riesgo moderado. Los datos presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) y una correlación directa con el IMC (tabla 4-3). Se observó que el promedio del puntaje de FINDRISC aumentó a medida que se tenía una alteración en el IMC, el promedio en el grupo de normopeso fue de 8 ± 4 puntos correspondiendo a un riesgo bajo (4%); para $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$, en sobrepeso el promedio del FINDRISC fue de 13 ± 4 puntos con un riesgo moderado (17%); cuando se aplicó el FINDRISC en la población con obesidad el puntaje osciló entre 9-25 puntos, con un promedio de 16 ± 4 para un nivel de riesgo alto (33%). Estos datos confirman que la obesidad es uno de los factores de riesgo para el desarrollo de DM2, cada voluntario fue informado de su nivel de riesgo FINDRISC y de sus pruebas bioquímicas, aquellos que presentaban alteraciones se les recomendó cambios en su estilo de vida, en un intento de

adherirse a hábitos saludables como una dieta balanceada y el aumento de actividad física, así como la importancia de hacer un seguimiento periódico de su salud.

Los resultados de las pruebas bioquímicas, las medidas antropométricas, las de composición corporal y los índices aterogénicos indicaron que la población reclutada tiene valores alterados en esos análisis y especialmente reflejan dislipidemias. La alteración del metabolismo de los lípidos es el principal factor de riesgo para enfermedad cardiovascular que sigue siendo la principal causa de muerte en Colombia [118].

Diferentes estudios han demostrado que el aumento en el perímetro de cintura, la grasa visceral y el índice TG/HDL están fuertemente asociados con el desarrollo de obesidad y DM2 [128]. Los análisis de las pruebas de algunos voluntarios normopeso con aparente “buen estado de salud” expresaron marcadores de riesgo metabólico; por lo que se concluye que la evaluación del riesgo no debe limitarse a las bioquímicas y al IMC; deben extenderse hasta el análisis de los índices antropométricos, aterogénicos y el FINDRISC.

4.4 Análisis taxonómico de la microbiota intestinal mediante el gen 16S rRNA

Para la secuenciación del gen 16S rRNA se seleccionaron 85 muestras de heces de voluntarios que cumplieron los criterios de inclusión y el protocolo de reclutamiento. De acuerdo con el IMC y su discriminación en normopeso (NP), sobrepeso (SP) y obesidad (OB), de forma aleatoria se seleccionaron entre 11 y 17 muestras de cada grupo para realizar el primer análisis bioinformático, que además fue correlacionado con el comportamiento glucémico.

Se analizaron muestras provenientes de 29 mujeres y 11 hombres, con edad promedio de 58 ± 9 años. Los sujetos NP ($n=12$) presentaron en promedio $23,5 \pm 0,8$ Kg/m² en IMC. Para aquellos voluntarios en condición de SP ($n=11$) el promedio de IMC fue de $26,5 \pm 1,1$ Kg/m². Los sujetos OB ($n=17$) presentaron en promedio $31,8 \pm 2,3$ Kg/m² de IMC. Cada uno de estos grupos se subdividió de acuerdo con el comportamiento glucémico de los voluntarios en normoglicémicos (N Glu), prediabéticos (Pre DM2) y diabéticos tipo 2 (DM2). En el Anexo G se muestra la base de datos correspondiente a esta población; la tabla 4-4 describe los subgrupos y sus características.

Tabla 4-4: Descripción de los voluntarios del análisis de microbiota

Variable	Normopeso (NP) (IMC 18,0-24,9 kg/m ²)		Sobrepeso (SP) (IMC 25,0-29,9 kg/m ²)		Obesidad (OB) (IMC > 30,0 kg/m ²)		
	(N Glu) n=6	(Pre DM2) n=6	(N Glu) n=5	(Pre DM2) n=6	(N Glu) n=6	(Pre DM2) n=7	(DM2) n=4
Perímetro de cintura (cm)	85 (83-98)	85 (75-91)	91 (76-103)	93 (84-103)	101 (98-105)	106(94-116)	115 (103-144)
Grasa total (%)	30 (20-39)	31 (19-38)	38 (22-46)	35 (27-42)	45 (39-51)	42 (30-51)	41 (30-47)
Grasa visceral (%) VR ≤9%	8 (6-10)	7 (6-8)	9 (7-11)	10 (8-13)	11 (8-13)	15 (9-26)	18 (11-30)
Glucosa basal (mg/dL) VR (70-99mg/dL)	83 (70-97)	113 (100-125)	85 (82-94)	109(103-117)	86 (82-97)	110(100-124)	123(89-142)*
FINDRISC (Puntaje)	11 (7-15)	16 (13-18)	13 (8-20)	14 (7-18)	17 (12-23)	17 (12-20)	19 (17-20)

Los datos se muestran como el promedio (valor mínimo-valor máximo). PC (perímetro de cintura), GT (grasa total), GV (grasa visceral) y Glu (glucosa preprandial). La condición de prediabetes y DM2 fue confirmada mediante PTOG y HbA1c.

De las 40 muestras seleccionadas para el análisis bioinformático de la secuencia del 16S rRNA se obtuvo aproximadamente 3×10^6 lecturas de los perfiles bacterianos; por muestra el promedio de lecturas fue 74.724 (26.306-140.790). La clasificación taxonómica de cada una de las lecturas se realizó mediante el software Greengenes; en la anotación taxonómica, con un conteo ≥ 2 , se obtuvieron 172 unidades taxonómicas operativas abreviadas como OTUs (del inglés, Operational Taxonomic Unit) (Anexo F). Teniendo como base estos 172 OTUs se realizaron los análisis de abundancia relativa a nivel de filo, de género y de especie; además de los análisis de diversidad y de posibles biomarcadores.

4.4.1 Frecuencias de abundancia relativa a nivel de filo

Las frecuencias de abundancia relativa (FAR) a nivel de filo obtenidas en el software Greengenes, fueron visualizadas en los softwares QIIME 2TM y MicrobiomeAnalyst en forma gráfica y tabulada. Los análisis de FAR de las 40 muestras indican que en promedio existen dos filos más abundantes, Firmicutes con el 49,2% y Bacteroidetes con el 39,8%; también se encontró Proteobacteria en un 7,4%; Tenericutes en 2,1%; Actinobacteria en 0,3%; Verrucomicrobia en 0,16% y Lentisphaerae 0,15%; además los resultados evidencian filos no asignados en diferentes porcentajes hasta 1,0%. El análisis de FAR discriminado de acuerdo con el IMC y por los subgrupos según el comportamiento glucémico se muestra en la figura 4-3; los resultados indican que de forma general se

mantienen los porcentajes de Firmicutes y Bacteroidetes (los más abundantes), se presenta alta variabilidad en el filo de las Proteobacterias (tercero en abundancia). Para aquellos filios de baja FAR y especialmente los no asignados tienden a disminuir con la alteración de la glucemia y el IMC.

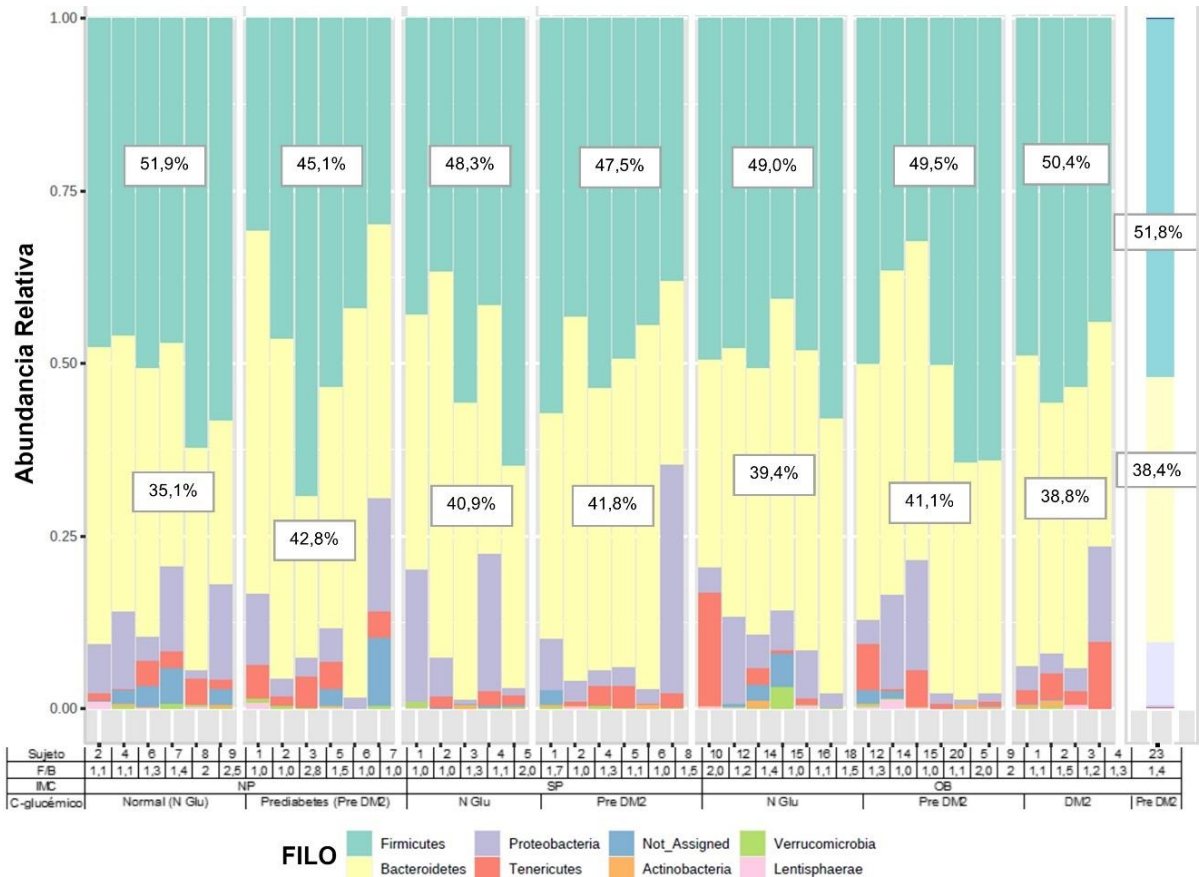


Figura 4-3: Análisis de frecuencia de abundancia relativa (FAR) a nivel de filo. Cada filo está relacionado con el IMC y el comportamiento glucémico. Los cuadros indican el promedio de FAR para los filios Firmicutes y Bacteroidetes en cada subgrupo. F/B indica la relación Firmicutes/Bacteroidetes para cada sujeto de estudio. Como un proceso de comparación se muestra el sujeto 23 con resultados bioquímicos en el límite más alto de prediabetes con pérdida de biodiversidad.

Los filios Firmicutes y Bacteroidetes han sido foco de atención en la comunidad científica por su relación en obesidad y diabetes [6][76]. Se ha reportado que en los filios Firmicutes (la mayoría Gram positivas) y Bacteroidetes (Gram negativas) se pueden encontrar bacterias que participan en la fermentación de polisacáridos no digeribles, produciendo

ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Éstos aportan hasta el 10% de las calorías diarias cuando la dieta es rica en fibra [65][133].

Se ha indicado que una relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ≥ 1 puede ser un biomarcador de obesidad [134][135]. Para todos los individuos del estudio incluyendo los normopesos la relación obtenida fue ≥ 1 . Se ha señalado que las personas con F/B ≥ 1 tienen un 23% más de probabilidades de tener sobrepeso que aquellas con una relación F/B < 1 [136]. Los resultados de este estudio concuerdan con investigaciones en las que no se observó variación de F/B entre grupos poblacionales con alteraciones metabólicas [137][138], sugiriendo la existencia de que otros cambios composicionales a nivel de familia, género o especie podrían ser más relevantes [139].

Se ha reportado que F/B está directamente asociada con un patrón dietético occidental [140][141], caracterizado por un alto consumo de alimentos procesados y ultra procesados con niveles bajos de nutrientes como PUFA n-3, vitaminas A, B12, C, E, Ca y Zn, con niveles altos de nutrientes como Na, azúcar, y ácidos grasos trans. La literatura científica describe que la dieta de la población colombiana ha sufrido alteraciones en las últimas décadas presentando características de una dieta no saludable [142][143].

El filo de las proteobacterias está conformado por bacterias Gram negativas que expresan lipopolisacáridos en su membrana externa [144]. Este filo bacteriano se ha relacionado como biomarcador de una comunidad microbiana intestinal inestable, siendo un criterio potencial de enfermedad. En un tracto gastrointestinal sano se ha definido que la abundancia relativa de proteobacterias puede variar entre 2 al 5%; mientras que en los trastornos metabólicos y de inflamación intestinal la proporción puede llegar hasta el 15% [144][145]. En diferentes trastornos metabólicos como la obesidad y la DM2, Proteobacteria ha sido detectado en mayor abundancia [146]. Los resultados que muestra la figura 4-3 indican que el filo proteobacterias estuvo representado en todos los grupos de estudio entre 5,88% y 9,27% valores posiblemente asociados a trastornos metabólicos.

En el estado de disbiosis se genera inflamación intestinal y en las células epiteliales se reduce la capacidad mitocondrial para procesos de beta oxidación; esto tiene como consecuencia una mayor disponibilidad de oxígeno, que se asocia con la proliferación de proteobacterias [147]. El aumento del anión nitrato, producido por el hospedero durante

condiciones inflamatorias es aprovechado principalmente por bacterias de este filo [148]. Se ha reportado que la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) favorece la proliferación de las proteobacterias [149]; por otro lado, el butirato producido principalmente por bacterias del filo Firmicutes es capaz de inhibir la expresión de la enzima NOS. Por esta razón situaciones que vayan en detrimento de bacterias productoras de butirato favorece a las proteobacterias; este filo bacteriano se ha asociado a dietas ricas en calorías, alta en grasas, bajas en fibra, con alto consumo de edulcorantes y emulsionantes artificiales [145].

De forma global los reportes indican que el filo Actinobacteria es más abundante que Firmicutes [38]. En este estudio de forma inesperada, la abundancia relativa del filo Firmicutes estuvo entre 0,93% a 4,20%; mientras que la FAR del filo Actinobacteria estuvo entre 0,09% a 0,44%. El filo Firmicutes está compuesto por bacterias que carecen de pared celular incluyendo el peptidoglicano [150]. Las Actinobacterias son bacterias Gram positivas, relacionadas con propiedades beneficiosas para la salud del hospedero. Esas propiedades se describen por inhibir bacterias patógenas, mejorar la función de la barrera intestinal y suprimir citoquinas proinflamatorias; generalmente se reporta la disminución de Actinobacterias cuando se tienen dietas ricas en grasas [151].

4.4.2 Frecuencias de abundancia relativa a nivel de género

El análisis de OTUs señaló que el 51,67% de los datos de abundancia relativa en el microbioma fueron diferenciados a nivel de género; mientras que el 48,33% de los datos no fueron asignados probablemente por falta de especificidad en las secuencias, debido a que solo se secuencia las regiones hipervariables de un único gen (16S rRNA) y no el genoma completo de cada microorganismo. La figura 4-4 y la tabla 4-5 muestra los géneros de mayor abundancia relativa.

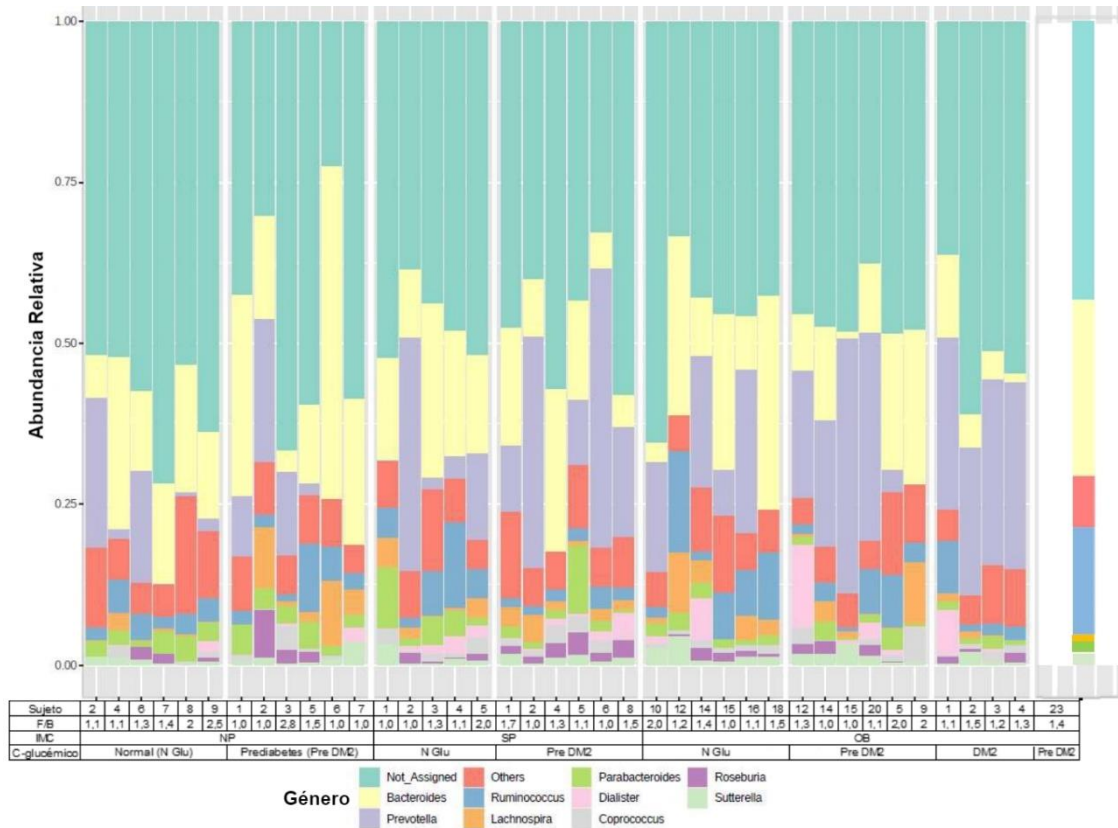


Figura 4-4: Análisis de Frecuencia de abundancia relativa (FAR) a nivel de género. Se relaciona el género de la microbiota con el IMC y el comportamiento glucémico. “Not_Assigned” corresponde a los géneros que no se lograron diferenciar taxonómicamente. “Others” corresponde a diversos géneros identificados con muy baja FAR.

Los datos muestran que la frecuencia de abundancia relativa (FAR) para cada género es un perfil característico del individuo, similar a lo visto a nivel de filo. Los valores de FAR son altamente dispersos para cada género entre los diferentes grupos (IMC) y subgrupos (comportamiento glucémico). Según el filo se encontró que para Firmicutes los géneros más abundantes fueron *Ruminococcus* con el $4,41\% \pm 0,04\%$ en promedio dentro de toda la población analizada, *Lachnospira* ($2,39\% \pm 0,03\%$), *Dialister* ($1,29\% \pm 0,02\%$), *Coprococcus* ($1,28\% \pm 0,01\%$), y *Roseburia* ($1,11\% \pm 0,01\%$) (tabla 4-5).

Tabla 4-5: Abundancia relativa de los géneros más abundantes

Género	PORCENTAJE DE FRECUENCIA DE ABUNDANCIA RELATIVA (%)							
	Normopeso (NP)		Sobrepeso (SP)		Obesidad (OB)			% GLOBAL
	N Glu	Pre DM2	N Glu	Pre DM2	N Glu	Pre DM2	DM2	
<i>Bacteroides</i>	16,17 ± 7,01	23,13 ± 16,95	17,63 ± 6,33	13,09 ± 8,02	17,74 ± 12,38	14,45 ± 8,37	6,05 ± 4,87	16,05 ± 0,10
<i>Prevotella</i>	7,44 ± 10,20	7,62 ± 8,79	10,94 ± 14,98	19,39 ± 16,82	11,59 ± 10,76	16,38 ± 15,41	26,80 ± 2,84	13,82 ± 0,13
<i>Ruminococcus</i>	3,13 ± 1,28	3,79 ± 3,60	6,16 ± 4,49	1,85 ± 0,75	7,12 ± 5,38	5,43 ± 2,86	3,09 ± 3,27	4,41 ± 0,04
<i>Lachnospira</i>	0,78 ± 1,06	4,45 ± 4,51	2,13 ± 1,90	2,23 ± 1,27	3,45 ± 3,31	2,34 ± 3,58	0,80 ± 0,59	2,39 ± 0,03
<i>Parabacteroides</i>	2,54 ± 1,07	2,93 ± 1,29	3,81 ± 3,30	2,74 ± 3,78	1,65 ± 0,72	1,59 ± 1,42	1,06 ± 0,52	2,34 ± 0,02
<i>Coprococcus</i>	0,68 ± 0,75	1,08 ± 1,32	1,64 ± 1,18	1,70 ± 0,96	1,09 ± 0,28	1,62 ± 1,98	1,07 ± 0,56	1,28 ± 0,01
<i>Dialister</i>	0,32 ± 0,67	0,48 ± 0,94	1,40 ± 0,90	1,16 ± 1,36	1,28 ± 2,56	2,47 ± 5,04	1,91 ± 3,36	1,29 ± 0,02
<i>Roseburia</i>	0,75 ± 0,95	1,88 ± 2,81	0,62 ± 0,73	2,03 ± 1,04	0,84 ± 0,75	0,78 ± 0,95	0,76 ± 0,71	1,11 ± 0,01
<i>Sutterella</i>	0,60 ± 0,48	1,10 ± 1,21	0,98 ± 1,24	0,95 ± 0,58	1,72 ± 1,51	1,48 ± 1,02	0,75 ± 0,92	1,11 ± 0,01
Otros*	9,77 ± 5,16	7,12 ± 1,59	7,73 ± 3,36	0,38 ± 2,99	7,63 ± 2,81	7,18 ± 3,50	7,00 ± 2,43	7,86 ± 0,03
No asignado**	57,82 ± 8,07	46,41 ± 17,61	46,97 ± 5,79	46,48 ± 9,86	45,88 ± 10,57	45,14 ± 4,12	50,70 ± 10,44	48,33 ± 0,10

Se muestran los datos de los promedios ± las desviaciones estándar de los géneros con mayor FAR en los siete subgrupos de estudio. *Otros hacen referencia a géneros que se alcanzaron a identificar, pero son menos abundantes. **No asignados representan especies bacterianas no identificadas taxonómicamente

El género *Ruminococcus* lo conforman bacterias anaerobias estrictas; la literatura reporta que, en dietas occidentalizadas ricas en carbohidratos, la FAR de este género tiende a aumentar con respecto a *Bacteroides* y *Prevotella*. Se sabe que bacterias de este género fermentan los restos de oligosacáridos hasta butirato, acetato, formiato, succinato, lactato y etanol [41]. En este estudio se encontró que el género *Ruminococcus* fue uno de los cinco más abundantes, resultado compatible por lo reportado por Zuluaga, et al 2018; investigación realizada sobre 441 individuos colombianos (18 a 64 años), en el que asociaron *Ruminococcus* con dietas ricas en carbohidratos complejos [28].

