



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN POBLACIÓN INFANTIL Y ADOLESCENTE
CON SOBREPESO Y OBESIDAD DEL ESTADO DE MORELOS**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ELIENAI SANTANA NAVA

CODIRECTORES:

**DRA. ANA ISABEL BURGUETE GARCÍA
DR. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2022



CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Obesidad	5
2.2 Microbiota intestinal	6
2.4 Estrategias Metodológicas de estudio de la microbiota	17
2.5 Citocinas	18
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo General	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
6.1 Población de estudio	25
6.2 Extracción de DNA de heces	26
6.3 PCR en tiempo real	26
6.4 Determinación de citocinas	27
6.5 Análisis estadísticos	28
7. RESULTADOS	29
7.1. Abundancia relativa de filo Firmicutes y Bacteroidetes	29
7.2. Concentración de citocinas	30
7.3. Características asociadas con la obesidad	30
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	38
10. PERSPECTIVAS.....	38
11. LIMITACIONES	39
12. AGRADECIMIENTO.....	39
13. LITERATURA CONSULTADA.....	40

RESUMEN

México se encuentra en los primeros 10 lugares a nivel mundial con obesidad infantil. Esta enfermedad es generada por diversos factores entre ellos la microbiota intestinal. Diversos estudios han reportado una asociación entre la obesidad y la microbiota intestinal, prioritariamente un incremento en la abundancia del filo Firmicutes, además de una inflamación crónica de bajo grado caracterizada por la presencia de las citocinas IL-6 y TNF- α . Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la asociación en la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes con citocinas proinflamatorias en población infantil y adolescente con obesidad del estado de Morelos. Se extrajo el DNA de 175 muestras de heces, y se determinó la abundancia relativa (AR) de los filos bacterianos Firmicutes y Bacteroidetes a través de qPCR en tiempo real. La concentración de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α fue determinada en suero utilizando kit Human cytokine/chemokine Magnetic Bead panel, (HCYTMAG-60K-PX29). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA 14.0. Los resultados obtenidos mostraron que los sujetos con obesidad, tienen mayor circunferencia de cintura, y presentan un aumento en la concentración de IL-10 y TNF- α en comparación con los sujetos con sobrepeso, siendo estadísticamente significativo. También, se encontró un incremento de la AR de Firmicutes en niños con obesidad, observándose que por cada unidad de la AR de Firmicutes hay un incremento del 28% de la concentración de IL-10 y por cada unidad de la AR de Bacteroidetes hay una disminución del 34% en la concentración de TNF- α .

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema a nivel mundial que afecta adultos y a niños. México ocupa el segundo lugar en adultos y se encuentra entre los primeros diez lugares en obesidad infantil; la obesidad en niños y adultos ha aumentado en las últimas décadas (OCDE, 2019). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó del año 2012 al 2020 un incremento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes. En el 2012, se mostró una prevalencia combinada de 34.4% en los niños en edad escolar (5-11 años) y de 34.9% en los adolescentes (12-19 años). En el año 2020 la prevalencia combinada en niños fue de 38.2% y en adolescentes de 43.8%. Estos resultados sugieren que al paso de los años hay un aumento de sobrepeso y obesidad tanto en niños como adolescentes (Figura 1) (Shamah-Levy, 2021).