Lachnospira, *Coprococcus* y *Roseburia* son miembros de la familia *Lachnospiraceae*, y generalmente se han relacionado con un buen estado de salud. Estos géneros se caracterizan por degradar la fibra dietética hasta propionato, acetato y lactato (puede metabolizarse hasta butirato) [152]. La frecuencia de abundancia relativa es dependiente de cada individuo, pero se ha señalado que normalmente es a partir del ≥ 2,0% [153]; al comparar ese reporte con lo encontrado para los 40 voluntarios del actual estudio se concluye que *Coprococcus* y *Roseburia* se presentaron en menor FAR. Las bacterias de estos géneros hacen parte de la flora normal intestinal (eubiosis) y se asocian al

mantenimiento de la homeostasis microbiana con el hospedero. Se ha reportado interacciones sinérgicas con otros grupos bacterianos con efectos antipatogénicos, actuando por exclusión competitiva [154]. El género *Roseburia* lo constituyen bacterias anaerobias Gram-positivas, que presentan motilidad por medio de múltiples flagelos subterminales [155]. Varias de las especies que conforman este género estimulan la producción de citocinas antiinflamatorias como la sobreexpresión de IL10 e IL22; también promueven la diferenciación de células T reguladoras induciendo la expresión del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β), que inhibe la respuesta inflamatoria intestinal [156]. Se ha visto que dietas ricas en carbohidratos no digeribles produce un aumento del género *Roseburia*; el beta-glucano presente en la avena induce el crecimiento de *Roseburia* con un concomitante aumento de propionato [157].

A pesar de que el género *Dialister* pertenece al filo Firmicutes son cocobacilos Gram negativos, que expresan lipopolisacáridos (LPS). Se sabe que cuando aumenta la permeabilidad intestinal los LPS pueden alcanzar el torrente sanguíneo y promover la respuesta inflamatoria y la resistencia a la insulina (RI) [158]. Las bacterias que componen el género *Dialister* se han relacionado como posibles biomarcadores de obesidad. Este género también se ha asociado a un aumento de grasa visceral [159], sin embargo, cuando se quiso determinar la dependencia utilizando el Software libre R V4.1.2 entre la FAR del género *Dialister* con el porcentaje de grasa visceral (GV) de los voluntarios analizados (figura 4-5), se obtuvo una dependencia directa bastante discreta ($\rho = 0,24$), estadísticamente no significativa ($p = 0,14$).

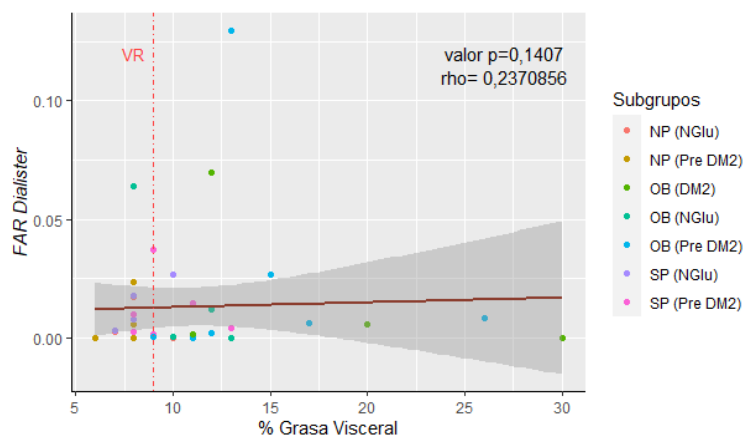


Figura 4-5: Relación entre el género *Dialister* y la Grasa visceral. Los datos están representados por el color que indica el subgrupo de estudio según la discriminación por IMC y glucosa. VR indica el valor de referencia de GV de $\leq 9\%$.

Dentro del filo Firmicutes, se encuentra el género *Faecalibacterium* reconocido como un importante actor en la salud intestinal humana [160]. Los miembros de este género son considerados microorganismos comensales, ubicuos del tracto gastrointestinal que degradan la inulina para producir butirato [161]. Este género promueve la producción de moléculas antiinflamatorias bioactivas como el ácido shikímico y salicílico, que ayudan a reducir la translocación bacteriana y estimulan la secreción de mucina para mantener la integridad intestinal [162]. Varios reportes han sugerido que la abundancia relativa de este género *Faecalibacterium* normalmente es de 2 al 15%; cuando se compara este género en la población analizada se encontró un valor muy bajo de abundancia promedio ($0,73\% \pm 0,90\%$). Los resultados fueron compatibles con la literatura que indica de la disminución de abundancia de este género en personas con DM2 y obesidad [161][163].

Para el filo de los Bacteroidetes los géneros más abundantes fueron, *Bacteroides* con el $16,05\% \pm 0,10\%$ en promedio dentro de toda la población analizada, *Prevotella* ($13,82\% \pm 0,13\%$) y *Parabacteroides* ($2,34\% \pm 0,02\%$) (tabla 4-5). Se sabe que la microbiota intestinal de diferentes poblaciones está caracterizada por tres enterotipos [164], un enterotipo es la asociación funcional de varias bacterias que se mantienen estables durante la edad adulta y van a diferenciarse por los mecanismos en los que obtienen energía a partir de los sustratos fermentables de la dieta [165]. El enterotipo I se caracteriza por el predominio del género *Bacteroides*, el enterotipo II se caracteriza por la abundancia del género *Prevotella*, y el enterotipo III por la abundancia de *Ruminococcus*. Los resultados del actual estudio indicaron que los promedios de abundancia de *Bacteroides* y *Prevotella* son muy similares, por lo que no se puede clasificar la muestra analizada dentro de alguno de estos enterotipos, en consonancia con lo expuesto por Zuluaga, et al 2018, en población colombiana [28].

Se ha indicado que una abundancia de *Prevotella* y *Bacteroides* menor al 5% es baja y mayor a 40% es alta en poblaciones europeas, asiáticas, africanas y americanas [166]. Cuando se analiza el porcentaje de abundancia de *Prevotella* y *Bacteroides* en la población de estudio, en el 30% de los voluntarios (n=12) no se detectó el género *Prevotella*, los demás valores fueron dispersos desde bajo hasta alto (0,01% - 43,18%). El género *Bacteroides* tuvo alta dispersión (1,41% - 51,81%) y en todos los voluntarios se detectó este género. Recientemente se ha propuesto reemplazar el término enterotipo por el de

biomarcador para referirse a los taxones más abundantes como lo son *Bacteroides* y *Prevotella*, ya que sirven como biomarcadores efectivos de la dieta y del estilo de vida; por ejemplo, se ha indicado un aumento en la abundancia de *Prevotella* con la ingesta de fibra dietética y en poblaciones rurales [167].

En los últimos años se ha indicado que la abundancia del género *Bacteroides* se ha asociado al consumo de grasas, proteínas de origen animal y carbohidratos principalmente arroz y trigo. Algunas especies de *Bacteroides* pueden desempeñar funciones tanto beneficiosas como patógenas en el hospedero [168]. Uno de los principales factores de virulencia es que tienen un sistema capsular de polisacáridos que facilita la adherencia a las superficies peritoneales; como resultado alcanzan resistencia a la fagocitosis, y sobreviven en condiciones de estrés oxidativo debido a que expresan enzimas antioxidantes (oxidoreductasas, incluidas catalasas, peroxidasas y tioredoxinas) [169]. En un intento de asociar el género *Bacteroides* con el porcentaje de grasa visceral (GV), un importante marcador de riesgo metabólico (Figura 4-6), se observa una tendencia a una relación inversa entre las variables con $\rho = -0,30$ ($p=0,06$).

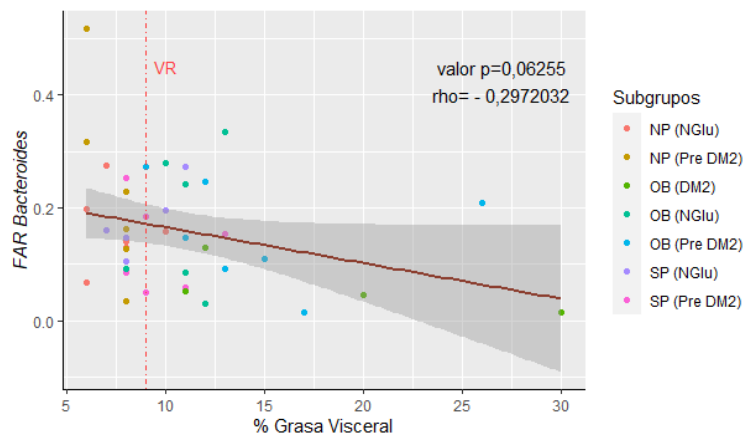


Figura 4-6: Relación entre el género *Bacteroides* y la Grasa visceral. VR indica el valor de referencia de grasa visceral $\leq 9\%$. La franja gris indica el rango para el cual con una confianza del 95% se puede hablar de una dependencia fuerte, teniendo en cuenta la recta de tendencia roja.

Prevotella es un género de bacterias Gram negativas, asociadas a una dieta rica en fibra y polisacáridos de tipo vegetal; el consumo de carne roja y grasas trans está asociado a menor abundancia relativa de las bacterias que componen este género [170]. Reportes indican el aumento de *Prevotella* en pacientes en condición de obesidad y DM2 [171] [172],

los datos de los siete grupos de estudio mostraron una tendencia de relación directa entre este género y el IMC con $\rho = 0,26$ ($p = 0,10$); no se observó relación entre el género y el comportamiento glucémico (Figura 4-7).

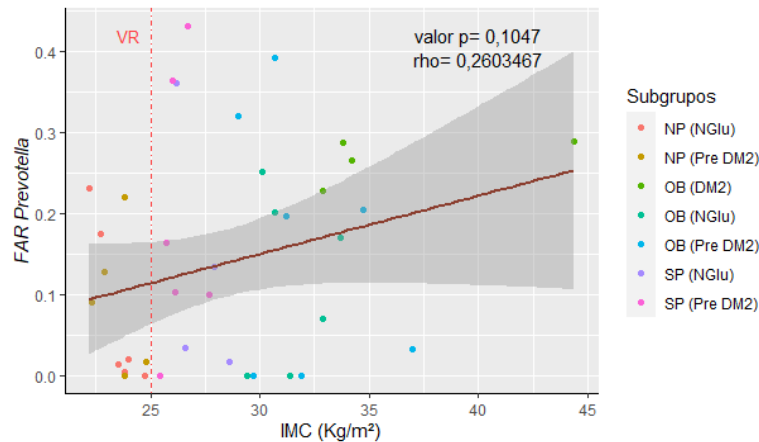


Figura 4-7: Relación entre el género *Prevotella* y el IMC (Kg/m²). VR indica el valor de referencia del IMC que es $\leq 24,9$ Kg/m² en normopeso.

El género *Parabacteroides* se conforma de bacterias Gram negativas que son comunes en el tracto gastrointestinal [173]; éste tiene la capacidad de transformar ácidos biliares y producir succinato [174]. El análisis del microbioma de los voluntarios en estudio indicó que los grupos en condición de obesidad presentaron menor FAR; se ha reportado la posible disminución de *Parabacteroides* en obesidad y síndrome metabólico [175]. Al correlacionar la FAR de *Parabacteroides* con el IMC se observó una relación indirecta estadísticamente significativa con un rho de $-0,35$ ($p = 0,02$) (Figura 4-8).

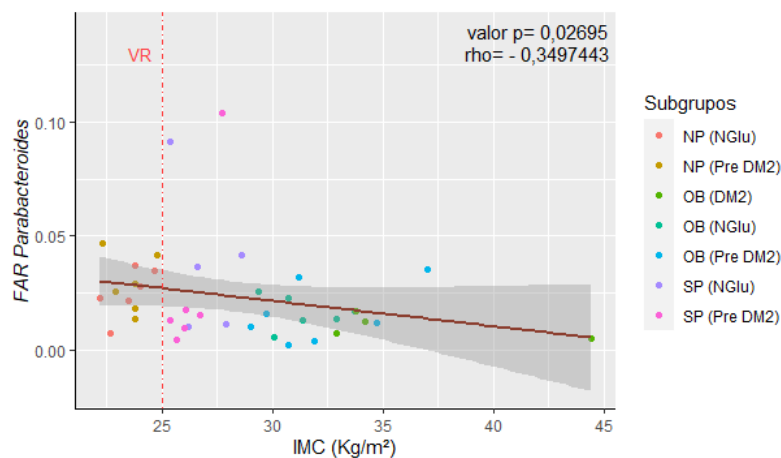


Figura 4-8: Relación entre el género *Parabacteroides* y el IMC. VR indica el valor de referencia del IMC ($\leq 24,9$ Kg/m²).

Para el filo de las proteobacterias los géneros que presentaron mayor abundancia fueron *Suterella* con un promedio de $1,11\% \pm 0,01\%$ en toda la población analizada (tabla 4-5), *Succinivibrio* ($1,05\% \pm 4,22\%$) y *Desulfovibrio* ($0,74\% \pm 1,04\%$). Las bacterias del género *Suterella* son bacilos Gram negativos, no formadores de esporas, resistentes a los ácidos biliares humanos de ahí que habiten en el tracto biliar y el intestino. Se indica que generalmente son microorganismos comensales, con capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales. Se han descrito propiedades proinflamatorias leves, debido a diferencias en sus LPS en comparación con los que presentan otras bacterias más patógenas como *E. coli* [176]. A diferencia de *Suterella*, el género *Succinivibrio* produce succinato y propionato; se ha encontrado una abundancia alta del género *Succinivibrio* en pacientes con enfermedad de hígado graso, obesidad y síndrome de Behcet (SB), que es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida [177]. Se tuvieron abundancias relativas muy bajas para este género incluso de 0%; en el grupo de los voluntarios en condición de obesidad, el sujeto 10 de glucosa normal (OB N Glu) presentó atípicamente una abundancia de *Succinivibrio* de 25,37%, sugiriendo un estado inflamatorio y/o hígado graso.

El género *Desulfovibrio* a pesar de ser un habitante común intestinal, cuando presenta abundancias altas ($> 5\%$) es de carácter patológico. Las bacterias que lo conforman generan sulfuro de hidrógeno e inhiben la producción de butirato principalmente entre bacterias del filo Firmicutes. Este género se ha encontrado enriquecido en pacientes con DM2, colitis ulcerosa, enfermedades inflamatorias intestinales, abscesos hepáticos, apendicitis y recientemente se ha asociado a aterosclerosis en el modelo murino [178]. Los voluntarios analizados no presentaron abundancias relativas asociadas al carácter patológico, se observó una leve tendencia inversa entre la FAR de *Desulfovibrio* con los niveles de glucosa en ayunas con $\rho = -0,28$ ($p = 0,07$) (Figura 4-9).

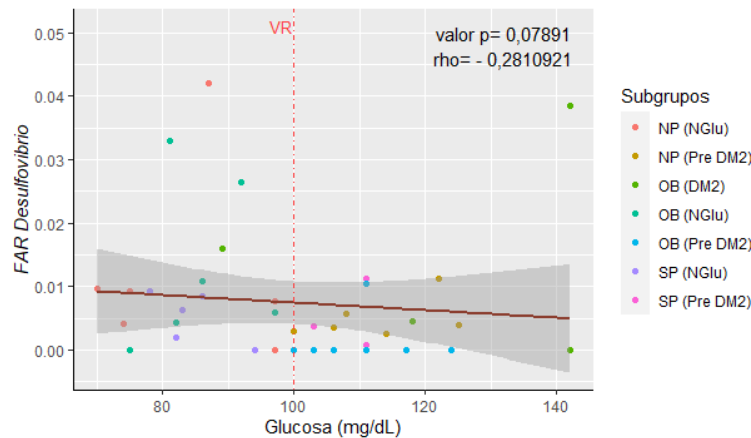


Figura 4-9: Relación entre el género *Desulfovibrio* y la glucosa preprandial. La línea punteada roja indica el valor de referencia de la glucosa que es <100 mg/dL.

La mayoría de los géneros correspondientes al filo Tenericutes no fueron asignados taxonómicamente, solo se alcanzó hasta el nivel de familia. El género más abundante que se logró identificar fue *Candidatus phytolasma* que presentó un promedio de abundancia en el total de la población de $0,03\% \pm 0,14\%$; de este género es poco lo que se conoce principalmente porque son bacterias sin pared celular, no cultivables, por lo que aún se desconoce su asociación con el hospedero. Se ha visto un incremento en los géneros que pertenecen a la clase Mollicutes en obesidad [146], sin embargo, en la muestra analizada ningún voluntario obeso presentó este género.

El género *Bifidobacterium* es el principal representante del filo Actinobacteria, en el análisis del microbioma se detectó en promedio $0,22\% \pm 0,32\%$ de FAR en la población; en contraste con lo reportado en la literatura que indica $FAR \geq 5\%$ en población sana [179][180]. Las bacterias que pertenecen a este género son Gram positivas de características probióticas. Este género microbiano presenta capacidad para metabolizar carbohidratos complejos ya que contienen enzimas implicadas en la utilización de azúcares como las glicósido hidrolasas [181]. *Bifidobacterium* participa en el desarrollo intestinal temprano, en procesos de inmunomodulación y en la regulación de los niveles de azúcar y colesterol [182]. Las bifidobacterias controlan los procesos inflamatorios, el desarrollo de obesidad y DM2, porque evitan la unión de proteobacterias a la mucosa intestinal reduciendo la translocación bacteriana y con ello la endotoxemia [183].

Se describe del filo de Verrucomicrobia, el género *Akkermansia* con un promedio de FAR de $0,18 \% \pm 0,50\%$ en la población analizada. Se ha indicado una abundancia normal de *Akkermansia* de 1 al 3%, por lo tanto, este género se encuentra disminuido en el grupo de voluntarios del actual estudio, esta condición se ha asociado principalmente al consumo de dietas altas en grasas [184]. *Akkermansia* lo conforman bacterias Gram negativas anaerobias, que degradan mucina mediante enzimas glucósido hidrolasas. Son productoras de ácidos grasos de cadena corta principalmente acetato y butirato; por ello favorecen el mantenimiento y la homeostasis de la barrera intestinal [185].

Se identificó el género *Fusobacterium* del filo Fusobacteria, en dos voluntarios del grupo de obesidad normoglicémicos con $0,10\% \pm 0,21\%$ de FAR; infortunadamente no se logró asignar taxonómicamente a nivel de especie las bacterias representativas de esa abundancia relativa. La presencia de *Fusobacterium* se ha relacionado con el desarrollo de carcinoma colorrectal y a otras patologías como la enfermedad intestinal irritable, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Las bacterias de este género invaden las células epiteliales del colon, expresando adhesinas que son factores de virulencia que favorecen la formación de biopelículas bacterianas y a la vez inducen procesos inflamatorios [186].

4.4.3 Frecuencias de abundancia relativa a nivel de especie

Se logró identificar aproximadamente el 22,07% de las especies presentes en la microbiota de los voluntarios, discriminados por IMC y comportamiento glucémico. De las especies que presentaron mayor abundancia siete correspondieron al filo de Bacteroidetes y dos al filo Firmicutes. La FAR a nivel de especie también fue característica de cada persona, con un alto nivel de dispersión (tabla 4-6).

Tabla 4-6: Abundancia relativa a nivel de especie

Especie bacteriana	PORCENTAJE DE FRECUENCIA DE ABUNDANCIA RELATIVA (%)							
	Normopeso (NP)		Sobrepeso (SP)		Obesidad (OB)			% Global
	N Glu	Pre DM2	N Glu	Pre DM2	N Glu	Pre DM2	DM2	
<i>Bacteroides_caccae</i>	2,05 ± 1,33	1,69 ± 3,10	1,91 ± 1,70	0,67 ± 0,46	0,48 ± 0,91	0,70 ± 1,42	0,15 ± 0,14	1,11 ± 0,02
<i>Bacteroides_eggerthii</i>	0,31 ± 0,31	1,70 ± 1,47	0,39 ± 0,74	0,42 ± 0,97	0,84 ± 1,80	0,41 ± 0,55	0,10 ± 0,14	0,47 ± 0,01
<i>Bacteroides_ovatus</i>	0,33 ± 0,48	0,55 ± 1,02	0,47 ± 0,48	0,64 ± 0,69	0,37 ± 0,52	0,66 ± 0,36	1,09 ± 1,89	0,57 ± 0,01
<i>Bacteroides_uniformis</i>	2,75 ± 2,06	4,60 ± 6,26	2,56 ± 3,60	1,37 ± 0,76	4,68 ± 3,80	2,53 ± 2,11	1,32 ± 2,30	2,9 ± 0,04
<i>Eubacterium_biforme</i>	0,37 ± 0,37	0,35 ± 0,40	0,72 ± 1,40	0,23 ± 0,28	0,12 ± 0,24	0,54 ± 1,17	0,12 ± 0,17	0,36 ± 0,01
<i>Faecalibacterium_prausnitzii</i>	1,37 ± 1,93	0,54 ± 0,29	0,65 ± 0,62	0,81 ± 0,42	0,63 ± 0,84	0,72 ± 0,49	0,44 ± 0,23	0,75 ± 0,01
<i>Parabacteroides_distasonis</i>	1,76 ± 0,89	1,43 ± 1,11	2,34 ± 4,00	0,73 ± 0,56	0,33 ± 0,24	0,52 ± 0,48	0,66 ± 0,60	1,09 ± 0,02
<i>Prevotella_copri</i>	6,54 ± 9,55	6,56 ± 8,45	10,36 ± 15,23	18,84 ± 16,64	10,77 ± 10,05	15,50 ± 15,19	24,48 ± 2,66	12,86 ± 0,14
<i>Prevotella_stercorea</i>	0,27 ± 0,43	0,08 ± 0,20	0,18 ± 0,25	0,42 ± 0,65%	0,61 ± 0,99	0,47 ± 1,03	1,29 ± 2,27	0,44 ± 0,01
Otros*	1,69 ± 1,55	1,40 ± 0,54	1,45 ± 0,35	1,63 ± 1,03	1,74 ± 1,04	1,70 ± 1,11	0,75 ± 0,72	1,52 ± 0,01
No asignado**	82,56 ± 6,47	82,10 ± 9,34	78,96 ± 12,14	74,25 ± 14,86	79,51 ± 7,80	76,25 ± 12,14	69,26 ± 4,50%	77,9 ± 0,11

Se muestran los datos de los promedios ± las desviaciones estándar de las especies con mayor FAR en los siete subgrupos de estudio. *Otros hacen referencia a especies que se alcanzaron a identificar, pero son menos abundantes. **No asignados representan especies bacterianas no identificadas taxonómicamente.

Del filo Firmicutes las dos especies que presentaron mayor FAR en toda la población analizada fueron *Faecalibacterium prausnitzii* con un promedio de 0,75% ± 0,01% y *Eubacterium biforme* con 0,36% ± 0,01%. La especie *Faecalibacterium prausnitzii* es una de las principales productoras de butirato en el intestino por lo que es un biomarcador de salud intestinal. El butirato cumple con funciones esenciales para la salud del hospedero, por ser fuente de energía para los colonocitos; también reduce los niveles de inflamación en la mucosa intestinal mediante la inhibición del interferón gamma (IFN-γ) y estimula la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 [162]. La mayoría de las cepas de esta especie son capaces de fermentar la inulina, arabinogalactano, xilano, almidón soluble y pectina [187]. Diferentes estudios indican que la abundancia normal de esta bacteria es aproximadamente del 5% y se ha encontrado disminuida en enfermedades como DM2 y obesidad [160][188]. En el actual estudio, se observó que en general los voluntarios presentaron abundancias relativamente bajas para este microorganismo; solamente se encontró un voluntario en normopeso-normoglucémico (NP NGLu) con el valor aceptado como normal de 5,14%.

Eubacterium bifforme son bacilos Gram positivos, uniformes o pleomórficos, su presencia en el intestino se ha asociado a una mayor ingesta de fibras dietéticas y su abundancia disminuye con el aumento de dietas ricas en proteína y grasas; esta especie produce butirato a través de la fermentación de carbohidratos complejos [189]. Se ha informado que esta especie participa en la regulación del peso corporal y en los niveles de colesterol. Mediante la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH) participa en el metabolismo de los ácidos biliares, y también convierte parte del colesterol en coprostanol, ejerciendo un efecto hipocolesterolemia. Se ha reportado que en sujetos ateroscleróticos hay una correlación negativa entre *Eubacterium bifforme* con el colesterol total y el c-LDL [79]. Los resultados del presente estudio señalan que en el 45% de los voluntarios (n=18) este microorganismo estuvo ausente y no se observó una tendencia entre los porcentajes de abundancia respecto al IMC, el comportamiento glucémico y los niveles de colesterol.

Las especies que presentaron mayor abundancia en la población estudiada pertenecieron al filo de los Bacteroidetes, siendo *Prevotella copri* con $12,86\% \pm 0,14\%$ en promedio la de mayor representación. Al comparar los grupos de sobrepeso y obesidad con respecto a los normopeso hay un aumento en la FAR; el grupo OB DM2 se triplicó la abundancia relativa ($24,48\% \pm 2,66\%$) con respecto a NP. *Prevotella copri* es un habitante común intestinal que se ha relacionado al consumo de dietas ricas en fibra teniendo un mayor potencial en el catabolismo de carbohidratos complejos [190]. Esta bacteria tradicionalmente se ha asociado a poblaciones no occidentalizadas, sin embargo, varios estudios indican una alta prevalencia de la especie en poblaciones de América Latina [170][191]. Se ha informado que *Prevotella copri* aumenta los niveles séricos circulantes de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), induce la polarización de los linfocitos T “helper” (Th17), favorece el reclutamiento de neutrófilos y la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-8 e IL-6 por parte de las células epiteliales; con lo anterior se promueve la inflamación sistémica, la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa [191][172]. De forma controversial, se ha señalado un papel beneficioso de esta bacteria al ser productora de succinato, mejorando la homeostasis de la glucosa en dietas ricas en fibra a través de un mecanismo no elucidado [192]. Se observó una tendencia de relación directa entre la FAR de *Prevotella copri* y el IMC ($\rho=0,27 - p=0,08$) (figura 4-10); no se detectó una relación estadística frente al comportamiento glucémico, dado que los resultados fueron altamente dispersos.

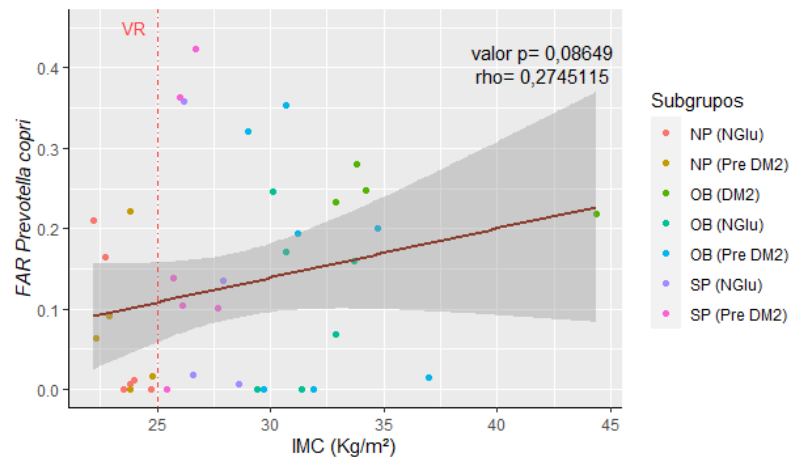


Figura 4-10: Relación de la especie *Prevotella copri* y el IMC. La línea punteada roja indica el valor de referencia del IMC que es $\leq 24,9$ Kg/m².

Prevotella stercorea son bacilos Gram negativos, anaerobios, no formadores de esporas; los principales metabolitos de los procesos de fermentación de esta bacteria son el succinato y el acetato. Se ha indicado un aumento en la abundancia de esta especie en pacientes obesos, después de intervenciones nutricionales con dietas mediterráneas hipocalóricas [193]. Los datos de abundancia relativa para *Prevotella stercorea* fueron dispersos entre los grupos analizados de 0,00% a 4,67%, debido a que en el 65% de los voluntarios (n=26) no se detectó esta especie, el promedio fue de $0,44\% \pm 0,01\%$. No se logró determinar algún tipo de relación con el IMC o el comportamiento glucémico.

Otras cinco especies representativas fueron *Bacteroides uniformis* con un promedio de abundancia en toda la población de $2,90\% \pm 0,04\%$, *Bacteroides caccae* ($1,11\% \pm 0,02\%$), *Parabacteroides distans* ($1,09\% \pm 0,02\%$), *Bacteroides ovatus* ($0,57\% \pm 0,01\%$) y *Bacteroides eggerthii* ($0,47\% \pm 0,01\%$). *Bacteroides uniformis* es una bacteria comensal que fermenta carbohidratos y glucósidos no digeribles ya que posee enzimas activas de carbohidratos CAZymes (del inglés, Carbohydrate-active enzymes), esta especie codifica genes para un gran número de estas enzimas especialmente glicósido hidrolasas y liasas de polisacárido [194]. Se ha informado que en individuos sanos *Bacteroides uniformis* presenta una FAR de 2,22% y una disminución de esta en individuos obesos hasta 0,20% [195]. Los resultados del actual estudio indican una dispersión bastante alta de FAR para esta bacteria (0,00% a 16,81%); no se determinó relación con el IMC o el comportamiento glucémico.

Bacteroides caccae es una bacteria intestinal anaerobia de acción dual en el intestino, como especie beneficiosa o como patógeno oportunista. El aumento de abundancia de esta especie se ha relacionado con el consumo de dietas altas en fibra soluble, según estudios previos se ha asociado esta bacteria con la inducción de inmunoglobulina A (IgA), esencial en la defensa de la mucosa intestinal [196]. Controversialmente, se ha informado que esta especie puede invadir la mucosa del intestino, causar infecciones supurativas abdominales y respuesta inflamatoria asociada al aumento de glóbulos blancos [197][198]. En el actual estudio, al 35% de los voluntarios (n=14) no se les detectó esta especie; presentó un rango de 0,00% a 7,88% de FAR y no se encontró asociación con el IMC o el comportamiento glucémico.

Bacteroides ovatus es una bacteria comensal con potencial probiótico de próxima generación, dado que produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Se sabe que participa en la comunicación cerebro-intestino, ya que tiene la capacidad de producir el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y también modula los niveles de triptófano y glutamina [199]. En los voluntarios analizados se encontró un rango de 0,00% a 3,92% de FAR para esta especie, no se detectó en el 17,5% de los voluntarios (n=7). A pesar de que los promedios de abundancia aumentaron con la alteración de glucosa preprandial en los grupos analizados, estadísticamente no se comprobó esa relación ($\rho=0,12$ - $p=0,47$).

Bacteroides eggerthii es una bacteria que se ha asociado al consumo de fibra insoluble presente en alimentos como el salvado de trigo, las verduras y los granos integrales [200]. Los datos de las abundancias para este microorganismo fueron muy dispersos y el 47,5% de los individuos (n= 19) no presentaron esta especie.

Parabacteroides distans es una bacteria anaerobia estricta, Gram negativa, no formadora de esporas; productora de acetato y succinato [192]. En los modelos murinos se ha visto asociada en la regulación de la adiposidad del hospedero; a través de la producción de ácidos biliares secundarios, reduciendo la hiperlipidemia. En la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa se activa la vía del receptor nuclear FXR (del inglés, Farnesoid X receptor), que también regula genes implicados en el transporte de ácidos

biliares [174]. Se ha reportado que en la condición de obesidad hay disminución de *Parabacteroides distasonis*, con una correlación negativa principalmente con el IMC [201]. La literatura señala que en diabetes mellitus gestacional se ha detectado un enriquecimiento en esta especie bacteriana [202]. El análisis de la FAR en los siete grupos de estudio mostró una reducción en los grupos de voluntarios obesos, siendo menor en el grupo de obesos con glucosa normal respecto a los obesos diabeticos con una diferencia de 0,33%, al realizar el análisis estadístico (figura 4-11) se obtuvo una relación inversa entre la FAR de *Parabacteroides distasonis* con el IMC con un $\rho = -0,52$ y un $p = 6,4 \times 10^{-4}$ confirmando lo reportado por la literatura.

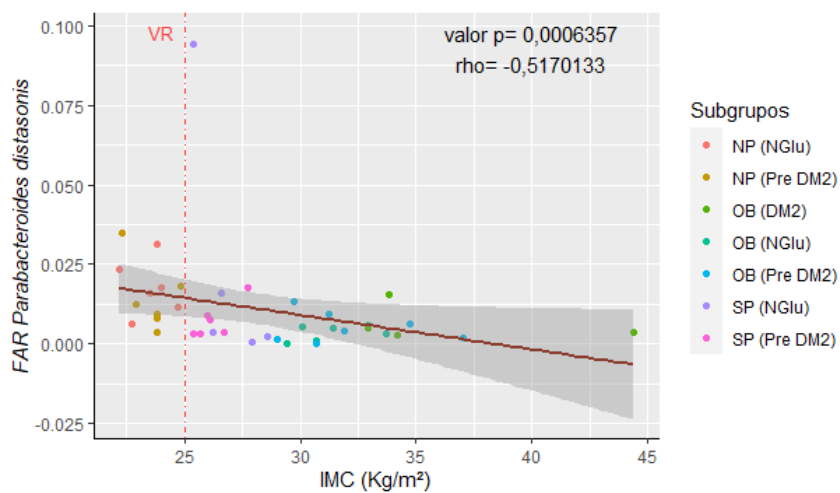


Figura 4-11: Relación de la especie *Parabacteroides distasonis* y el IMC. La línea punteada roja indica el valor de referencia del IMC que es $\leq 24,9$ Kg/m². La franja gris representa el rango de asociación entre las dos variables con un nivel de confianza del 95%, la recta roja indica una dependencia representativa e inversa entre el IMC y la abundancia relativa de esta especie bacteriana.

4.5 Análisis de diversidad α y β en las muestras de microbiota

La microbiota intestinal es altamente diversa y a pesar de que en este estudio únicamente se distinguió el 22,07% de las especies, el análisis de las coexistencias de éstas por individuo fue verificado por la función “diversidad α ” [203]. También se aplicó la “diversidad β ” para medir que tan similar o que tan distante es la composición microbiana entre muestras diferentes [204]. Para el estudio de la diversidad α y β , los datos de secuencia de los diferentes perfiles bacterianos fueron normalizados con relación a la muestra que

presentó el mínimo de lecturas, que fue 26.306 en un individuo de condición normopeso prediabético (NP Pre DM2); ese valor permite un análisis confiable de diversidad. El procesamiento de datos se realizó a nivel de las OTUs obtenidas en el análisis taxonómico. El estudio de diversidad α fue desarrollado con el índice de Shannon y el estimador de riqueza Chao 1; estos dos índices se calcularon aplicando un test de análisis de varianza ANOVA. Las gráficas que relacionan estos índices de diversidad con el IMC y estado glucémico fueron realizadas utilizando el Software MicrobiomeAnalyst.

La diversidad que describe el índice Shannon se ha discriminado como baja si éste reporta valores menores a 2; en el rango de 2 a 3,5 se considera una diversidad media, y valores superiores a 3,5 indican una diversidad alta [205]. El índice de Shannon calculado estuvo entre el rango de diversidad de 2,4 a 3,3, caracterizando la diversidad α de OTUs como media en el microbioma de los voluntarios analizados. Los resultados indicaron que no se tuvieron diferencias significativas ($p= 0,36$) de la biodiversidad de OTUs, entre los diferentes grupos discriminados por el IMC y el comportamiento glucémico (figura 4-12).

Los resultados para el índice Chao1 señalaron que los voluntarios presentaron un rango de riqueza microbiana entre 47 a 73 OTUs, de los 172 previamente descritos con el software QIIME 2TM. Una característica común fue la alta dispersión de los datos y no se observó una tendencia al aumento o a la disminución entre el número total de OTUs respecto al IMC o el control glucémico ($p= 0,13$) (figura 4-13). Este comportamiento en el análisis de diversidad reflejó una variación interindividual, en donde el número de OTUs exhibió un patrón comparable pero no significativo, confirmándose también porque la diversidad cualitativa de Shannon no presentó una variación entre los grupos. Los resultados son compatibles con otros estudios de microbioma que no reportan diferencias significativas entre los índices de diversidad y la condición analizada [206][207].

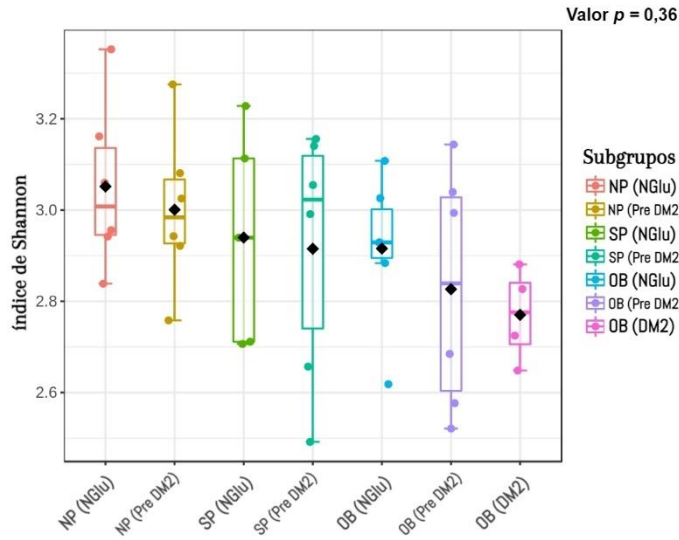


Figura 4-12: Relación de la diversidad α (índice de Shannon) en función del IMC y el comportamiento glucémico. Valor de $p= 0,36$ entre los diferentes grupos analizados.

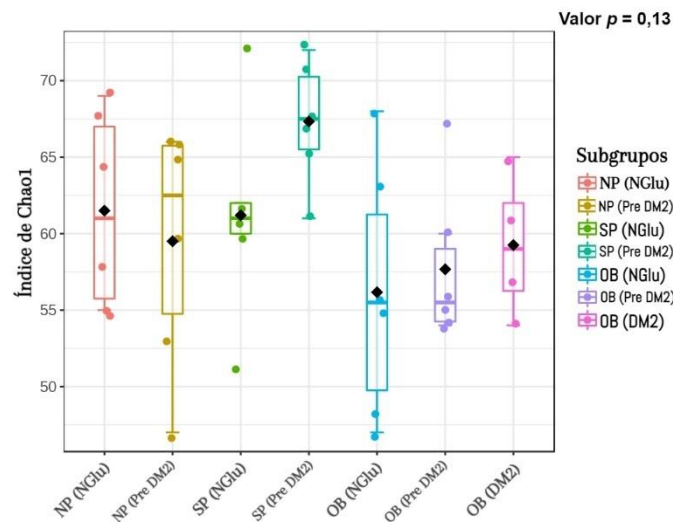


Figura 4-13: Relación de la diversidad α (índice de Chao 1) en función del IMC y el comportamiento glucémico. Valor de $p= 0,13$ entre los diferentes grupos analizados.

Las curvas de rarefacción representan el índice de Shannon como medida de diversidad α para evaluar la calidad de la secuenciación [208]. En estas curvas se representa el número de especies, respecto al número de lecturas de secuenciación; si una muestra tiene baja riqueza microbiana alcanzara una meseta de secuenciación a un menor número de lecturas, en comparación con otra que tenga mayor riqueza, debido a la profundidad de secuenciación [209]. La figura 4-14 muestra las curvas de rarefacción para cada individuo en los diferentes subgrupos de análisis; de éstas se deduce que la riqueza de especies

estuvo entre el 39% y el 64%, homogénea en todos los subgrupos. Estos resultados son compatibles con la ausencia de diferencias estadísticas significativas al aplicar los índices Shannon y Chao 1. Dada la normalización de las lecturas a 26.300 se acepta que se alcanzó la suficiente profundidad en secuenciación, para identificar aquellos taxones minoritarios en las muestras estudiadas.

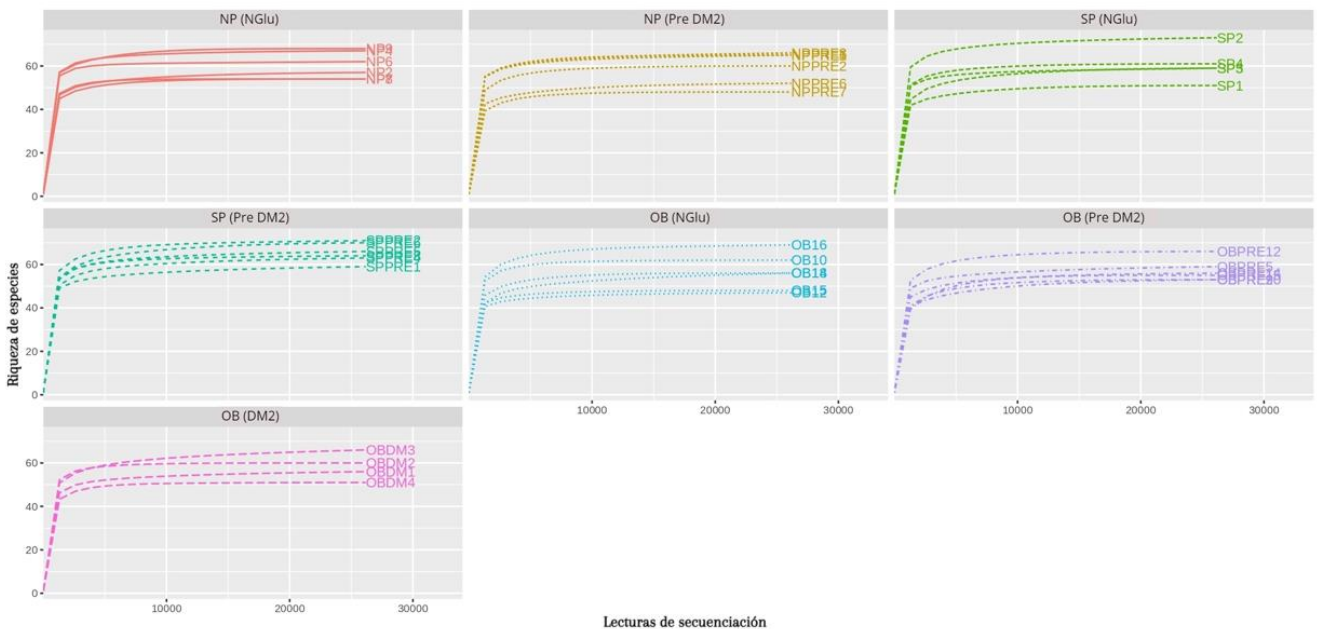


Figura 4-14: Curvas de rarefacción en la secuenciación de microbiota intestinal. Relación entre el número de especies detectadas en cada individuo (riqueza) en función del número de lecturas.

En la diversidad β se compara la composición microbiana entre muestras diferentes [209], ésta se calculó mediante el índice de Bray-Curtis; método no filogenético que tiene en cuenta la abundancia de OTUs [210]. Se realizó un análisis estadístico de permutaciones PERMANOVA, cuyos resultados se representaron por medio de gráficos bidimensionales, a través de un análisis de coordenadas principales (PCoA) detallado en la figura 4-15. Se confirma que en general no hay variabilidad en la composición microbiana intestinal; debido a que no se detectó significancia estadística entre los subgrupos ($p < 0,118$) y un coeficiente de correlación lineal $R^2=0,19$. Resultados coherentes dado que la población compartía características comunes de acuerdo con los criterios de inclusión.

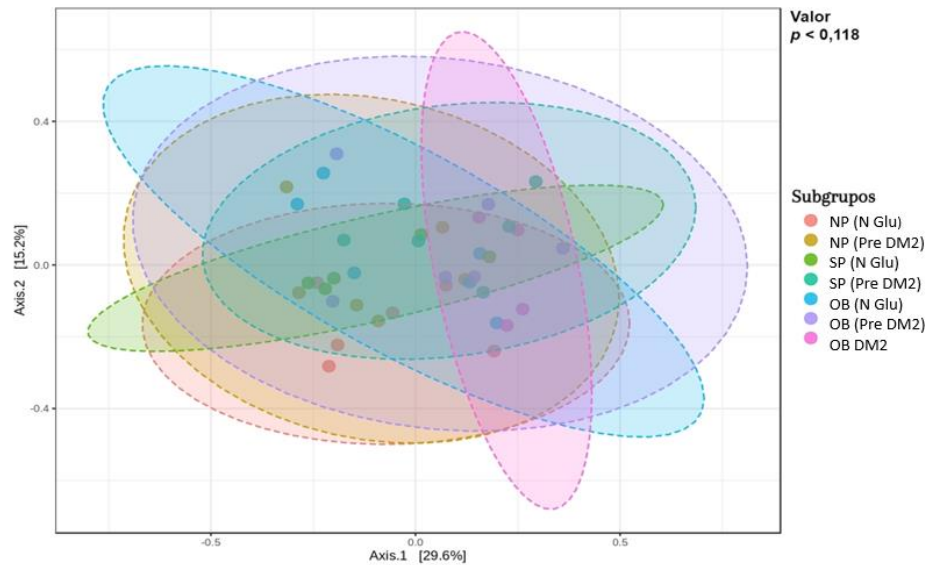


Figura 4-15: Análisis PCoA para evaluar diversidad β en la microbiota intestinal. Las elipses que representan la distribución de los datos se encuentran agrupadas, con $p < 0,118$.

Los resultados de los análisis de diversidad α y β muestran que no se tuvieron diferencias en la abundancia, la riqueza y la composición microbiana, consecuencia del tamaño pequeño de la muestra analizada ($n= 40$) y las características de la población en estudio con un rango estrecho de edad, en general alimentación de tipo occidental, sin diagnóstico de enfermedades crónicas o agudas y ausencia de medicación.

4.6 Biomarcadores de la microbiota intestinal asociados a DM2 y obesidad

Uno de los análisis más importantes en el estudio de la microbiota intestinal es la búsqueda de biomarcadores bacterianos, que sean clave para identificar un proceso patológico antes de que se desarrolle. Para ello se usó el algoritmo LEfSe, que permite realizar un análisis discriminante lineal basado en el efecto del tamaño de los datos obtenidos de la secuenciación. LEfse utiliza el algoritmo LDA (análisis de discriminación lineal) asignando como biomarcador aquellas unidades taxonómicas operativas OTUs con puntaje (score) mayor o igual a 2. De esta forma LEfse permite identificar OTUs que se diferencien entre

grupos al combinar pruebas estándar estadísticamente significativas, y la relevancia del efecto [211]. El procesamiento de los datos se realizó en el software MicrobiomeAnalyst y mediante el método FDR (del inglés, false discovery rate) se hizo la corrección del valor de p para garantizar la significancia estadística con mínimo el 90% de confianza. Se identificaron 14 taxones microbianos diferencialmente abundantes con LDA score superior a 2 entre los siete grupos estudiados (figura 4-16).

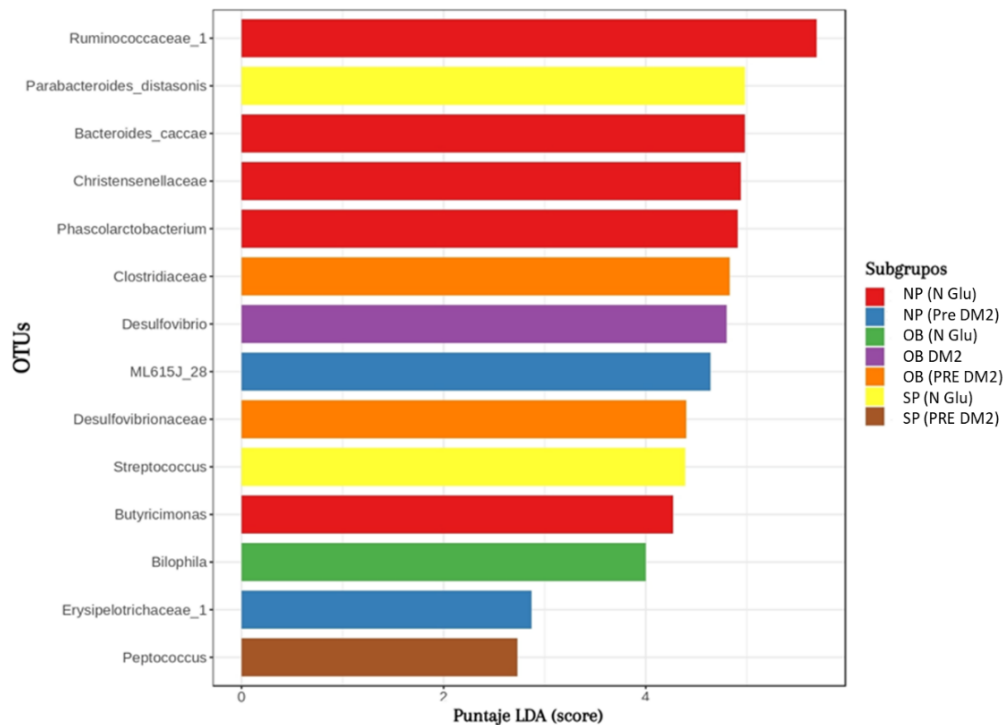


Figura 4-16: Taxones bacterianos identificados como biomarcadores entre subgrupos. Se considera biomarcador con puntaje LDA > 2. NP N Glu (normopesos con glucosa normal), NP Pre DM2 (normopesos prediabéticos), SP N Glu (sobrepesos con glucosa normal), SP Pre DM2 (sobrepesos prediabéticos), OB N Glu (obesos con glucosa normal), OB Pre DM2 (obesos prediabéticos), OB DM2 (obesos diabéticos).

En el subgrupo de los normopeso con glucosa normal (NP N Glu) se identificaron cinco taxones diferenciales, las familias Ruminococcaceae_1, Christensenellaceae, los géneros *Butyricimonas*, *Phascolarctobacterium* y la especie *Bacteroides caccae*. Los biomarcadores identificados para el subgrupo de los normopesos prediabéticos (NP Pre DM2) fueron el orden ML615J-28 y la familia *Erysipelotrichaceae_1*. Para el subgrupo de los sobrepeso con glucosa normal (SP N Glu) se identificaron la especie *Parabacteroides distasonis* y el género *Streptococcus*. En el subgrupo de los sobrepeso prediabéticos (SP

Pre DM2) se diferenció el género *Peptococcus*. En el subgrupo de obesidad con glucosa normal (OB N Glu) se identificó el género *Bilophila*; y en los obesos prediabéticos (OB Pre DM2) las familias Clostridiaceae y Desulfovibrionaceae. Por último, en el subgrupo de obesos diabéticos (OB DM2) se identificó el género *Desulfovibrio*.

De acuerdo con los resultados del análisis LEfSe, la familia *Ruminococcaceae_1* se describe como un biomarcador característico en los voluntarios NP N Glu con un puntaje LDA de 5,7 y un valor $p=0,05$. Es una familia bacteriana conocida por modular el perfil de los ácidos biliares y producir AGCC [212]. Diferentes estudios han señalado que dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados PUFA n-3 y aceites vegetales ricos en ácido α -linolénico aumentan la abundancia de este género, favoreciendo efectos antiinflamatorios y reduciendo la apoptosis [212][213]. Se ha encontrado en individuos metabólicamente sanos y se ha reportado una correlación negativa con el porcentaje de grasa corporal [214]. En el actual estudio la FAR de esta familia presentó una relación inversa estadísticamente representativa $r = -0,46$ con un $p = 0,002$ con los niveles de glucosa en ayunas (figura 4-17).

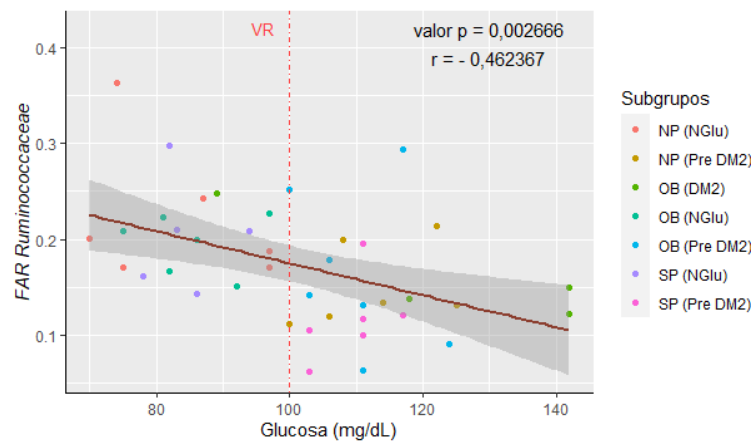


Figura 4-17: Relación entre la familia Ruminococcaceae y la glucosa preprandial. La línea roja punteada indica el valor de referencia de glucosa basal < 100 mg/dL. La franja gris representa el rango de confianza del 95% indicando una fuerte dependencia entre las variables, teniendo en cuenta la recta de tendencia roja.

La familia *Christensenellaceae* pertenece al filo de los Firmicutes y al orden de los Clostridiales, son productoras de AGCC y se ha reportado que pueden estar presentes desde el nacimiento y en general en el reino animal [215]. Se han relacionado con el consumo de alimentos lácteos, frutas, verduras, proteínas de origen animal y dietas bajas en azúcares refinados [216]. Varios estudios han reportado que hay una correlación

inversa de la abundancia relativa (FAR) con el IMC, los lípidos séricos y la apolipoproteína B [217][218][219]. Se ha evidenciado que trasplantes fecales que contenían estas bacterias previnieron la obesidad inducida en ratones libres de gérmenes [220]. La abundancia relativa es altamente dispersa dado que depende de la etnia, el sexo, la edad [221]; la FAR calculada en toda la población de estudio fue de $0,62\% \pm 0,95\%$, y específicamente los NP N Glu presentaron una abundancia promedio de $1,90\% \pm 1,36\%$ con LDA de 4,94 y $p=0,03$. La figura 4-18 muestra la relación inversamente proporcional entre la abundancia relativa de *Christensenellaceae* y los metabolitos glucosa preprandial y colesterol HDL (c-HDL) analizados bioquímicamente, además del IMC. Este comportamiento fue estadísticamente significativo, glucosa ($\rho=-0,32 - p=0,044$); c-HDL ($\rho= -0,42 - p= 0,0075$); e IMC ($\rho= -0,32 - p= 0,039$). Estos resultados son compatibles por lo reportado en la literatura [221].

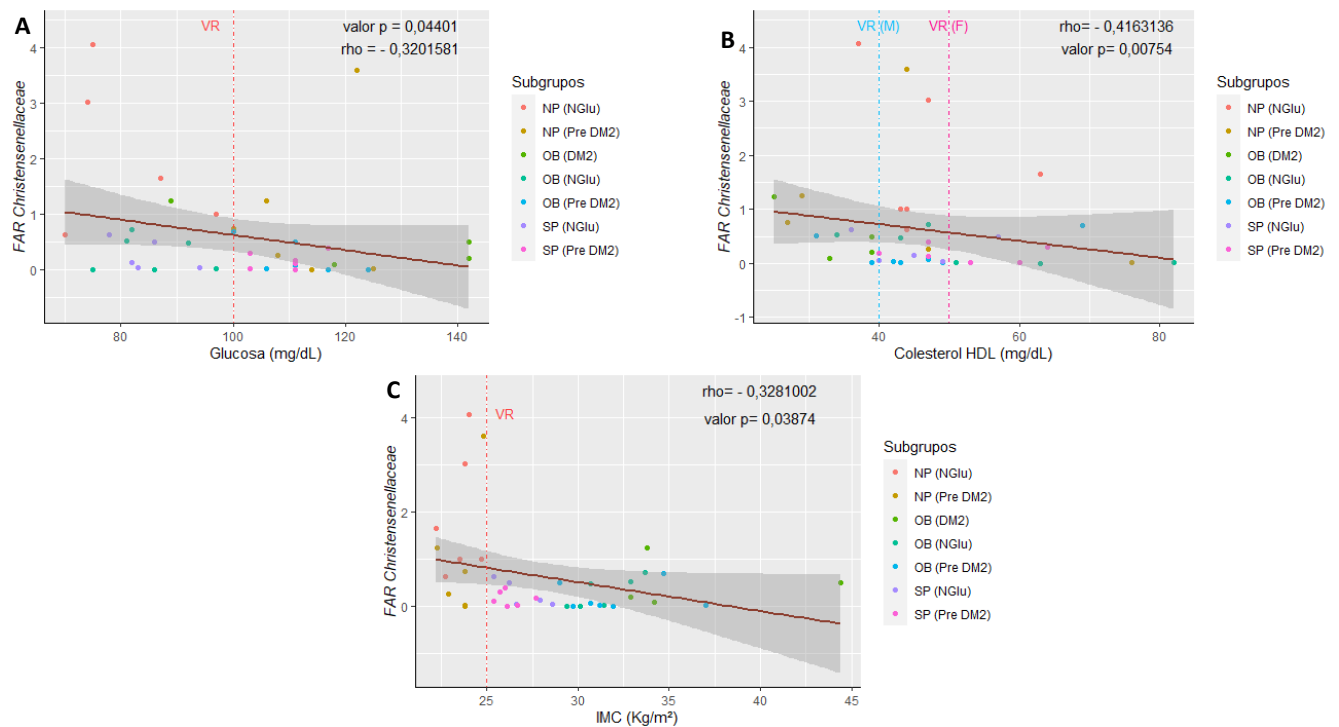


Figura 4-18: Relación de la familia *Christensenellaceae* con metabolitos e IMC. En (A) glucosa preprandial; (B) c-HDL; (C) IMC. La línea roja punteada indica el valor de referencia, para el c-HDL la línea punteada azul indica el valor referencia para los hombres (M) ≥ 40 mg/dL y l línea punteada rosada indica el valor para las mujeres (F) ≥ 50 mg/dL [117]. La franja gris representa el rango de confianza del 95% indicando una fuerte dependencia entre las variables, teniendo en cuenta la recta de tendencia roja.

El género bacteriano *Phascolarctobacterium* pertenece al Filo de los Firmicutes, son bacterias Gram negativas que se asocian a dietas ricas en grasas, almidón, cereales y productos lácteos, las bacterias que componen este género son productoras de AGCC principalmente acetato y propionato [18]. En los voluntarios NP N Glu fue detectado con $1,68\% \pm 2,71\%$ de FAR en promedio, LDA de 4,91 y $p= 0,06$. Se ha descrito que algunas especies de *Phascolarctobacterium* tienen la capacidad de reducir mediadores de inflamación asociados a obesidad. Inducen una respuesta antiinflamatoria en las células mononucleares de sangre periférica a través del aumento de IL-4, reduciendo los niveles de INF γ y la endotoxemia provocada por LPS de otras bacterias. Comercialmente la cepa de *P. faecium* DSM 32890 está siendo promocionada como probiótico para la prevención y el tratamiento de obesidad, según patente española ES2763874A1 [222].

El género *Butyricimonas* fue recientemente descrito y está conformado por bacterias Gram negativas, anaerobias que tienen la capacidad de producir butirato [223]. Se ha reportado en modelos murinos el aumento de este género tras la administración de metformina [224]. En la presente investigación la población en general presentó una FAR de $0,0023\% \pm 0,0025\%$, los voluntarios NP N Glu presentaron un promedio de abundancia para este género de $0,0044\% \pm 0,0019\%$ con LDA =4,3 ($p= 0,005$).

La literatura ha reportado que *Bacteroides caccae* tiene una frecuencia de abundancia relativa del 1% aproximadamente [225]; en el actual estudio de forma global para esta bacteria la FAR fue de $1,11\% \pm 0,02\%$. Sin embargo, específicamente para la población NP N Glu esta fue una de las especies de mayor abundancia con un promedio de $2,05\% \pm 1,33\%$. Se confirma como una especie microbiana diferencial de ese subgrupo debido a que se valoró un LDA de 4,9 ($p= 0,06$). La figura 4-19 evidencia una tendencia inversa entre la FAR con el IMC y el comportamiento glucémico. Se ha indicado un aumento de *Bacteroides caccae* y otras especies de *Bacteroides* en pacientes obesos que perdieron peso; se han asociado con la regulación de la concentración de lípidos, glucosa, insulina y leptina en sangre [226].

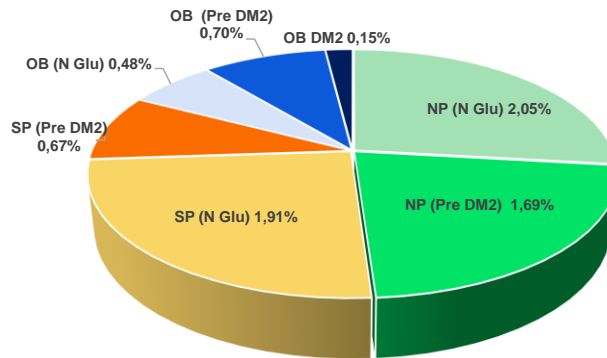


Figura 4-19: Abundancia relativa de la especie *Bacteroides Caccae* en cada subgrupo.

Se identificaron dos biomarcadores diferenciales para el grupo de los NP Pre DM2, el primero fue el orden bacteriano ML615J_28 del filo Tenericutes. Este presentó una abundancia en este subgrupo de $0,83\% \pm 1,07\%$ con un LDA de 4,6 ($p=0,05$). Se ha reportado que este taxón microbiano es significativamente heredable y se ha asociado a niveles bajos de triglicéridos y de IMC [227]. El segundo biomarcador que fue relevante es la familia *Erysipelotrichaceae_1* que pertenece al filo de los Firmicutes, son bacterias Gram negativas, anaerobias, no formadoras de esporas [228]. La abundancia relativa de *Erysipelotrichaceae_1* en toda la población analizada fue $1,45\% \pm 1,41\%$; específicamente en los voluntarios del subgrupo NP Pre DM2 se presentó un promedio de FAR de $1,76\% \pm 1,17\%$ con un LDA de 2,8 ($p= 0,08$). Hay reportes que sugieren que esta familia está relacionada con trastornos metabólicos en humanos. *Erysipelotrichaceae_1* puede producir ácidos grasos palmítico, esteárico y oleico. La acumulación excesiva de ácido palmítico en los tejidos da como resultado dislipidemia, hiperglucemia y aumento de la acumulación de grasa ectópica [229].

Parabacteroides distasonis fue un biomarcador diferencial que se relacionó con los voluntarios SP N Glu, con un promedio de FAR $2,34\% \pm 4,00\%$, LDA de 5,0 ($p= 0,04$) en contraste con lo detectado para el grupo en condición de obesidad (OB) de $0,50\% \pm 0,44\%$. Esta especie fue una de las bacterias representativas de la microbiota en toda la población analizada con FAR de $1,09\% \pm 0,02\%$. Se observó, además, que *Parabacteroides distasonis* presentó una relación inversa estadísticamente significativa con el IMC, de $\rho=-0,52$ y un $p= 6,4 \times 10^{-4}$ (figura 4-11). Se ha indicado que esta especie está involucrada en

la regulación del peso corporal, según estudios realizados en modelo murino y humano [174][230].

Otro biomarcador diferencial que se encontró en los voluntarios SP N Glu fue el género *Streptococcus* con $0,56\% \pm 1,01\%$ de FAR y LDA de 4,4 ($p= 0,04$); sin embargo, se considera que debe extenderse el análisis de este posible biomarcador en un amplio número de individuos, debido a que la abundancia relativa de este género en el 80% de la población analizada tendió a ser cero. *Streptococcus* está conformado por bacterias Gram positivas pertenecientes al filo de los Firmicutes, el aumento de estas bacterias se ha relacionado con dietas altas en grasas y su disminución con el consumo de fructosa [231]. Se ha sugerido de un enriquecimiento de *Streptococcus* en la microbiota principalmente en pacientes con enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico [232] [233].

El género *Peptococcus* del filo Firmicutes, fue el único biomarcador diferencial detectado en los voluntarios con sobrepeso y prediabetes (SP Pre DM2), se calculó un LDA de 2,8 ($p=0,06$) con FAR muy baja de $5 \times 10^{-5}\% \pm 9 \times 10^{-5}\%$. Las bacterias que componen este género son cocos Gram positivos, que obtienen su energía principalmente de compuestos nitrogenados y de piruvato. Recientemente se indicó el aumento de este género en pacientes con alteración en la glucosa que tenían deterioro cognitivo [234].

En el grupo de obesidad-normoglicemia (OB N Glu) se detectó el género microbiano *Bilophila*, se calculó un LDA de 4,0 ($p=0,06$). Los reportes indican que este género presenta una FAR $<0,1\%$ en la microbiota intestinal normal [235]; en el actual estudio la FAR para *Bilophila* fue de $0,0012\% \pm 0,0019\%$ en promedio para toda la población y específicamente para el grupo OB N Glu fue de $0,0021\% \pm 0,0031\%$, resultados coherentes con lo indicado la literatura. Este género pertenece al filo de las proteobacterias, familia Desulfovibrionaceae.[236].

Las familias Clostridiaceae y Desulfovibrionaceae fueron caracterizadas como biomarcadores diferenciales en los voluntarios con obesidad-prediabetes (OB Pre DM2). Clostridiaceae presentó una abundancia relativa de $0,89\% \pm 0,85\%$ en toda la población analizada. Específicamente en el grupo de voluntarios OB Pre DM2 se midió una FAR de $1,74\% \pm 1,15\%$ con LDA de 4,8 ($p= 0,09$). Clostridiaceae pertenece al filo Firmicutes, son bacterias Gram positivas, anaerobias, formadoras de endosporas, y producen H_2 en la electrofermentación de la glucosa [237]. Algunas especies de esta familia tienen abundancias relativas aumentadas en personas prediabéticas y diabéticas. Clostridiaceae

puede afectar los neurotransmisores involucrados en las vías de señalización intestino-cerebro, que controlan el tránsito intestinal, los niveles de serotonina y la permeabilidad intestinal [76].

La literatura informa que, en el modelo murino, el aumento en la abundancia de la familia Desulfovibrionaceae es un signo de disbiosis intestinal. Las bacterias que conforman este género producen H₂S que puede reducir los enlaces disulfuro de la capa de moco intestinal, lo que conlleva a una exposición del epitelio a bacterias patógenas y a toxinas [238]. Desulfovibrionaceae presentó un LDA de 4,4 ($p=0,09$), con 1,00% \pm 1,20% de FAR promedio en la población general. Se ha informado que el aumento de estas bacterias se relaciona con la disminución del filo Bacteroidetes y los miembros de la familia Lachnospiraceae [239].

Los voluntarios en condición de obesidad y diabetes (OB DM2) presentaron el género *Desulfovibrio*, como un biomarcador diferencial con LDA de 4,8 ($p=0,08$) y FAR de 1,48% \pm 1,71%. *Desulfovibrio* fue uno de los géneros representativos de la microbiota en toda la población analizada con FAR de 0,74% \pm 1,04%. Las bacterias de este género pertenecen a la familia Desulfovibrionaceae que se compone por más de 30 especies propuestas. Este género bacteriano ha sido altamente asociado al desarrollo de DM2 y obesidad, principalmente por su capacidad de aumentar la permeabilidad intestinal con el aumento de LPS [240].

Los resultados del análisis LEfSe indicaron que a medida que se tuvo un aumento en el IMC y alteración de la glucemia, los taxones microbianos que prevalecieron correspondieron a bacterias no productoras de butirato y con capacidad de inducir endotoxemia en el hospedero. Un resultado importante fue que todos los voluntarios en condición de obesidad, independientemente de su estado glucémico, presentaron un aumento de la familia Desulfovibrionaceae del filo Proteobacteria, especialmente los géneros *Bilophila* y *Desulfovibrio* (tabla 4-7). Estas bacterias están estrechamente relacionadas a un alto consumo de alimentos de origen animal, pero de baja calidad, es decir, ultraprocesados y pobres en fibra dietética. Este estilo de alimentación altera la composición genética y la actividad metabólica de la microbiota intestinal [241][11]. Los resultados aquí presentados son coherentes con lo reportado previamente en población colombiana, ya que individuos con dieta de calidad presentaron microorganismos de la familia Ruminococcaceae; en ese mismo reporte aquellos sujetos con dietas ricas en

ultraprocesados tuvieron un enriquecimiento de proteobacterias especialmente *Bilophila* [242].

Tabla 4-7: Resumen del análisis LEfSe.

SUBGRUPO	CATEGORÍA TAXONÓMICA	TAXÓN MICROBIANO	LDA	VALOR <i>p</i>
NP (N Glu)	Familia	Ruminococcaceae_1	5,7	0,05
NP (N Glu)	Familia	Christensenellaceae	4,9	0,03
NP (N Glu)	Género	<i>Butyricimonas</i> ,	4,3	0,005
NP (N Glu)	Género	<i>Phascolarctobacterium</i>	4,9	0,06
NP (N Glu)	Especie	<i>Bacteroides caccae</i>	4,9	0,06
NP (Pre DM2)	Orden	ML615J_28	4,6	0,05
NP (Pre DM2)	Familia	<i>Erysipelotrichaceae_1</i>	2,8	0,08
SP (N Glu)	Género	<i>Streptococcus</i>	4,4	0,04
SP (N Glu)	Especie	<i>Parabacteroides distasonis</i>	5	0,04
SP (Pre DM2)	Género	<i>Peptococcus</i>	2,8	0,06
OB (N Glu)	Género	<i>Bilophila</i>	4	0,06
OB (Pre DM2)	Familia	Clostridiaceae	4,8	0,09
OB (Pre DM2)	Familia	Desulfovibrionaceae	4,4	0,09
OB DM2	Género	<i>Desulfovibrio</i>	4,8	0,08

Se muestran los puntajes LDA y la significancia estadística para cada uno de los biomarcadores obtenidos del análisis LEfSe, los biomarcadores que presentaron mayor puntaje LDA en el grupo de los normopeso con glucosa normal NP (N Glu) son taxones microbianos productores de butirato; mientras que en los voluntarios obesos independientemente del comportamiento glucémico se observó la presencia de la familia Desulfovibrionaceae.

Anteriormente se indicaba que en el desarrollo de DM2 y obesidad se tenía un aumento de Filo Firmicutes sobre el de Bacteroidetes, pero los últimos reportes indican que se observa la pérdida de la riqueza microbiana, la disminución de bacterias productoras de butirato y el aumento de bacterias con potencial proinflamatorio principalmente del filo proteobacteria [5][76].

4.7 Análisis nutricional y asociación con los perfiles bacterianos

A todos los voluntarios que participaron en este proyecto, se les aplicó un cuestionario de frecuencia de alimentos (FFQ), previamente diseñado y validado en población colombiana por el Centro de Investigación Epidemiológica, Observatorio Epidemiológico de Enfermedades Cardiovasculares, de la Universidad Industrial de Santander [92]. Los registros de las encuestas están siendo tabulados, y con la ayuda del Doctor Oscar Fernando Herrán, uno de los diseñadores de la herramienta, se presenta como reporte parcial el procesamiento de los datos de los primeros 511 voluntarios. Mediante esta herramienta se recopiló datos de la calidad nutricional de los voluntarios reclutados en el estudio. En la tabla 4-8 se detalla el consumo energético y la ingesta de macronutrientes que describe de forma general el tipo de alimentación de los voluntarios.

Los resultados descritos en la tabla 4-8, que resume la ingesta de macronutrientes en la población analizada, presentan altas desviaciones estándar; esa amplia dispersión de los datos puede estar asociada a los procesos nutricionales individuales que no son tan uniformes en la población. Al comparar los resultados de ingesta de macronutrientes y consumo de energía obtenidos en este estudio, con un reciente reporte de población colombiana [242], en general los valores mostraron diferencias aproximadamente entre 10% y 15%, para el consumo energético, de proteína, carbohidratos, grasas y fibra.

La literatura ha recomendado una ingesta de grasas saturadas menor al 10%, criterio que cumplieron los voluntarios de este estudio. En cuanto a la ingesta de fibra total el valor recomendado es de 14 g/1000 Kcal [243], los voluntarios presentaron una ingesta de fibra total de 15,99 g, teniendo un promedio de 2519 Kcal, por lo tanto, el consumo de fibra ideal sería de 35,3 g. Altos niveles de fibra se asocian con tasas de prevalencia significativamente más bajas de DM2, obesidad y dislipidemias. Se ha reportado que un consumo de fibra cruda (solubles o viscosas) de 12 a 24 g/día puede reducir hasta un 13% los niveles de colesterol LDL [244]. La determinación en la ingesta de proteínas en los voluntarios fue del 18%, que está dentro de las recomendaciones reportadas; se ha sugerido un valor mínimo de ingesta proteica del 15% para cumplir con el requerimiento promedio estimado [100].

Tabla 4-8: Consumo diario de energía, macronutrientes y colesterol

Nutrientes	Promedio de ingesta	Ingesta	Recomendación a nivel global	Referencia
Energía y macronutrientes				
Consumo energético	2519 ± 1648 Kcal		2025 Kcal	[245]
Proteínas	97,84 ± 74,78 g	18%	14-20%	[245]
Carbohidratos	331,6 ± 196,9	62%	45-65%	[245]
Grasa total	93,21 ± 67,37 g	17%	20-35%	[246]
AGS	29,34 ± 21,44 g	5%	<10%	[246]
AGMI	29,57 ± 22,06 g	6%	10-25%	[246]
AGPI	12,02 ± 9,39 g	2%	6-11%	[246]
Fibra total	16 g	3%	14 g/1000 Kcal 20 a 25 g	[247],[243]
Micronutriente				
Colesterol	489,00 ± 315,52 mg		≤ 300 mg	[115]

Se muestra los valores promedio ± la desviación estándar. AGS representa los ácidos grasos saturados, AGMI los ácidos grasos monoinsaturados y AGPI los ácidos grasos poliinsaturados.

La ingesta de carbohidratos en el actual estudio se calculó en 331,6 ± 196,9 g/día, este es un valor mayor al compararlo con otros reportes de población colombiana, que indican una ingesta entre 285 g y 305 g para este macronutriente [92][242]. Sin embargo, en términos generales la distribución de la ingesta de macronutrientes especialmente carbohidratos y proteínas en los voluntarios enrolados es comparable con lo sugerido por “Recomendaciones de Ingesta de Energía y Nutrientes (RIEN) para la Población Colombiana”, reporte técnico del año 2016, de la Subdirección de Salud Nutricional Alimentos y Bebidas, Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. En ese documento indican que la ingesta de carbohidratos debe estar del 50% al 65%, las proteínas entre el 14% y el 20% [248]. Los voluntarios presentaron un consumo menor de grasas totales, ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a lo globalmente recomendado. Los AGPI hacen parte de los ácidos grasos esenciales que deben ser consumidos en la dieta dado que no son sintetizados endógenamente y su requerimiento está relacionado con el correcto funcionamiento del sistema nervioso y la actividad antiinflamatoria [249]. La población analizada presentó un consumo elevado de colesterol, compatible con el alto porcentaje de dislipidemias detectado en la población.

Recientemente se ha propuesto que la dieta es capaz de modificar casi el 60% de la composición microbiana, por ello se indica de una relación directa entre la dieta y la microbiota intestinal [250]. La composición microbiana encontrada en los voluntarios corresponde a géneros asociados con la ingesta de estos macronutrientes principalmente proteínas y carbohidratos como lo son los géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Dialister*, *Bilophila*, *Desulfovibrio*, entre otros. Varios estudios indican que estas dietas de baja calidad nutricional tienen el potencial de alterar la microbiota intestinal, al aumentar los lipopolisacáridos (LPS), aumentar el N-óxido de trimetilamina (TMAO) y disminuir los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) favoreciendo un estado inflamatorio [251]. Bacterias de los filos Firmicutes y Proteobacteria son capaces de metabolizar la colina, lecitina, carnitina y betaína son nutrientes presentes en las carnes rojas, mariscos, pollo, entre otros alimentos, conduciendo a la acumulación de trimetilamina que se convierte en TMAO en el hígado. Niveles circulantes elevados de TMAO se han relacionado con un mayor riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y DM2 [5][251][252].

Se debe reforzar el consumo de fibra, especialmente la fibra soluble o dietética, este tipo de fibra se compone principalmente de tres subgrupos, (i) polímeros de carbohidratos que existen naturalmente en plantas comestibles y se consumen como vegetales, frutas, semillas, cereales y tubérculos; (ii) polímeros de carbohidratos comestibles con beneficios fisiológicos como oligosacáridos resistentes, inulina, psyllium; (iii) polímeros de carbohidratos sintéticos como la metilcelulosa. Se ha comprobado que la fibra aumenta la diversidad bacteriana, promoviendo la abundancia de géneros productores de butirato principalmente *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Eubacterium* *Lactobacillus*, entre otros [253]. Es importante para el cuidado de la microbiota intestinal aumentar el consumo de prebióticos, probióticos, ácidos grasos poliinsaturados y polifenoles antioxidantes, así como la reducción de la ingesta de colesterol para lograr un incremento en géneros que ya están definidos como marcadores de buena salud intestinal como lo son *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium*.

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Para dar cumplimiento al objetivo general y a los específicos planteados, se analizaron los perfiles filogenéticos de la microbiota intestinal en adultos colombianos entre 40 a 70 años, cuyos factores de riesgo a obesidad fueron además determinados por pruebas bioquímicas, medidas antropométricas y de composición corporal. Esas medidas, junto con el cuestionario FINDRISC permitieron relacionar el factor de riesgo a DM2 en los voluntarios.

El análisis de los factores de riesgo en 535 voluntarios se realizó discriminando la población de acuerdo con el IMC y como subgrupo el comportamiento glucémico; de forma general se encontró que el 70% de la población presentó alteración en el IMC, situación confirmada con los resultados de composición corporal. Se determinó que el perímetro de cintura, la grasa visceral y la grasa total presentaron valores mayores al referencial recomendado, incluso desde el estado de normopeso y especialmente en sobrepeso y obesidad

El análisis de las pruebas bioquímicas a nivel de metabolismo, indican una amplia dispersión en los resultados de glucosa y del perfil lipídico. La determinación de glucosa preprandial presentó valores entre 57 y 297 mg/dL; que permitió identificar voluntarios con prediabetes en un 21,1% ($n=113$) y con diagnóstico presuntivo de DM2 2,2% ($n=12$), quienes desconocían dichas alteraciones. A nivel del perfil lipídico y específicamente para triglicéridos se encontró que los voluntarios en condición de sobrepeso y obesidad presentaron en promedio un valor mayor al rango ideal (≤ 150 mg/dL); el valor promedio para la prueba de colesterol total, incluso desde el estado de normopeso estuvo mayor al rango óptimo (≤ 200 mg/dL), datos directamente relacionados con los resultados catalogados como “bordeline alto” para colesterol LDL, cuyo valor promedio fue de 141 mg/dL en toda la población de estudio. El 63% de la población analizada presentó colesterol HDL menor al valor referenciado como meta ideal (≥ 50 mg/dL en mujeres y en hombres ≥ 40 mg/dL).

El puntaje del cuestionario FINDRISC osciló entre 0 y 25 puntos, y se evidenció una relación directa con el IMC. Se determinó que los voluntarios en condición de obesidad presentaron riesgo alto (33%) a desarrollar DM2 en 10 años; en aquellos con sobrepeso se detectó un riesgo moderado (17%) y los normopeso, 4% con riesgo bajo.

Con los resultados antropométricos y metabólicos se calcularon los índices aterogénicos que permitieron definir el riesgo cardiovascular en la población; la evaluación de estos índices expuso que incluso en la población normopeso se expresaron marcadores de riesgo metabólico y cardiovascular. Se concluye que la evaluación del riesgo no debe ceñirse exclusivamente a las pruebas bioquímicas y antropométricas de forma aislada; la evaluación debe ampliarse hasta la implementación de herramientas de fácil acceso y aplicación como el FINDRISC, los índices antropométricos y aterogénicos. Mediante esas herramientas se identificó que al menos el 50% de la población reclutada presentó riesgo a DM2 entre moderado y alto en los próximos diez años. Los resultados de los índices aterogénicos que evalúan el riesgo cardiovascular y el desarrollo de resistencia a la insulina indicaron que el 82% de la población presentó el índice cintura/altura alterado, también en el índice c-LDL/c-HDL se detectó alteración en el 65% de la población, el 60% en el índice CT/c-HDL y el 57% el índice TG/c-HDL.

Para analizar el perfil genético y taxonómico de la microbiota intestinal en muestras de materia fecal, se seleccionaron 40 muestras discriminadas por el IMC y comportamiento glucémico. Se realizó secuenciación del gen 16S rRNA por medio de la tecnología Ion Torrent, que permitió asignar taxonómicamente y en porcentaje de abundancia relativa (FAR) a nivel de filo, género y especie (figura 5-1). Los filios más abundantes en la población fueron Firmicutes (49,2%), Bacteroidetes (39,8%) y proteobacteria (7,4%). A nivel de género los más abundantes fueron *Bacteroides* (16,05%), *Prevotella* (13,82%) y *Ruminococcus* (4,41%). Las especies que presentaron mayor FAR fueron *Prevotella copri* (12,86%), *Bacteroides uniformis* (2,90%) y *Bacteroides caccae* (1,11%).

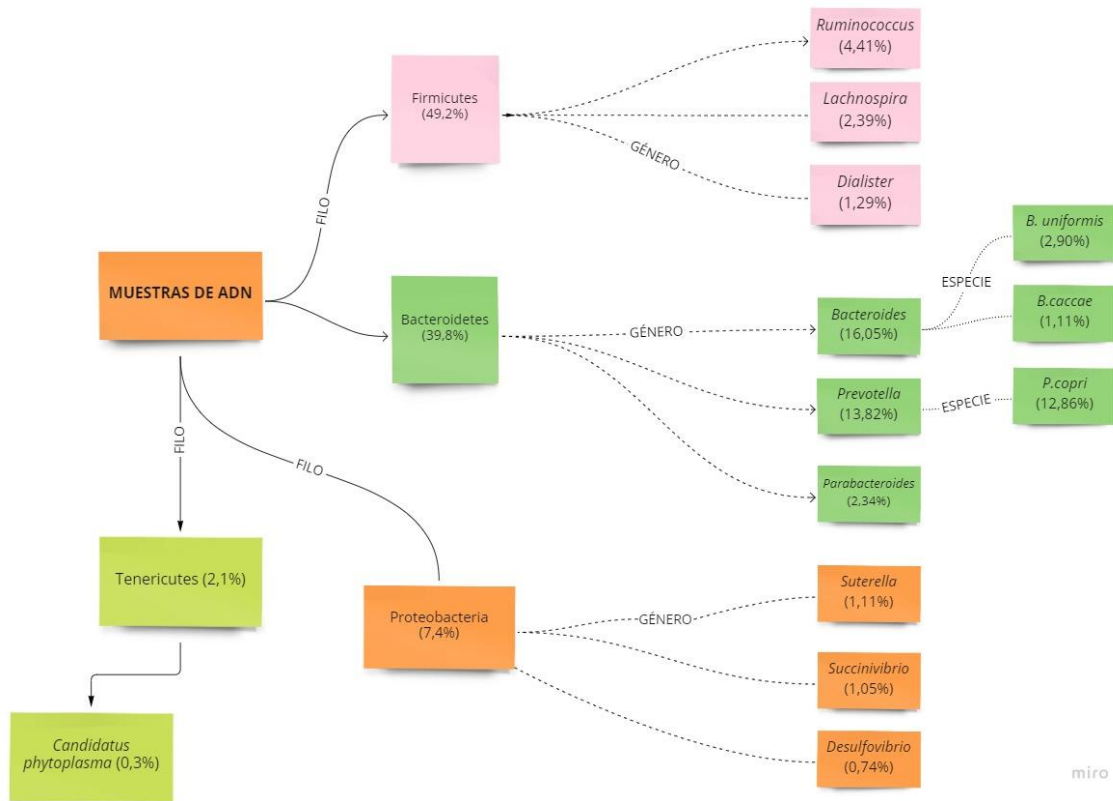


Figura 5-1: Diagrama resumen de los filos, géneros y especies con mayor abundancia.

Otra conclusión relacionada con el análisis de los perfiles bacterianos es que a nivel de filo se logró caracterizar el 97,1% de la microbiota; sin embargo, al subir de nivel en clasificación taxonómica hasta especie solo el 22,07% de las bacterias fueron identificadas. Entre voluntarios y los diferentes subgrupos hubo una alta dispersión de los datos, sugiriendo que la abundancia y la composición microbiana es un perfil característico de cada individuo.

Se detectaron diferentes perfiles microbianos con posible relación al desarrollo de DM2 y obesidad. Se calculó que la relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) fue ≥ 1 en todos los subgrupos incluyendo el subgrupo de los normopeso normoglucémicos (NP N Glu); la relación $F/B \geq 1$ se ha descrito como un posible biomarcador de factor de riesgo a obesidad y se ha relacionado a dietas de baja calidad nutricional. El filo proteobacteria fue el tercero en abundancia (7,4%), esa FAR se ha expuesto como un criterio potencial de enfermedad, por la presencia de microorganismos que pueden inducir endotoxemia metabólica. Inesperadamente el filo Actinobacteria presentó una FAR baja (0,3%), en comparación con

lo reportado en otras poblaciones (5,0%), este género está conformado por bacterias que se han relacionado con un buen estado de salud.

Al correlacionar los resultados de microbiota intestinal con los parámetros nutricionales de los voluntarios se observó que la población no está cumpliendo con los niveles óptimos recomendados de ingesta de fibra, que promueve un estado de eubiosis en la microbiota y esto se relacionó con abundancias disminuidas de *Bifidobacterium* (0,22%), *Akkermansia* (0,18%), y *Faecalibacterium prausnitzii* (0,75%) respecto a las reportadas por la literatura, la disminución de estos microorganismos es deletoria para la salud, dado sus propiedades probióticas y son característicos de una microbiota intestinal en estado de eubiosis.

La correlación entre la microbiota intestinal y los parámetros clínicos de los voluntarios se determinó por diferentes vías, la primera analizando las abundancias relativas de los taxones microbianos identificados; la segunda aplicando análisis de diversidad α y β ; y la tercera un estudio de posibles biomarcadores mediante el análisis estadístico de discriminación lineal (LEfSe). De la observación de las abundancias se tuvo que los géneros más predominantes en los subgrupos analizados pertenecieron al filo de los Bacteroidetes, de estos se destaca que el género *Bacteroides* que mostró una tendencia inversa con los porcentajes de grasa visceral $\rho = -0,29$ $p = 0,06$; y la especie *Parabacteroides distasonis* que presentó una correlación inversa con el IMC ($\rho = -0,52$) estadísticamente significativo ($p = 6,4 \times 10^{-4}$). Se encontró el género *Fusobacterium* en voluntarios en estado de obesidad, dicho género se ha relacionado con implicaciones importantes como lo son el desarrollo de algunos tipos de cáncer.

A partir del análisis LEfSe se identificaron 14 biomarcadores microbianos diferenciales para los 7 subgrupos analizados, la familia Ruminococcaceae presentó el mayor puntaje LDA= 5,7 en el subgrupo (NP N Glu) y el análisis estadístico confirmó una relación inversa entre esta familia con los niveles de glucosa ($r = -0,46$ $p = 0,002$), por lo que se concluye que podría ser un biomarcador asociado a buen estado de salud. Otro hallazgo importante, fue que los voluntarios en condición de obesidad independientemente de su comportamiento glucémico compartieron la presencia de la familia Desulfovibrionaceae. El género *Desulfovibrio* fue el biomarcador hallado en el grupo de los obesos diabéticos, asociado a endotoxemia y permeabilidad intestinal. El análisis de FAR de estos biomarcadores en

voluntarios obesos evidenció pérdida en la abundancia de varios grupos microbianos principalmente aquellos productores de butirato.

Los estudios de microbiota intestinal son relevantes porque permiten conocer la composición microbiana a nivel individual y en términos generales de la población. El reconocer los taxones microbianos que conforman la microbiota intestinal, permite elucidar el estado de eubiosis o de disbiosis del individuo. Además, dirigir las intervenciones mediante prebióticos y probióticos de esos biomarcadores bacterianos que se encuentren defectivos asociados como beneficiosos para la salud. Se confirmó que la microbiota es propia de cada individuo y los parámetros de diversidad y abundancia reflejan su estado fisiológico.

5.2 Recomendaciones

Se debe continuar con el análisis de los datos semiprocesados para un total de 85 muestras de microbiota intestinal, que se reunieron en las diferentes jornadas de salud. Se debe ampliar el estudio de microbiota a personas jóvenes y de diferentes etnias, para asociar los factores de riesgo a obesidad, DM2 y otras patologías.

Es importante destacar que cada uno de los pasos desde la toma de la muestra de heces, la conservación de las muestras, extracción de ADN, secuenciación y el análisis de los datos afecta los resultados finales por lo que es complejo hacer extrapolaciones con otros estudios de microbiota intestinal.

Se logró la determinación de biomarcadores diferenciales en diferentes subgrupos clasificados por su IMC y su comportamiento glucémico en una muestra pequeña, es vital el análisis de las interacciones de estas bacterias, con otras comunidades intestinales entre ellas virus, la micobiota y parásitos, así como adelantar estudios metabólicos para elucidar los mecanismos que les permite relacionarse y su función en la salud del hospedero. En Colombia se tienen pocos reportes de microbiota intestinal por lo que la mayoría de las relaciones que se hicieron fueron con reportes de otros grupos poblacionales por lo que se recomienda ampliar este tipo de estudios en nuestra población

con un número mayor de muestra para evaluar intervenciones nutricionales y el refuerzo de políticas de salud.

Se sugiere en las heces, la determinación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), prebióticos, además de los niveles de lipopolisacáridos (LPS), TMAO, citocinas y algunas hormonas para asociarlos a los procesos metabólicos y proinflamatorios.

A los voluntarios se les entregó los resultados y las recomendaciones de los análisis bioquímicos y antropométricos, además de las sugerencias en educación para estilos de vida saludable; se recomienda hacer extensiva la información del estudio individualizado de índices aterogénicos y de microbiota intestinal. De acuerdo con los resultados de la encuesta de ingesta de alimentos se recomienda incentivar en la población un mayor consumo de fibra, ácidos grasos poliinsaturados y de polifenoles antioxidantes.

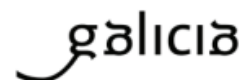
Anexos

6.1 Anexo A1. Aprobación comité de ética USC Lugo-España



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Cristina Márquez Riveras, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/09/18 el estudio:

Título: Obesidad y diabetes en Iberoamérica: factores de riesgo y nuevos biomarcadores patógenos y predictivos

Versión: Versión 2 de 31 de julio de 2018 y HIP al participante versión 1 de 22 de junio de 2018 y consentimiento informado versión 1 de 22 de junio de 2018 y consentimiento informado ANTE TESTIGOS versión 0 de 22 de junio de 2018 (castellano y gallego)

Promotor/a: Alberto Cepeda Sáez

Investigador/a: Alberto Cepeda Sáez

Código de Registro: 2018/270

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

6.2 Anexo A2. Aprobación comité de ética Facultad de Ciencias UNAL



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE
CIENCIAS

Bogotá, marzo 04 de 2019

Profesora
Martha Nancy Calderón Ozuna
Departamento de Química

Respetada Profesora:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 04 de marzo de 2019 (Acta 02-2019), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

P1: Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.

Proyecto: Obesidad y diabetes en Iberoamérica: Factores de riesgo y nuevos biomarcadores patogénicos y predictivos.

Red IBEROBDIAN (España, Méjico, Colombia, Chile y Argentina).

Responsables. Investigadores en la Universidad Nacional de Colombia: **Martha Nancy Calderón Ozuna** (Grupo de Investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias, Facultad de Ciencias). Facultad de Medicina: Luz Helena Aranzález (Grupo de Investigación Nutrición y Hormonas) y los Estudiantes Julieth Daniela Buell Acosta, Haiver Antonio Rodríguez Navarro y Lida Marcela Caicedo Torres.

Observaciones:

Tipo de estudio. Identificación de nuevos marcadores biológicos para predicción y diagnóstico de diabetes mellitus tipo II (DM2), mediante tratamiento masivo de datos, en países iberoamericanos. Se aplicarán encuestas a población adulta (40 a 70 años de edad) para tomar datos socioeconómicos, demográficos, de antecedentes familiares, nutricionales. Se harán medidas antropométricas y valoraciones clínicas de rutina. Se obtendrán para análisis muestras de sangre, saliva heces y orina.

Los principales **aspectos éticos, legales y ambientales** a tener en cuenta por los investigadores están relacionados con:

1. **Protocolos de bioseguridad.** BPL y sistema institucional de gestión ambiental.
2. **Guías y pautas normativas.** Protocolos de Consentimiento Informado: autorización para la toma y análisis de muestras biológicas (sangre, saliva, orina heces).
3. Protección de los desarrollos y cumplimiento de normativas sobre **propiedad intelectual.** Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.
4. El proyecto macro cuenta con aval del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo (Galicia, España): Acta del 20 de septiembre de 2018.

Concepto: Proyecto Avalado.

LUIS FERNANDO OSPINA GIRALDO
Coordinador Comité de Ética

2

6.3 Anexo B. Consentimiento informado

INFORMACIÓN DE INTERÉS PARA LOS PARTICIPANTES

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la obesidad son enfermedades metabólicas de alta prevalencia en el mundo. Las complicaciones vasculares son las manifestaciones más graves de la DM2; la aterosclerosis tiene una directa relación con las enfermedades cardiovasculares; la nefropatía, la retinopatía y neuropatía diabética son complicaciones que se desarrollan a mayor plazo. En los adultos mayores además de las complicaciones microvasculares (que incluyen amputaciones de las extremidades inferiores) y las cardiovasculares, se ha documentado como causa de mortalidad incidentes hiperglucémicos e hipoglicémicos fulminantes, que demandan intensificar los esfuerzos en investigación científica. Existe una población que puede desarrollar DM2 sin síntomas, de éstos el 20% son diagnosticados cuando se manifiestan las complicaciones, como la retinopatía, o falla cardíaca sin previo aviso. Investigaciones recientes han relacionado alteraciones de la microbiota intestinal con estas patologías. En el actual estudio se pretende ampliar el conocimiento de la DM2 y la obesidad desde las relaciones genéticas, metabólicas, hormonales y su asociación con las alteraciones de la microbiota intestinal.

Procedimientos que se van a usar:

- (1) Se realizará una encuesta nutricional y se interrogará al participante por datos socioeconómicos, demográficos y de antecedentes familiares.
- (2) Se obtendrán medidas antropométricas tales como peso, talla y perímetro de cintura.
- (3) Se medirá la tensión arterial.
- (4) Se tomarán muestras de sangre en ayunas, saliva, orina y heces.

Con esas muestras se harán los análisis metabólicos, estudios de biomarcadores genéticos y de microbiota.

El proceso de toma de muestras será realizado por personal cualificado. Las muestras obtenidas serán analizadas de manera confidencial en el Laboratorio de la División de Lípidos y Diabetes del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.

Las molestias o los riesgos esperados:

Esta investigación se clasifica en el Grupo de “Investigación con riesgo mínimo”. La única molestia que podría derivar es dolor, hinchazón y/o enrojecimiento en el sitio de punción venosa. En caso de cualquier molestia en los días siguientes a la punción, el participante será valorado por el grupo de investigadores que realiza el estudio siguiendo las recomendaciones indicadas.

Los beneficios y garantías que puedan obtenerse:

Cada voluntario recibirá el resultado de su perfil nutricional, de acuerdo con los análisis bioquímicos realizados.

Además, se le garantiza a cada participante que recibirá respuesta a cualquier pregunta y aclaración acerca de los procedimientos.

Se le informarán de los riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de los datos de los voluntarios.

Las investigadoras darán respuesta a cualquier inquietud al inicio, durante y al final del trabajo.

La libertad de retirar su consentimiento:

Lo podrá hacer en cualquier momento, puede abandonar y dejar de participar en el estudio sin que por ello se creen perjuicios. Cada voluntario puede retirarse del estudio cuando lo desee.

La seguridad que no se identificará a los voluntarios:

1. Se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.
2. En todos los casos las muestras estarán codificadas de forma que en ningún momento se pueda conocer la identidad del voluntario.

3. Respecto a las muestras biológicas: las muestras biológicas perecederas serán destruidas al finalizar este estudio, siguiendo la normativa vigente.

4. Se solicita consentimiento del participante para la conservación futura en congelación de las siguientes muestras: Extractos conteniendo ADN-bacteriano procedente de heces y extractos de ADN procedente de la saliva, para posibles futuros estudios.

La normativa que regula el tratamiento de datos/muestras de personas, le otorga al participante el derecho a acceder a éstos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la supresión de estos. Para ejercer estos derechos puede el participante dirigirse al Investigador Principal de este estudio en el correo electrónico: mncalderono@unal.edu.co

La disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización:

La presente investigación no acarrea riesgos para la salud de los participantes, ni da lugar a daños que puedan causar demandas civiles o penales.

Gastos:

En ningún momento se solicitará dinero a los voluntarios.

Todos los gastos serán cubiertos por el presupuesto de la investigación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Obesidad y Diabetes en Iberoamérica: factores de riesgo y nuevos biomarcadores patogénicos y predictivos.

Yo, _____, he leído la información suministrada para los participante del estudio, pude conversar con el equipo investigador y realizar todas las preguntas necesarias para comprender las condiciones en este estudio y considero que recibí suficiente información.

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio en cualquier

momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto afecte a mi integridad.

De forma **VOLUNTARIA** participo en el estudio y acepto el uso de mis datos/muestras en las condiciones indicadas

Respecto a la conservación y utilización futura de los datos y/o muestras, accedo a que mis datos y/o muestras sean conservados una vez finalizado el presente estudio.

Tomo la decisión de que mis datos y/o muestras sean Si____ o No___ conservados para usos posteriores en líneas de investigación relacionadas con la presente bajo las condiciones de codificación mencionadas.

PARTICIPANTE

Firma: _____

Nombre: _____

Identificación: _____

Correo Electrónico: _____

Número de contacto: _____

Fecha de nacimiento: _____

TESTIGO

Firma: _____

Nombre: _____

Identificación: _____

Correo Electrónico: _____

Número de contacto: _____

6.4 Anexo C. Cuestionario FINDRISC

ESCALA FINDRISC

Edad		IMC (Kg/m ²)	
Menos de 45 años	0 puntos	Menos de 25 Kg/m ²	0 puntos
Entre 45 -54 años	2 puntos	Entre 25-30 Kg/m ²	1 punto
Entre 55- 64 años	3 puntos	Mas de 30 Kg/m ²	3 punto
Mas de 64 años	4 puntos		

Perímetro abdominal (medido a nivel de ombligo)

Hombres	Mujeres	Puntuación
Menos de 94 cm	Menor de 80 cm	0 puntos
Entre 94- 102 cm	Entre 80-88 cm	3 puntos
Mas de 102 cm	Mas de 88 cm	4 puntos

¿realiza normalmente al menos 30 minutos diarios de actividad física?

Si	0 puntos
No	2 puntos

¿con que frecuencia come fruta, verduras y hortalizas?

A diario	0 puntos
No a diario	1 punto

¿le han recetado alguna vez medicamento contra la HTA?

Si	2 puntos
No	0 puntos

¿le han detectado alguna vez niveles alto de glucosa en sangre?

Si	5 puntos
No	0 puntos

¿ha habido algún diagnóstico de DM en su familia?

No	0 puntos
Si: abuelos, tíos, primos hermanos (pero no padres, hermanos o hijos)	3 puntos
Si: padres, hermanos o hijos	5 puntos



Puntuación total	Riesgo de desarrollar diabetes en los próximos 10 años	Interpretación
Menor de 7 puntos	1 %	Nivel de riesgo bajo
De 7 a 11 puntos	4%	Nivel de riesgo ligeramente elevado
De 12 a 14 puntos	17%	Nivel de riesgo moderado
De 15 a 20 puntos	33%	Nivel de riesgo alto
Mas de 20 puntos	50%	Nivel de riesgo muy alto

6.5 Anexo D. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

CÓDIGO ENCUESTADO: _____

Día Mes Año

¿Con que frecuencia come los siguientes alimentos en el último año?									
Alimento o preparación	1 2 o + veces al día	2 1 vez al día	3 2 o 3 veces por semana	4 4 o 5 veces por semana	5 1 vez por semana	6 1 a 3 veces por mes	7 5 a 10 veces por año	8 1 a 4 veces por año	9 Nunca
Grupo 2. COMIDAS FRITAS									
Empanadas de carne	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fritas de trigo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carne frita	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Salchichas fritas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pollo frito	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Papa francesa	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Papa rellena	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Yuca frita	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo 3. HUEVOS									
Huevos (pericos/ cocidos/ fritos/ con salchicha)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo 4. GRANOS ENTEROS									

2. Tamal de carne / pollo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peto / Sopa de avena	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Envuelto de mazorca	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo 5. GRANOS MOLIDOS, REFINADOS Y TUBÉRCULOS									
3. Lasaña	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cornflakes (solos)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Leche con cereal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Calentado	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Espagueti con (carne / pollo / guiso)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Galletas de harina	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4. Arroz blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5. Arroz con atún	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Arroz con pollo o camarones	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Arroz con verduras	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pizza	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pan dulce	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Galletas waffer	1	2	3	4	5	6	7	8	9

¿Con que frecuencia come los siguientes alimentos en el último año?

Grupo 5. GRANOS MOLIDOS, REFINADOS Y TUBÉRCULOS									
6. Arepa con queso	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ensalada rusa	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Papa (salada / criolla)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caldo con papa y leche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puré de papa	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sopas Cremas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo 6. PRODUCTOS LÁCTEOS									
Leche entera / Yogurt	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Café con leche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Milo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Queso semiblando, de leche entera	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo 7. SALSAS									
Ají	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo 8. POSTRES, DULCES									
7. Chocolate en agua	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Chocolate en leche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gaseosas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tinto	1	2	3	4	5	6	7	8	9

6.6 Anexo E. Base de datos de voluntarios seleccionados para el estudio de microbiota intestinal

EDAD	GENERO	FINDRISC	IMC	GLUCOMETRIA	GLUCOSA	PTOG	COLESTEROL	TRIGLICERIOS	VOLUNTARIOS
63	Femenino	10	22,2	95	87		184	71	NP2
57	Femenino	15	23,5	84	97		217	79	NP4
52	Masculino	7	22,7	92	70		151	100	NP6
72	Femenino	15	24,7	94	97		237	189	NP7
56	femenino	13	23,8	82	74	87	163	70	NP8
42	masculino	7	24	98	75		195	102	NP9
65	masculino	13	22,3	99	106	64	229	162	NP PRE1
67	femenino	15	23,8	92	125	100	216	141	NP PRE2
68	masculino	17	22,9	94	108	141	188	103	NP PRE3
63	femenino	18	24,8	107	122	197	212	189	NP PRE5
52	femenino	14	23,8	100	114	76	151	70	NP PRE6
70	femenino	17	23,8	96	100	179	192	133	NP PRE7
59	femenino	9	25,4	83	78		127	120	SP1
57	femenino	20	26,2	83	86	95	216	81	SP1
64	femenino	16	28,6	97	94		147	119	SP3
43	masculino	8	26,6	105	83		135	114	SP4
40	femenino	13	27,9	91	82		105	110	SP5
65	femenino	15	26,1	96	111	107	143	184	SP PRE1
58	femenino	15	26	95	117		200	184	SP PRE2
56	femenino	14	25,4	91	111		273	146	SP PRE4
59	masculino	13	27,7	93	111		200	124	SP PRE5
49	masculino	7	26,7	93	103		233	108	SP PRE6
59	femenino	18	25,7	91	103		254	133	SP PRE8
56	femenino	18	33,7	103	82	111	137	90	OB10
55	femenino	13	29,4	90	86		192	103	OB12

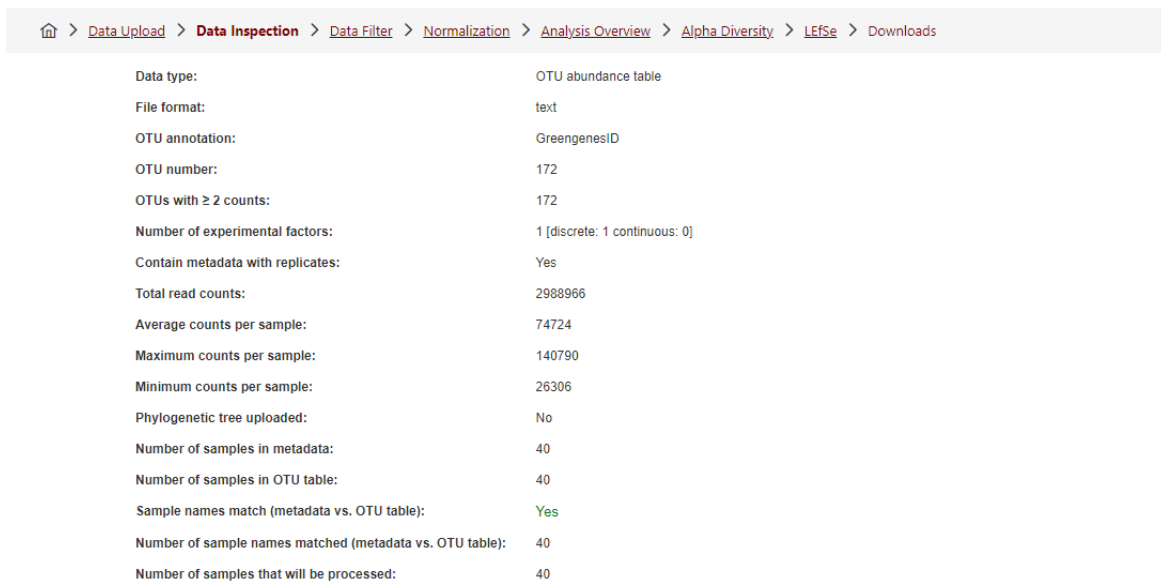
40	femenino	12	30,7	91	92		167	103	OB14
51	femenino	18	32,9	93	81	86	230	177	OB15
66	femenino	23	30,1	91	75	75	163	67	OB16
68	femenino	19	31,4	96	97	132	146	218	OB18
64	femenino	20	34,7	100	100	172	196	65	OB PRE12
60	femenino	13	31,2	80	103		224	168	OB PRE14
64	masculino	17	30,7	101	111	153	229	170	OB PRE15
60	masculino	19	29	114	111		149	160	OB PRE20
63	femenino	18	37	102	106	161	233	108	OB PRE5
63	femenino	12	31,9	90	117		249	141	OB PRE9
42	femenino	10	29,7	133	124		184	200	OB PRE23
54	femenino	17	34,2	117	118	207	143	162	OBDM1
51	femenino	17	32,9	105	142		143	85	OBDM2
70	masculino	18	33,8	99	89	275	167	171	OBDM3
60	masculino	22	44,4	145	142		171	205	OBDM4

CT LDL	CT HDL	CT VLDL	%GRASA	GRASA VISCERAL	% MUSCULO	P. CINTURA	CRITERIO
107	63	14	32	6	26,2	76	Np (NGlu)
44	44	33	37	7	24,3	86,5	Np (NGlu)
87	44	20	21,3	8	21,3	74	Np (NGlu)
156	43	37,8	39,3	10	24	98	Np (NGlu)
101	47	27,8	30,7	6	30	83	Np (NGlu)
137	37	20,5	20,8	8	37,7	90	Np (NGlu)
167	29	32	18,9	6	35,1		NP (Pre DM2)
140	49	28	37,1	8	24,8	83	NP (Pre DM2)
120	47	21	20,1	8	34,4	88	NP (Pre DM2)
130	44	38	37	8	26,1	90,5	NP (Pre DM2)
61	76	14	37,3	6	25,5	75	NP (Pre DM2)
139	27	26,6	37,8	8	23,9	86	NP (Pre DM2)
67	36	24	39,7	7	25	76	SP (NGlu)
143	57	16	37,2	8	27	89	SP (NGlu)
75	49	24	46	11	21,7	103	SP (NGlu)
72	40	22,7	22,1	10	37,3	88	SP (NGlu)
38,3	45	21,9	44,5	8	22,6	98	SP (NGlu)
46	60	37	40,1	9	24,8	92	SP (Pre DM2)
116	47	37	35,1	8	28,3	84	SP (Pre DM2)
197	47	29	39,2	8	25	90	SP (Pre DM2)
135	40	25	26,6	13	32,2	103	SP (Pre DM2)
158	53	22	27,7	11	33,3	93	SP (Pre DM2)
163	64	26	41,8	9	22,2	97	SP (Pre DM2)
72	47	18	51	12	20,7	102,5	OB (NGlu)
89	82	20,5	47,7	10	20,8	100	OB (NGlu)
104	43	20,5	42,2	8	25,8	98	OB (NGlu)
161	34	35	45,1	11	24,4	102	OB (NGlu)
87	63	13	39,1	11	27,2	101	OB (NGlu)
51	51	43,6	45,9	13	23,2	105	OB (NGlu)
114	69	13	51	13	21	116	OB (Pre DM2)
152	39	33,5	46,1	11	23,3	108	OB (Pre DM2)
148	47	34	30,3	17	30,8	106	OB (Pre DM2)
86	31	32	29,8	15	31,5	100	OB (Pre DM2)
169	42	21	43	26	23	115	OB (Pre DM2)
172	49	28	47,8	12	22,3	100	OB (Pre DM2)
101	43	40	47,1	9	21,9	94	OB (Pre DM2)

77,6	33	32,4	47,1	12	23,5	108	OB (DM2)
87	39	17	45,9	11	24	103,5	OB (DM2)
107	25	34	28,9	20	31,1	103	OB (DM2)
91	39	41	41,4	30	25,2	144	OB (DM2)

6.7 Anexo F. Tamaño de la librería e identificación de biomarcadores microbianos mediante el software MicrobiomeAnalyst

Descripción de los datos obtenidos mediante el análisis bioinformático. Se observa el tamaño de las librerías.












The screenshot shows the 'Data Inspection' page in MicrobiomeAnalyst. The breadcrumb navigation at the top reads: Home > Data Upload > Data Inspection > Data Filter > Normalization > Analysis Overview > Alpha Diversity > LefSe > Downloads. The main content is a table of data inspection metrics.

Data type:	OTU abundance table
File format:	text
OTU annotation:	GreengenesID
OTU number:	172
OTUs with ≥ 2 counts:	172
Number of experimental factors:	1 [discrete: 1 continuous: 0]
Contain metadata with replicates:	Yes
Total read counts:	2988966
Average counts per sample:	74724
Maximum counts per sample:	140790
Minimum counts per sample:	26306
Phylogenetic tree uploaded:	No
Number of samples in metadata:	40
Number of samples in OTU table:	40
Sample names match (metadata vs. OTU table):	Yes
Number of sample names matched (metadata vs. OTU table):	40
Number of samples that will be processed:	40

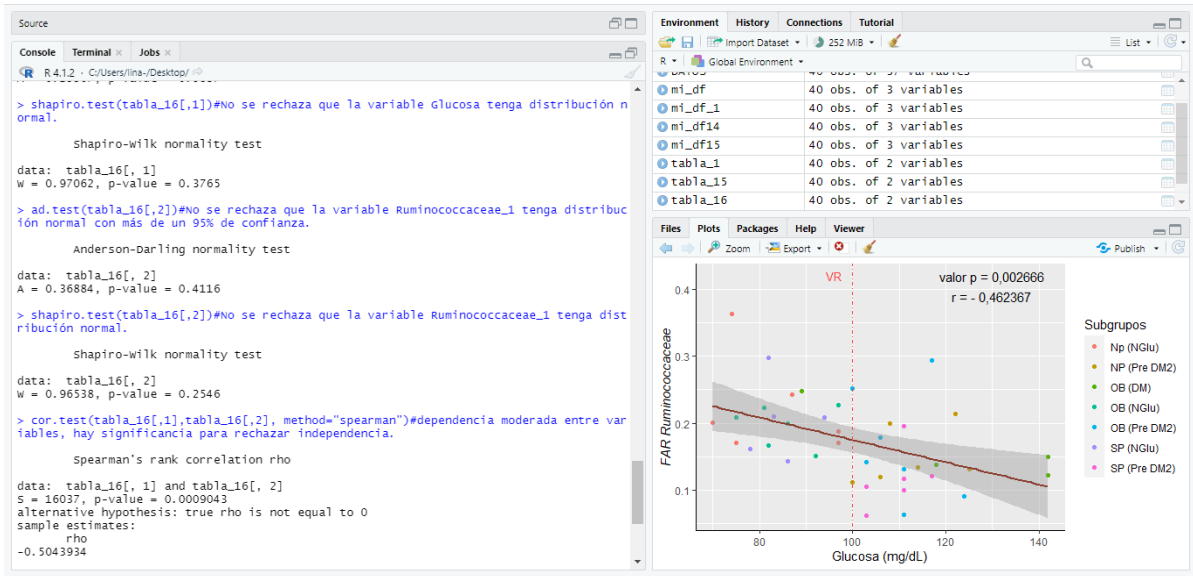
Tabla descriptiva del análisis LefSe en el Software MicrobiomeAnalyst

[Home](#) > [Data Upload](#) > [Data Inspection](#) > [Data Filter](#) > [Normalization](#) > [Analysis Overview](#) > [Alpha Diversity](#) > **LefSe** > [Downloads](#)

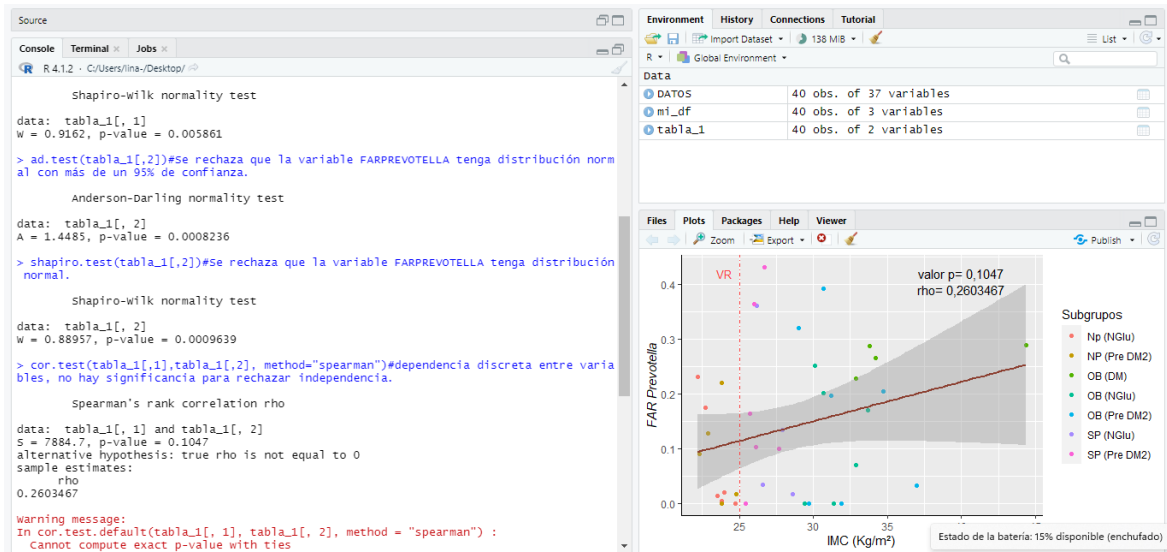
The table below shows at most 500 features ranked by their p values, with significant features highlighted in orange.

Name ↑↓	Pvalues ↑↓	FDR ↑↓	NP ↑↓	NPPRE ↑↓	SP ↑↓	SPPRE ↑↓	OB ↑↓	OBPRE ↑↓	View
Butyricimonas	0.0053943	0.48009	44997.0	45473.0	15336.0	19714.0	19641.0	4.3	
Christensenellace	0.032082	0.58156	190630.0	103790.0	27976.0	17321.0	34656.0	4.94	
Streptococcus	0.040446	0.58156	2447.1	1035.3	52467.0	36812.0	4640.1	4.41	
Parabacteroides_	0.042296	0.58156	176080.0	143280.0	233860.0	73436.0	32935.0	5.0	
ML615J_28	0.055591	0.58156	34081.0	88427.0	1329.4	22236.0	26013.0	4.65	
Ruminococcacea	0.055782	0.58156	1590300.0	912960.0	1223000.0	599230.0	1010200.0	5.7	
Bacteroides_cacc	0.060918	0.58156	205320.0	169350.0	191360.0	66745.0	48489.0	4.98	
Peptococcus	0.065383	0.58156	78.833	577.11	0.0	1552.2	399.35	2.89	
Phascolarctobact	0.068978	0.58156	168460.0	103200.0	4173.6	11707.0	68253.0	4.91	

6.8 Anexo G. Análisis de correlación entre los perfiles bacterianos y parámetros clínicos mediante el Software R



Análisis de la distribución de las variables y aplicación del coeficiente de correación de Spearman y Pearson



Bibliografía

- [1] M. E. Icaza-Chávez, "Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad," *Rev. Gastroenterol. México*, vol. 78, no. 4, pp. 240–248, 2013.
- [2] B. A. Methé *et al.*, "A framework for human microbiome research," *Nature*, vol. 486, no. 7402, pp. 215–221, 2012.
- [3] C. Huttenhower *et al.*, "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome," *Nature*, vol. 486, no. 7402, pp. 207–214, 2012.
- [4] J. Qin *et al.*, "Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing," *Nature*, vol. 464, no. 7285, pp. 59–65, 2010.
- [5] V. Lazar, L. Ditu, G. G. Pircalabioru, and A. Picu, "Gut Microbiota , Host Organism , and Diet Trialogue in Diabetes and Obesity," vol. 6, no. March, 2019.
- [6] E. Z. Gomaa, "Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review," *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 113, no. 12, pp. 2019–2040, 2020.
- [7] J. K. Nicholson *et al.*, "Host-gut microbiota metabolic interactions," *Science (80-.)*, vol. 336, no. 6086, pp. 1262–1267, 2012.
- [8] D. Rothschild *et al.*, "Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota," *Nature*, vol. 555, no. 7695, pp. 210–215, 2018.
- [9] N. C. Wiley, T. G. Dinan, R. P. Ross, C. Stanton, G. Clarke, and J. F. Cryan, "The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: Implications for human and animal health," *J. Anim. Sci.*, vol. 95, no. 7, pp. 3225–3246, 2017.
- [10] P. Zheng *et al.*, "Erratum: The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice (Science Advances DOI: 10.1126/sciadv.aau8317)," *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 6, pp. 1–11, 2019.
- [11] G. Tomasello *et al.*, "Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases," *Biomed. Pap.*, vol. 160, no. 4, pp. 461–466, 2016.

- [12] G. Musso, R. Gambino, and M. Cassader, "Interactions Between Gut Microbiota and Host Metabolism Predisposing to Obesity and Diabetes," *Annu. Rev. Med.*, vol. 62, no. 1, pp. 361–380, 2011.
- [13] S. J. Hong, H. J. Kim, and S. H. Lee, "Antibiotics-induced dysbiosis of intestinal microbiota aggravates atopic dermatitis in mice by altered short-chain fatty acids," *Allergy, Asthma Immunol. Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 137–148, 2020.
- [14] M. K. Salgaço, L. G. S. Oliveira, G. N. Costa, F. Bianchi, and K. Sivieri, "Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, no. Who 2016, 2019.
- [15] OMS, "WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation," 2010.
- [16] M. de S. y P. S. C. MSPS, "Encuesta Nacional de la Situación Nutricional-ENSIN 2015.," 2015.
- [17] Q. Zeng *et al.*, "Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2019.
- [18] Y. Wu, Y. Ding, Y. Tanaka, and W. Zhang, "Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 11, no. 11, pp. 1185–1200, 2014.
- [19] E. Cipriani-Thorne and A. Quintanilla, "Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina," *Rev. Médica Hered.*, vol. 21, no. 3, pp. 160–170, 2011.
- [20] I. D. Federation, "IDF DIABETES ATLAS 10TH edition," 2021.
- [21] S. Sangiovanni, J. Aguilar, and H. Asencio-santofimio, "Epidemiología de diabetes mellitus tipo 2 en la población colombiana y factores de riesgo que predisponen a la amputación de miembros inferiores. Revisión de la literatura," *Salut. Sci. Spiritus*, vol. 4, no. 1, pp. 49–56, 2018.
- [22] G. Manuel Moreno, "Definición y clasificación de la obesidad," *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 23, no. 2, pp. 124–128, 2012.
- [23] M. Laakso, "Biomarkers for type 2 diabetes," *Mol. Metab.*, vol. 27, pp. S139–S146, 2019.
- [24] C. J. Lee, C. L. Sears, and N. Maruthur, "Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, pp. 1–16, 2019.
- [25] A. Adeshirlarijaney and A. T. Gewirtz, "Considering gut microbiota in treatment of type 2 diabetes mellitus," *Gut Microbes*, vol. 11, no. 3, pp. 253–264, 2020.
- [26] G. Clarke, K. V. Sandhu, B. T. Griffin, T. G. Dinan, J. F. Cryan, and N. P. Hyland,

- “Gut reactions: Breaking down xenobiotic–microbiome interactions,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 71, no. 2, pp. 198–224, 2019.
- [27] Y. Wang, Y. Zhou, X. Xiao, J. Zheng, and H. Zhou, “Metaproteomics: A strategy to study the taxonomy and functionality of the gut microbiota,” *J. Proteomics*, vol. 219, no. March, p. 103737, 2020.
- [28] J. de la Cuesta-Zuluaga, V. Corrales-Agudelo, E. P. Velásquez-Mejía, J. A. Carmona, J. M. Abad, and J. S. Escobar, “Gut microbiota is associated with obesity and cardiometabolic disease in a population in the midst of Westernization,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018.
- [29] V. De Preter and K. Verbeke, “Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology,” *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, vol. 4, no. 4, p. 97, 2013.
- [30] I. Sekirov, S. L. Russell, L. Caetano M Antunes, and B. B. Finlay, “Gut microbiota in health and disease,” *Physiol. Rev.*, vol. 90, no. 3, pp. 859–904, 2010.
- [31] S. Moossavi, M. C. Arrieta, A. Sanati-Nezhad, and F. Bishehsari, “Gut-on-chip for ecological and causal human gut microbiome research,” *Trends Microbiol.*, pp. 1–12, 2022.
- [32] J. Álvarez *et al.*, “Gut microbes and health,” *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 44, no. 7, pp. 519–535, 2021.
- [33] B. Tunngland, *Gut Microbiota, Early Colonization and Factors in its Development that Influence Health*. 2018.
- [34] B. Christian Milani, Sabrina Duranti, Francesca Bottacini *et al.*, “The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 81, no. 4, pp. 1–67, 2017.
- [35] B. Verdu, E. F., Galipeau, H. J., & Jabri, “Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 9, pp. 497–506, 2015.
- [36] M. Breban, “Gut microbiota and inflammatory joint diseases,” *Jt. Bone Spine*, vol. 83, no. 6, pp. 645–649, 2016.
- [37] B. Dam, A. Misra, and S. Banerjee, *Role of gut microbiota in combating oxidative stress*. 2019.
- [38] C. Binda, L. R. Lopetuso, G. Rizzatti, G. Gibiino, V. Cennamo, and A. Gasbarrini, “Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 50, no. 5, pp. 421–428, 2018.
- [39] A. M. O’Hara and F. Shanahan, “The gut flora as a forgotten organ,” *EMBO Rep.*,

- vol. 7, no. 7, pp. 688–693, 2006.
- [40] M. G. Duque and F. Acero, “Composición Y Funciones De La Flora Bacteriana Intestinal,” *Repert. Med. Y Cir.*, vol. 20, no. 2, pp. 74–82, 2011.
- [41] R. D. Hills, B. A. Pontefract, H. R. Mishcon, C. A. Black, S. C. Sutton, and C. R. Theberge, “Gut microbiome: Profound implications for diet and disease,” *Nutrients*, vol. 11, no. 7, pp. 1–40, 2019.
- [42] C. García-Montero *et al.*, “Nutritional components in western diet versus mediterranean diet at the gut microbiota-immune system interplay. implications for health and disease,” *Nutrients*, vol. 13, no. 2, pp. 1–53, 2021.
- [43] E. Rinninella *et al.*, “Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition,” *Nutrients*, vol. 11, no. 10, pp. 1–23, 2019.
- [44] Y. A. Debnath N, Kumar R, Kumar A, Mehta PK, “Gut-microbiota derived bioactive metabolites and their functions in host physiology.,” *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2021.
- [45] A. Adak and M. R. Khan, “An insight into gut microbiota and its functionalities,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 3, pp. 473–493, 2019.
- [46] D. R. Donohoe *et al.*, “Microbiome, The Regulate, Butyrate Metabolism, Energy,” *Cell Metab.*, vol. 13, no. 5, pp. 517–526, 2011.
- [47] D. J. Morrison and T. Preston, “Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism,” *Gut Microbes*, vol. 7, no. 3, pp. 189–200, 2016.
- [48] J. G. LeBlanc, C. Milani, G. S. de Giori, F. Sesma, D. van Sinderen, and M. Ventura, “Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 2, pp. 160–168, 2013.
- [49] C. Castañeda, “Microbiota intestinal y salud infantil Intestinal microbiota and child health,” *Rev. Cubana Pediatr.*, vol. 90, no. 1, pp. 94–110, 2018.
- [50] A. T. Soderholm and V. A. Pedicord, “Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity,” *Immunology*, vol. 158, no. 4, pp. 267–280, 2019.
- [51] V. F. Del Coco, “Microorganisms conferring beneficial health effects,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 47, no. 3, pp. 171–173, 2015.
- [52] P. P. Ahern and K. J. Maloy, “REVIEW SERIES: INTERACTIONS OF THE MICROBIOTA WITH THE MUCOSAL IMMUNE SYSTEM Understanding immune – microbiota interactions in the intestine,” *Inmunology*, pp. 1–11, 2019.
- [53] C. Gutiérrez-Rodelo, A. Roura-Guiberna, and J. A. Olivares-Reyes, “Mecanismos

- moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización," *Gac. Med. Mex.*, vol. 153, no. 2, pp. 214–228, 2017.
- [54] A. E. Brown and M. Walker, "Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome," *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 18, no. 8, 2016.
- [55] N. Rachdaoui, "Insulin: The friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, pp. 1–21, 2020.
- [56] A. D. Association/ADA, "Standards of medical care in diabetes—2015 abridged for primary care providers," *Clin. Diabetes*, vol. 33, no. 2, pp. 97–111, 2015.
- [57] P. López-Jaramillo, C. Calderón, J. Castillo, I. D. Escobar, E. Melgarejo, and G. A. Parra, "Prediabetes in Colombia: Expert Consensus," *Colomb. Med.*, vol. 48, no. 4, pp. 191–203, 2017.
- [58] A. J. Garber *et al.*, "Consensus Statement By the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm - 2017 Executive Summary," *Endocr. Pract.*, vol. 23, no. 2, pp. 207–238, 2017.
- [59] J. Lindström and J. Tuomilehto, "The Diabetes Risk Score," *Diabetes Care*, vol. 26, no. 3, pp. 725–731, 2003.
- [60] MSPS, "Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la diabetes mellitus tipo 2 en la población mayor de 18 años.," 2015.
- [61] L. Marseglia *et al.*, "Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 378–400, 2015.
- [62] B. Caballero, "Humans against Obesity: Who Will Win?," *Adv. Nutr.*, vol. 10, pp. S4–S9, 2019.
- [63] F. X. Pi-Sunyer, "The obesity epidemic: Pathophysiology and consequences of obesity," *Obes. Res.*, vol. 10, no. SUPPL. 2, 2002.
- [64] F. Bäckhed *et al.*, "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 44, pp. 15718–15723, 2004.
- [65] S. F. Clarke *et al.*, "The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights," *Gut Microbes*, vol. 3, no. 3, pp. 1–17, 2012.
- [66] R. Fernández, "Modulación de la microbiota intestinal : efecto de los prebióticos y probióticos en la prevención y tratamiento del Síndrome metabólico," 2013. [Online]. Available:
<https://pdfs.semanticscholar.org/22c6/aaec4234fccd42a4bf3b840ef5f1bdafbf55.pdf>

- [67] H. M. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, “Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant?le,” *Biochimie*, 2016.
- [68] T. L. N. Cândido, J. Bressan, and R. de C. G. Alfenas, “Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet,” *Nutr. Hosp.*, vol. 35, no. 6, pp. 1432–1440, 2018.
- [69] S. Croci, L. I. D’apolito, V. Gasperi, M. V. Catani, and I. Savini, “Dietary strategies for management of metabolic syndrome: Role of gut microbiota metabolites,” *Nutrients*, vol. 13, no. 5, 2021.
- [70] L. J. Sun, J. N. Li, and Y. Z. Nie, “Gut hormones in microbiota-gut-brain cross-talk,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 133, no. 7, pp. 826–833, 2020.
- [71] T. D. Müller *et al.*, “Glucagon-like peptide 1 (GLP-1),” *Mol. Metab.*, vol. 30, no. September, pp. 72–130, 2019.
- [72] G. Yang *et al.*, “Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases,” *Metabolism*, vol. 117, p. 154712, 2021.
- [73] P. Stahel, C. Xiao, X. Davis, P. Tso, and G. F. Lewis, “Glucose and GLP-2 (Glucagon-Like Peptide-2) Mobilize Intestinal Triglyceride by Distinct Mechanisms,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 39, no. 8, pp. 1565–1573, 2019.
- [74] Y. Yu, F. Raka, and K. Adeli, “The role of the gut microbiota in lipid and lipoprotein metabolism,” *J. Clin. Med.*, vol. 8, no. 12, 2019.
- [75] S. Arango, “Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana.,” *Fax. Nac Salud Pública*, vol. 30, no. 1, pp. 75–82, 2012.
- [76] A. Ahmad *et al.*, “Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals,” *PLoS One*, vol. 14, no. 12, pp. 1–15, 2019.
- [77] C. O. Iatcu, A. Steen, and M. Covasa, “Gut microbiota and complications of type-2 diabetes,” *Nutrients*, vol. 14, no. 1, 2022.
- [78] M. Yassour *et al.*, “Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes,” *Genome Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2016.
- [79] F. H. Karlsson *et al.*, “Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control,” *Nature*, vol. 498, no. 7452, pp. 99–103, 2013.
- [80] E. Le Chatelier *et al.*, “Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers,” *Nature*, vol. 500, no. 7464, pp. 541–546, 2013.
- [81] H. Wu *et al.*, “The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study,” *Cell Metab.*, vol. 32, no. 3, pp. 379-390.e3, 2020.
- [82] R. B. Radilla-Vázquez, I. Parra-Rojas, N. E. Martínez-Hernández, Y. F. Márquez-

- Sandoval, B. Illades-Aguilar, and N. Castro-Alarcón, "Gut microbiota and metabolic endotoxemia in young obese mexican subjects," *Obes. Facts*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [83] A. N. Sarangi, A. Goel, and R. Aggarwal, "Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians," *J. Clin. Exp. Hepatol.*, vol. 9, no. 1, pp. 62–73, 2019.
- [84] M. H. Fraher, P. W. O'Toole, and E. M. M. Quigley, "Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 9, no. 6, pp. 312–322, 2012.
- [85] E. B. M. Daliri, F. K. Ofosu, R. Chelliah, B. H. Lee, and D. H. Oh, "Challenges and perspective in integrated multi-omics in gut microbiota studies," *Biomolecules*, vol. 11, no. 2, pp. 1–10, 2021.
- [86] J. E. Clarridge, "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 17, no. 4, pp. 840–862, 2004.
- [87] T. Hu, N. Chitnis, D. Monos, and A. Dinh, "Next-generation sequencing technologies: An overview," *Hum. Immunol.*, vol. 82, no. 11, pp. 801–811, 2021.
- [88] E. R. Mardis, "Next-generation sequencing platforms," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 6, no. March, pp. 287–303, 2013.
- [89] S. Rubio, R. A. Pacheco-Orozco, A. M. Gómez, S. Perdomo, and R. García-Robles, "Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica," *Univ. Médica*, vol. 61, no. 2, 2020.
- [90] S. J. Salipante *et al.*, "Performance comparison of Illumina and Ion Torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 24, pp. 7583–7591, 2014.
- [91] L. Liu *et al.*, "Comparison of next-generation sequencing systems," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, 2012.
- [92] L. E. Bautista, O. F. Herrán, and J. A. Pryer, "Development and simulated validation of a food-frequency questionnaire for the Colombian population," *Public Health Nutr.*, vol. 8, no. 2, pp. 181–188, 2005.
- [93] Friedewald, "Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [94] L. Technology, "16S rRNA Sequencing; An integrated research solution for bacterial identification using 16S rRNA sequencing on the Ion PGM System with Ion Reporter

- Software; application note.," 2014.
- [95] E. Bolyen *et al.*, "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2," *Nat. Biotechnol.*, vol. 37, no. 8, pp. 852–857, 2019.
- [96] D. Peña, *Daniel Peña Fundamentos de Estadística Alianza Editorial*. 2014.
- [97] Ministerio de Salud y Protección Social-Colciencias, *Guía de práctica clínica: Hipertensión arterial primaria (HTA)*, vol. 18, no. 18. 2013.
- [98] Y. Lu *et al.*, "Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: A pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1·8 million participants," *Lancet*, vol. 383, no. 9921, pp. 970–983, 2014.
- [99] Y. Gil-Rojas *et al.*, "Burden of Disease Attributable to Obesity and Overweight in Colombia," *Value Heal. Reg. Issues*, vol. 20, no. 40, pp. 66–72, 2019.
- [100] O. F. Herrán, E. M. Gamboa-Delgado, and M. D. P. Zea, "Energy and protein intake in the Colombian population: results of the 2015 ENSIN population survey," *J. Nutr. Sci.*, pp. 1–10, 2021.
- [101] G. Seravalle and G. Grassi, "Obesity and hypertension," *Pharmacol. Res.*, vol. 122, pp. 1–7, 2017.
- [102] G. A. Bonneau, W. R. Pedrozo, and G. Berg, "Adiponectin and waist circumference as predictors of insulin-resistance in women," *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, vol. 8, no. 1, pp. 3–7, 2014.
- [103] J. A. Gallo Villegas, J. E. Ochoa Múnera, J. K. Balparda Arias, and D. Aristizábal Ocampo, "Puntos de corte del perímetro de la cintura para identificar sujetos con resistencia a la insulina en una población colombiana," *Acta Médica Colomb.*, vol. 38, no. 3, pp. 118–126, 2013.
- [104] R. Buendía, M. Zambrano, Á. Díaz, A. Reino, J. Ramírez, and E. Espinosa, "Puntos de corte de perímetro de cintura para el diagnóstico de obesidad abdominal en población colombiana usando bioimpedanciometría como estándar de referencia," *Rev. Colomb. Cardiol.*, vol. 23, no. 1, pp. 19–25, 2014.
- [105] M. Stepień *et al.*, "Waist circumference, ghrelin and selected adipose tissue-derived adipokines as predictors of insulin resistance in obese patients: Preliminary results," *Med. Sci. Monit.*, vol. 17, no. 11, pp. 13–18, 2011.
- [106] S. H. Kim and F. Abbasi, "Myths about insulin resistance: Tribute to Gerald Reaven," *Endocrinol. Metab.*, vol. 34, no. 1, pp. 47–52, 2019.
- [107] A. M. Nevill, M. J. Duncan, and T. Myers, "BMI is dead; long live waist-circumference indices: But which index should we choose to predict cardio-metabolic risk?," *Nutr.*

- Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2022.
- [108] M. A. Bredella, "Sex Differences in Body Composition. In: Mauvais-Jarvis F. (eds) Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1043, pp. 9–27, 2017.
- [109] M. C. Amato *et al.*, "Visceral adiposity index: A reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 4, pp. 920–922, 2010.
- [110] N. Sukkriang, W. Chanprasertpinyo, A. Wattanapisit, C. Punsawad, N. Thamrongrat, and S. Sangpoom, "Correlation of body visceral fat rating with serum lipid profile and fasting blood sugar in obese adults using a noninvasive machine," *Heliyon*, vol. 7, no. 2, p. e06264, 2021.
- [111] D. Gallagher, S. B. Heymsfield, M. Heo, S. A. Jebb, P. R. Murgatroyd, and Y. Sakamoto, "Healthy percentage body fat ranges: An approach for developing guidelines based on body mass index," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, no. 3, pp. 694–701, 2000.
- [112] A. . Polyzos, S.A., Margioris, "Sarcopenic Obesity," vol. 7, no. 2, pp. 321–331, 2018.
- [113] G. Unger, S. F. Benozzi, F. Perruzza, and G. L. Pennacchiotti, "Índice triglicéridos y glucosa: Un indicador útil de insulinoresistencia," *Endocrinol. y Nutr.*, vol. 61, no. 10, pp. 533–540, 2014.
- [114] K. Rygiel, "Hypertriglyceridemia - common causes, prevention and treatment strategies On the crossroads of high TG and CV risk - a safe passage for our patients," *Curr. Cardiol. Rev.*, vol. 14, pp. 67–76, 2018.
- [115] D. S. Schade, L. Shey, and R. P. Eaton, "Cholesterol review: A metabolically important molecule," *Endocr. Pract.*, vol. 26, no. 12, pp. 1514–1523, 2020.
- [116] K. Gondres Legró, J. Calà Fernández, A. Salabert Revilla, Y. Paez Candelaria, and P. Alexei Bacardi Zapata, "Valores de LDL-colesterol en una población adulta de referencia," *Panor. Cuba y Salud*, vol. 10, no. 1, pp. 18–23, 2015.
- [117] Ministerio de salud y proteccion social, "Guía de práctica clínica para la prevención y seguimiento de dislipidemias en población mayor de 18 años," *Inst. evaluaciones Technol. en salud*, no. 27, 2014.
- [118] P. A. Camacho *et al.*, "The spectrum of the dyslipidemia in Colombia: The PURE study," *Int. J. Cardiol.*, vol. 284, pp. 111–117, 2019.
- [119] H. E. Palmett-Ríos, "Estudio transversal sobre estilos de vida saludable y su relación con el colesterol HDL en la población adulta," *Rev. Colomb. Cardiol.*, vol. 24, no. 5,

- pp. 523–531, 2017.
- [120] Á. A. López González, Y. I. Rivero Ledo, M. T. Vicente Herrero, M. Gil Llinás, M. Tomás Salvá, and B. Riutord Fe, “Atherogenic indices in workers of different occupational sectors of the Spanish Mediterranean area,” *Clin. e Investig. en Arterioscler.*, vol. 27, no. 3, pp. 118–128, 2015.
- [121] S. Francula-Zaninovic and I. A. Nola, “Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease’ Risk Factors,” *Curr. Cardiol. Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 153–163, 2018.
- [122] A. Poznyak, A. V. Grechko, P. Poggio, V. A. Myasoedova, V. Alfieri, and A. N. Orekhov, “The diabetes mellitus–atherosclerosis connection: The role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, pp. 1–13, 2020.
- [123] K. De la Torre-Cisneros, Z. Acosta-Rodríguez, and V. Aragundi-Intriago, “Utilidad clínica de los índices aterogénicos para valoración de riesgo cardiovascular: un enfoque desde el laboratorio clínico,” *Dominio las Ciencias*, vol. 5, no. 3, p. 57, 2019.
- [124] M. Ashwell, P. Gunn, and S. Gibson, “Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: Systematic review and meta-analysis,” *Obes. Rev.*, vol. 13, no. 3, pp. 275–286, 2012.
- [125] M. M. Corrêa, L. A. Facchini, E. Thumé, E. R. A. de Oliveira, and E. Tomasi, “The ability of waist-to-height ratio to identify health risk,” *Rev. Saude Publica*, vol. 53, pp. 1–12, 2019.
- [126] S. Anoop *et al.*, “The waist-height ratio is a potential anthropometric index of insulin resistance: Observations based on oral glucose tolerance test in lean, normoglycaemic, Asian Indian males from Southern India,” *Clin. Epidemiol. Glob. Heal.*, vol. 11, no. May, p. 100762, 2021.
- [127] R. Gong, G. Luo, M. Wang, L. Ma, S. Sun, and X. Wei, “Associations between TG/HDL ratio and insulin resistance in the US population: a cross-sectional study,” *Endocr. Connect.*, vol. 10, no. 11, pp. 1502–1512, 2021.
- [128] Y. Hernández-Vite, C. I. Elizalde-Barrera, M. G. Flores-Alcántar, G. Vargas-Ayala, and M. L. Loreto-Bernal, “Asociación entre el índice triglicéridos/colesterol HDL y la glucosa alterada en ayuno en pacientes normotensos con obesidad y sobrepeso,” *Med. Interna Mex.*, vol. 31, no. 5, pp. 507–515, 2015.
- [129] J. C. Fernández-Macías, A. C. Ochoa-Martínez, J. A. Varela-Silva, and I. N. Pérez-Maldonado, “Atherogenic Index of Plasma: Novel Predictive Biomarker for

- Cardiovascular Illnesses,” *Arch. Med. Res.*, vol. 50, no. 5, pp. 285–294, 2019.
- [130] A. García Muñoz *et al.*, “Índices Aterogénicos Y Composición Corporal En Cadetes De Una Escuela De Formación Militar Colombiana,” *Sanid. Mil.*, vol. 76, no. 1, pp. 13–18, 2020.
- [131] R. Du *et al.*, “LDL-C/HDL-C ratio associated with carotid intima-media thickness and carotid plaques in male but not female patients with type 2 diabetes,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 511, pp. 215–220, 2020.
- [132] M. Enomoto *et al.*, “LDL-C/HDL-C Ratio Predicts Carotid Intima-Media Thickness Progression Better Than HDL-C or LDL-C Alone,” *J. Lipids*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [133] E. L. Johnson, S. L. Heaver, W. A. Walters, and R. E. Ley, “Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes,” *J. Mol. Med.*, vol. 95, no. 1, 2017.
- [134] G. M. Barlow, A. Yu, and R. Mathur, “Role of the gut microbiome in obesity and diabetes mellitus,” *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 30, no. 6, pp. 787–797, 2015.
- [135] T. E. Sweeney and J. M. Morton, “The human gut microbiome: A review of the effect of obesity and surgically induced weight loss,” *JAMA Surg.*, vol. 148, no. 6, pp. 563–569, 2013.
- [136] A. Koliada *et al.*, “Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population,” *BMC Microbiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 4–9, 2017.
- [137] A. Schwiertz *et al.*, “Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects,” *Obesity*, vol. 18, no. 1, pp. 190–195, 2010.
- [138] S. Tims *et al.*, “Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins,” *ISME J.*, vol. 7, no. 4, pp. 707–717, 2013.
- [139] F. Magne *et al.*, “The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?,” *Nutrients*, vol. 12, no. 5, 2020.
- [140] and G. D. W. Marie A. Hildebrandt, Christian Hoffman, Scott A. Sherrill-Mix, Sue A. Keilbaugh, Micah Hamady, Ying-Yu Chen, Rob Knight, Rexford S. Ahima, Frederic Bushman, “HFD-microbiome/NIH Public Access,” *Gastroenterology*, vol. 137, no. 1, pp. 24.e1-24.e2, 2009.
- [141] C. De Filippo *et al.*, “Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 33, pp. 14691–14696, 2010.
- [142] G. Mora-García, A. Trujillo, and V. García-Larsen, “Diet quality, general health and

- anthropometric outcomes in a Latin American population: Evidence from the Colombian National Nutritional Survey (ENSIN) 2010,” *Public Health Nutr.*, vol. 24, no. 6, pp. 1385–1392, 2021.
- [143] B. Cornwell, E. Villamor, M. Mora-Plazas, C. Marin, C. A. Monteiro, and A. Baylin, “Processed and ultra-processed foods are associated with lower-quality nutrient profiles in children from Colombia,” *Public Health Nutr.*, vol. 21, no. 1, pp. 142–147, 2018.
- [144] G. Rizzatti, L. R. Lopetuso, G. Gibiino, C. Binda, and A. Gasbarrini, “Proteobacteria: A common factor in human diseases,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [145] N. R. Shin, T. W. Whon, and J. W. Bae, “Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota,” *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 496–503, 2015.
- [146] L. Crovesy, D. Masterson, and E. L. Rosado, “Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 74, no. 9, pp. 1251–1262, 2020.
- [147] Y. Litvak, M. X. Byndloss, R. M. Tsohis, and A. J. Bäumlner, “Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 39, pp. 1–6, 2017.
- [148] W. S. Hughes ER, Winter MG, Duerkop BA, Spiga L, Furtado de Carvalho T, Zhu W, Gillis CC, Büttner L, Smoot MP, Behrendt CL, Cherry S, Santos RL, Hooper LV, “Microbial Respiration and Formate Oxidation as Metabolic Signatures of Inflammation-Associated Dysbiosis,” *Cell Host Microbe*, pp. 208–219, 2017.
- [149] M. X. Byndloss *et al.*, “Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion,” *Science (80-.)*, vol. 357, no. 6351, pp. 570–575, 2017.
- [150] Y. Wang *et al.*, “Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli,” *BMC Genomics*, vol. 21, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [151] M. A. K. Azad, M. Sarker, T. Li, and J. Yin, “Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, 2018.
- [152] J. Jalanka *et al.*, “The effect of psyllium husk on intestinal microbiota in constipated patients and healthy controls,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 2, 2019.
- [153] P. Louis and H. J. Flint, “Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 294, no. 1, pp. 1–8, 2009.

- [154] G. M. Silvano, Henrique, *Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach*. 2022.
- [155] Z. Tamanai-Shacoori *et al.*, “Roseburia spp.: A marker of health?,” *Future Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 157–170, 2017.
- [156] M. Gurung *et al.*, “Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology,” *EBioMedicine*, vol. 51, pp. 1–9, 2020.
- [157] A. Tomova *et al.*, “The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota,” *Front. Nutr.*, vol. 6, no. April, 2019.
- [158] M. J. A. Saad, A. Santos, and P. O. Prada, “Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance,” *Physiology*, vol. 31, no. 4, pp. 283–293, 2016.
- [159] H. Yan *et al.*, “Gut Microbiome Alterations in Patients With Visceral Obesity Based on Quantitative Computed Tomography,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 11, no. January, pp. 1–11, 2022.
- [160] S. Verhoog *et al.*, “Dietary factors and modulation of bacteria strains of akkermansia muciniphila and faecalibacterium prausnitzii: A systematic review,” *Nutrients*, vol. 11, no. 7, pp. 1–20, 2019.
- [161] H. E. Leylabadlo *et al.*, “The critical role of Faecalibacterium prausnitzii in human health: An overview,” *Microb. Pathog.*, vol. 149, p. 104344, 2020.
- [162] M. Lopez-Siles, S. H. Duncan, L. J. Garcia-Gil, and M. Martinez-Medina, “Faecalibacterium prausnitzii: From microbiology to diagnostics and prognostics,” *ISME J.*, vol. 11, no. 4, pp. 841–852, 2017.
- [163] L. B. Thingholm *et al.*, “Obese individuals with and without type 2 diabetes show different gut microbial functional capacity and composition,” *Cell Host Microbe*, vol. 26, no. 2, pp. 252–264, 2020.
- [164] M. Arumugam *et al.*, “Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition,” *Nature*, vol. 473, no. 7346, pp. 174–180, 2011.
- [165] G. D. Wu *et al.*, “Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes,” *Science (80-.)*, vol. 334, no. 6052, pp. 105–108, 2011.
- [166] A. Gorvitovskaia, S. P. Holmes, and S. M. Huse, “Interpreting prevotella and bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle,” *Microbiome*, vol. 4, pp. 1–12, 2016.
- [167] P. Kovatcheva-Datchary *et al.*, “Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 6, pp. 971–982, 2015.
- [168] H. Zafar and M. H. Saier, “Gut Bacteroides species in health and disease,” *Gut*

- Microbes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–20, 2021.
- [169] H. M. Wexler, “Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 4, pp. 593–621, 2007.
- [170] R. C. Kaplan *et al.*, “Erratum: Gut microbiome composition in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos is shaped by geographic relocation, environmental factors, and obesity (Genome Biology (2019) 20 (219) DOI: 10.1186/s13059-019-1831-z),” *Genome Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–21, 2020.
- [171] J. De La Cuesta-Zuluaga *et al.*, “Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading *Akkermansia muciniphila* and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the gut,” *Diabetes Care*, vol. 40, no. 1, pp. 54–62, 2017.
- [172] S. Mills, C. Stanton, J. A. Lane, G. J. Smith, and R. P. Ross, “Precision nutrition and the microbiome, part I: Current state of the science,” *Nutrients*, vol. 11, no. 4, pp. 1–45, 2019.
- [173] J. C. Ezeji *et al.*, “*Parabacteroides distasonis*: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health,” *Gut Microbes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–27, 2021.
- [174] K. Wang *et al.*, “*Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids,” *Cell Rep.*, vol. 26, no. 1, pp. 222-235.e5, 2019.
- [175] L. Gallardo-Becerra *et al.*, “Metatranscriptomic analysis to define the Secrebiome, and 16S rRNA profiling of the gut microbiome in obesity and metabolic syndrome of Mexican children,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–18, 2020.
- [176] K. Hiippala, V. Kainulainen, M. Kalliomäki, P. Arkkila, and R. Satokari, “Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp.,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. OCT, pp. 1–13, 2016.
- [177] D. Tecer *et al.*, “*Succinivibrionaceae* is dominant family in fecal microbiota of Behçet’s Syndrome patients with uveitis,” *PLoS One*, vol. 15, no. 10 October, pp. 1–14, 2020.
- [178] K. Zhang *et al.*, “*Desulfovibrio desulfuricans* aggravates atherosclerosis by enhancing intestinal permeability and endothelial TLR4/NF-κB pathway in *ApoE*^{-/-} mice,” *Genes Dis.*, no. xxxx, 2021.
- [179] A. Sroka-oleksiak *et al.*, “Metagenomic analysis of duodenal microbiota reveals a potential biomarker of dysbiosis in the course of obesity and type 2 diabetes: A pilot

- study," *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 2, 2020.
- [180] M. Nuriel-Ohayon *et al.*, "Progesterone Increases Bifidobacterium Relative Abundance during Late Pregnancy," *Cell Rep.*, vol. 27, no. 3, pp. 730-736.e3, 2019.
- [181] F. Turroni, D. van Sinderen, and M. Ventura, "Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 149, no. 1, pp. 37–44, 2011.
- [182] J. Guan *et al.*, "Effect of Bifidobacterium longum subsp. longum on the proliferative and tight-junction activities of Human Fetal Colon Epithelial Cells," *J. Funct. Foods*, vol. 86, 2021.
- [183] L. K. Stenman, A. Waget, C. Garret, P. Klopp, R. Burcelin, and S. Lahtinen, "Potential probiotic Bifidobacterium animalis ssp. lactis 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice," *Benef. Microbes*, vol. 5, no. 4, pp. 437–445, 2014.
- [184] Q. Zhai, S. Feng, N. Arjan, and W. Chen, "A next generation probiotic, Akkermansia muciniphila," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, no. 19, pp. 3227–3236, 2019.
- [185] P. Paone and P. D. Cani, "Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners?," *Gut*, vol. 69, no. 12, pp. 2232–2243, 2020.
- [186] G. W. Brennan CA, "Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium.," *Nat Rev Microbiol.*, vol. 176, no. 5, pp. 156–166, 2019.
- [187] A. Heinken, M. T. Khan, G. Paglia, D. A. Rodionov, H. J. M. Harmsen, and I. Thiele, "Functional metabolic map of Faecalibacterium prausnitzii, a beneficial human gut microbe," *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 18, pp. 3289–3302, 2014.
- [188] T. U. Maioli *et al.*, "Possible Benefits of Faecalibacterium prausnitzii for Obesity-Associated Gut Disorders," *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. December, pp. 1–13, 2021.
- [189] A. Mukherjee, C. Lordan, R. P. Ross, and P. D. Cotter, "Gut microbes from the phylogenetically diverse genus Eubacterium and their various contributions to gut health," *Gut Microbes*, vol. 12, no. 1, pp. 1–28, 2020.
- [190] A. Tett *et al.*, "The Prevotella copri Complex Comprises Four Distinct Clades Underrepresented in Westernized Populations," *Cell Host Microbe*, vol. 26, no. 5, pp. 666-679.e7, 2019.
- [191] A. Z. Leite *et al.*, "Detection of increased plasma interleukin-6 levels and prevalence of Prevotella copri and Bacteroides vulgatus in the feces of type 2 diabetes patients," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. SEP, 2017.
- [192] F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, C. Zitoun, A. Duchamp, F. Bäckhed, and

- G. Mithieux, "Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 1, pp. 151–157, 2016.
- [193] S. Pisanu *et al.*, "Impact of a moderately hypocaloric mediterranean diet on the gut microbiota composition of italian obese patients," *Nutrients*, vol. 12, no. 9, pp. 1–19, 2020.
- [194] S. J. Pellock *et al.*, "Three structurally and functionally distinct -glucuronidases from the human gut microbe *Bacteroides uniformis*," *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 48, pp. 18559–18573, 2018.
- [195] M. Duan, Y. Wang, Q. Zhang, R. Zou, M. Guo, and H. Zheng, "Characteristics of gut microbiota in people with obesity," *PLoS One*, vol. 16, no. 8 August, pp. 1–15, 2021.
- [196] A. Nakajima *et al.*, "crossm A Soluble Fiber Diet Increases *Bacteroides fragilis* Group," *Food M*, vol. 86, no. 13, pp. 1–13, 2020.
- [197] F. Del Chierico *et al.*, "Fecal microbiota signatures of insulin resistance, inflammation, and metabolic syndrome in youth with obesity: a pilot study," *Acta Diabetol.*, vol. 58, no. 8, pp. 1009–1022, 2021.
- [198] P. Kulkarni, P. Devkumar, and I. Chattopadhyay, "Could dysbiosis of inflammatory and anti-inflammatory gut bacteria have an implications in the development of type 2 diabetes? A pilot investigation," *BMC Res. Notes*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, 2021.
- [199] T. D. Horvath *et al.*, "*Bacteroides ovatus* colonization influences the abundance of intestinal short chain fatty acids and neurotransmitters," *iScience*, vol. 25, no. 5, p. 104158, 2022.
- [200] C. Kmezik, D. Krska, S. Mazurkewich, and J. Larsbrink, "Characterization of a novel multidomain CE15-GH8 enzyme encoded by a polysaccharide utilization locus in the human gut bacterium *Bacteroides eggerthii*," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2021.
- [201] S. S. R. Verdam, S. Fuentes, C. de Jonge, E.G. Zoetendal, R. Erbil, J.W. Greve, W.A. Buurman, W.M. de Vos, "Human intestinal microbiota composition in associated with local and systeminc inflammation in obesity - accepted article," *Obes. (Silver Spring)*, vol. 21, pp. 607–615, 2013.
- [202] Y. S. Kuang *et al.*, "Connections between the human gut microbiome and gestational diabetes mellitus," *Gigascience*, vol. 6, no. 8, pp. 1–12, 2017.
- [203] D. Mouillot and A. Leprêtre, "A comparison of species diversity estimators," *Res. Popul. Ecol. (Kyoto)*, vol. 41, no. 2, pp. 203–215, 1999.
- [204] J. B. Socolar, J. J. Gilroy, W. E. Kunin, and D. P. Edwards, "How Should Beta-Diversity Inform Biodiversity Conservation?," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 31, no. 1, pp.

- 67–80, 2016.
- [205] M. K. Konopiński, “Shannon diversity index: A call to replace the original Shannon’s formula with unbiased estimator in the population genetics studies,” *PeerJ*, vol. 2020, no. 6, 2020.
- [206] C. A. Simpson, C. Diaz-Arteche, D. Eliby, O. S. Schwartz, J. G. Simmons, and C. S. M. Cowan, “The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review,” *Clin. Psychol. Rev.*, vol. 83, p. 101943, 2021.
- [207] M. A. Stanislawski, D. Dabelea, L. A. Lange, B. D. Wagner, and C. A. Lozupone, “Gut microbiota phenotypes of obesity,” *npj Biofilms Microbiomes*, vol. 5, no. 1, 2019.
- [208] K. D. Cox *et al.*, “Community assessment techniques and the implications for rarefaction and extrapolation with Hill numbers,” *Ecol. Evol.*, vol. 7, no. 24, pp. 11213–11226, 2017.
- [209] M. Hernández, N. M. Quijada, D. Rodríguez-Lázaro, and J. M. Eiros, “Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 52, no. 2, pp. 150–161, 2020.
- [210] E. W. Beals, “Bray-curtis ordination: An effective strategy for analysis of multivariate ecological data,” *Adv. Ecol. Res.*, vol. 14, no. C, pp. 1–55, 1984.
- [211] N. Segata *et al.*, “Metagenomic biomarker discovery and explanation,” *Genome Biol.*, vol. 12, no. 6, p. R60, 2011.
- [212] J. Xie *et al.*, “Short-Chain Fatty Acids Produced by Ruminococcaceae Mediate α -Linolenic Acid Promote Intestinal Stem Cells Proliferation,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 1–12, 2022.
- [213] C. Bamberger *et al.*, “A walnut-enriched diet affects gut microbiome in healthy caucasian subjects: A randomized, controlled trial,” *Nutrients*, vol. 10, no. 2, 2018.
- [214] X. Zhong, J. M. Harrington, S. R. Millar, I. J. Perry, P. W. O’toole, and C. M. Phillips, “Gut microbiota associations with metabolic health and obesity status in older adults,” *Nutrients*, vol. 12, no. 8, pp. 1–17, 2020.
- [215] M. Morotomi, F. Nagai, and Y. Watanabe, “Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov.,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 62, no. 1, pp. 144–149, 2011.
- [216] R. C. E. Bowyer *et al.*, “Use of dietary indices to control for diet in human gut microbiota studies,” *Microbiome*, vol. 6, no. 1, p. 77, 2018.
- [217] M. Beaumont *et al.*, “Heritable components of the human fecal microbiome are

- associated with visceral fat,” *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–19, 2016.
- [218] K. Oki, M. Toyama, T. Banno, O. Chonan, Y. Benno, and K. Watanabe, “Comprehensive analysis of the fecal microbiota of healthy Japanese adults reveals a new bacterial lineage associated with a phenotype characterized by a high frequency of bowel movements and a lean body type,” *BMC Microbiol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, 2016.
- [219] A. A. Hibberd *et al.*, “Probiotic or synbiotic alters the gut microbiota and metabolism in a randomised controlled trial of weight management in overweight adults,” *Benef. Microbes*, vol. 10, no. 2, pp. 121–135, 2019.
- [220] J. K. Goodrich *et al.*, “Human genetics shape the gut microbiome,” *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 789–799, 2014.
- [221] J. L. Waters and R. E. Ley, “The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health,” *BMC Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [222] L. A. Sanz, Yolanda, “Solicitud de patente ES2763874A1,” 2763874, 2020.
- [223] M. Sakamoto, A. Takagaki, K. Matsumoto, Y. Kato, K. Goto, and Y. Benno, “*Butyricimonas synergistica* gen. nov., sp. nov. and *Butyricimonas virosa* sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family ‘Porphyromonadaceae’ isolated from rat faeces,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 59, no. 7, pp. 1748–1753, 2009.
- [224] W. Zhang, J. H. Xu, T. Yu, and Q. K. Chen, “Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 118, no. June, 2019.
- [225] H. Tan, Q. Zhai, and W. Chen, “Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics,” *Food Res. Int.*, vol. 116, no. 1800, pp. 637–644, 2019.
- [226] P. Gauffin Cano, A. Santacruz, Á. Moya, and Y. Sanz, “*Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, 2012.
- [227] M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, W. M. Sattley, and D. A. Stahl, *Brock biology of microorganisms / Michael T. Madigan [y otros cuatro]*. 2018.
- [228] L. M. Cox *et al.*, “Description of two novel members of the family erysipelotrichaceae: *Ileibacterium valens* gen. nov., sp. nov. and *Dubosiella newyorkensis*, gen. nov., sp. nov., from the murine intestine, and emendation to the description of *Faecalibacterium rodentium*,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 67, no. 5, pp. 1247–1254, 2017.

- [229] W. Turpin *et al.*, “Associations of NOD2 polymorphisms with Erysipelotrichaceae in stool of in healthy first degree relatives of Crohn’s disease subjects,” *BMC Med. Genet.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–8, 2020.
- [230] R. Alili *et al.*, “Characterization of the Gut Microbiota in Individuals with Overweight or Obesity during a Real-World Weight Loss Dietary Program: A Focus on the Bacteroides 2 Enterotype,” *Biomedicines*, vol. 10, no. 1, 2022.
- [231] R. B. Jones, T. L. Alderete, J. S. Kim, J. Millstein, F. D. Gilliland, and M. I. Goran, “High intake of dietary fructose in overweight/obese teenagers associated with depletion of Eubacterium and Streptococcus in gut microbiome,” *Gut Microbes*, vol. 10, no. 6, pp. 712–719, 2019.
- [232] H. Zeng, S. L. Ishaq, F. Q. Zhao, and A. D. G. Wright, “Colonic inflammation accompanies an increase of β -catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 35, pp. 30–36, 2016.
- [233] Z. Jie *et al.*, “The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [234] Y. Zhang *et al.*, “The diversity of gut microbiota in type 2 diabetes with or without cognitive impairment,” *Aging Clin. Exp. Res.*, vol. 33, no. 3, pp. 589–601, 2021.
- [235] D. Vandeputte *et al.*, “Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota,” *Gut*, vol. 66, no. 11, pp. 1968–1974, 2017.
- [236] J. L. Hu *et al.*, “Gut Microbiota Community Shift with Severity of Coronary Artery Disease,” *Engineering*, vol. 7, no. 12, pp. 1715–1724, 2021.
- [237] J. Toledo-Alarcón, L. Fuentes, C. Etchebehere, N. Bernet, and E. Trably, “Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 46, no. 2, pp. 1694–1704, 2021.
- [238] T. Van Hecke, J. De Vrieze, N. Boon, W. H. De Vos, E. Vossen, and S. De Smet, “Combined Consumption of Beef-Based Cooked Mince and Sucrose Stimulates Oxidative Stress, Cardiac Hypertrophy, and Colonic Outgrowth of Desulfovibrionaceae in Rats,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 1–11, 2019.
- [239] Y. Li, Q. Liu, C. Peng, and B. Ruan, “Both Gut Microbiota and Differentially Expressed Proteins Are Relevant to the Development of Obesity,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, 2020.
- [240] W. Zhang-Sun, L. A. Augusto, L. Zhao, and M. Caroff, “Desulfovibrio desulfuricans isolates from the gut of a single individual: Structural and biological lipid A

- characterization," *FEBS Lett.*, vol. 589, no. 1, pp. 165–171, 2015.
- [241] L. A. David *et al.*, "Diet Rapidly Alters the Human Gut Microbiota," *Nature*, vol. 505, no. 7484, pp. 559–563, 2014.
- [242] Á. S. García-Vega, V. Corrales-Agudelo, A. Reyes, and J. S. Escobar, "Diet quality, food groups and nutrients associated with the gut microbiota in a nonwestern population," *Nutrients*, vol. 12, no. 10, pp. 1–21, 2020.
- [243] C. Camerotto, A. Cupisti, C. D'Alessandro, F. Muzio, and M. Gallieni, "Dietary fiber and gut microbiota in renal diets," *Nutrients*, vol. 11, no. 9, pp. 1–15, 2019.
- [244] J. W. Anderson *et al.*, "Health benefits of dietary fiber," *Nutr. Rev.*, vol. 67, no. 4, pp. 188–205, 2009.
- [245] FAO, *Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand*. 2013.
- [246] L. Schwingshackl *et al.*, "Total Dietary Fat Intake, Fat Quality, and Health Outcomes: A Scoping Review of Systematic Reviews of Prospective Studies.," *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 77, no. 1, pp. 4–15, 2021.
- [247] J. L. Slavin, "Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber.," *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 108, no. 10, pp. 1716–1731, Oct. 2008.
- [248] S. Agudelo and M. de S. y P. Minsalud, "Recomendaciones de Ingesta de COMPRAS PÚBLICAS Energía y Nutrientes (RIEN) para la población colombiana Documento Resumen," p. 22, 2016.
- [249] J. J. Carrero *et al.*, "Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta," *Nutr. Hosp.*, vol. 20, no. 1, pp. 63–69, 2005.
- [250] G. Merra *et al.*, "Influence of mediterranean diet on human gut microbiota," *Nutrients*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2021.
- [251] A. Beam, E. Clinger, and L. Hao, "Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota," *Nutrients*, vol. 13, no. 8, pp. 1–15, 2021.
- [252] Y. Zhang, Y. Wang, B. Ke, and J. Du, "TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure," *Transl. Res.*, vol. 228, pp. 109–125, 2021.
- [253] Z. W. Guan, E. Z. Yu, and Q. Feng, "Soluble dietary fiber, one of the most important nutrients for the gut microbiota," *Molecules*, vol. 26, no. 22, pp. 1–15, 2021.