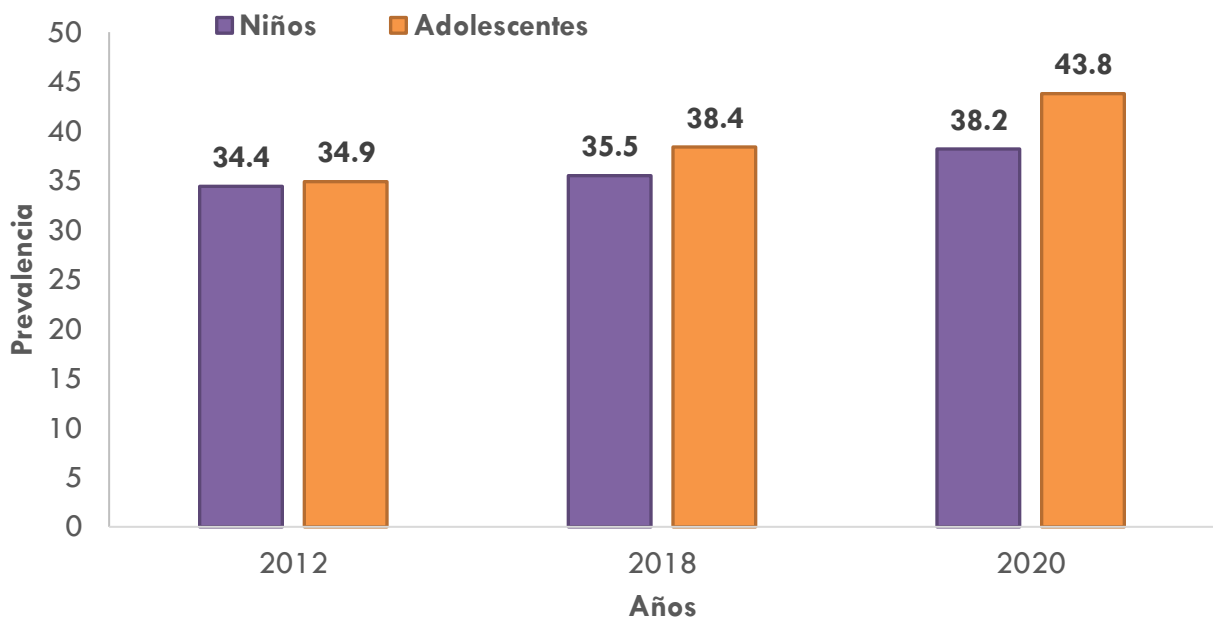


Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población infantil y adolescente (Modificado de Shamah-Levy, 2021).

La obesidad es una enfermedad multifactorial que promueve el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, arterioesclerosis, y diabetes mellitus (Mercado y Vilchis, 2013). La obesidad se genera por un exceso de grasa en el cuerpo debido a que la ingesta de alimentos es superior al gasto energético, este desequilibrio se refleja en un incremento en el peso

corporal (Rodrigo-Cano *et al.*, 2017). La obesidad infantil tiene efectos duraderos, incluidas consecuencias que amenazan la salud a lo largo de la vida (OCDE, 2019).

Recientemente, se ha sugerido que la microbiota intestinal podría jugar un papel importante en el desarrollo de la obesidad. La microbiota intestinal es una comunidad de microorganismos que promueve la degradación de carbohidratos complejos, regula la repuesta inmune y metabolismo del hospedador, entre otros. (Cani, 2013). Se ha sugerido que en nuestro cuerpo solo el 10% corresponden a células humanas y el 90% son células de diversos microorganismos de la microbiota intestinal como hongos, bacterias, arqueas, virus, etc. (Cani, 2013). La microbiota intestinal es dinámica ya que varía de acuerdo a la edad del ser humano. La colonización del tracto gastrointestinal del neonato por la microbiota intestinal inicia al momento del parto. Posteriormente, la lactancia promueve en el neonato el desarrollo de comunidades bacterianas representadas por las familias Staphylococcaceae, Sphingomonadaceae y el género *Lactobacillus* (Corona-Cervantes *et al.*, 2020). Posteriormente, la microbiota intestinal es modulada por la contribución de la dieta y diversos factores ambientales (Farías *et al.*, 2011).

Los filos bacterianos Firmicutes y Bacteroidetes son los más abundantes de la microbiota intestinal. La abundancia y diversidad de ambos filos se encuentran en equilibrio en personas con normopeso. Sin embargo, diversos factores como la dieta y el uso indiscriminado de antibióticos promueven un desequilibrio de la microbiota intestinal generando una disbiosis, la cual está relacionada con la obesidad. La disbiosis intestinal presenta una alteración de las diversas comunidades bacterianas identificada por una reducción de especies del filo Bacteroidetes y aumento de especies del filo Firmicutes (Cani, 2011).

La microbiota intestinal regula en gran medida la inmunidad innata y adaptativa (Farías *et al.*, 2011). La inmunidad se divide en dos tipos: inmunidad innata, la cual es la primera línea de defensa, y la inmunidad adaptativa su respuesta es específica y tiene memoria, donde participan los linfocitos B y T (Kindt *et al.*, 2007). La microbiota intestinal participa en la regulación de la inmunidad innata a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) presentes en diversas bacterias, por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS). Los LPS son componentes esenciales de la pared

celular bacteriana principalmente bacterias gram negativas, y aunque no son estrictamente factores de virulencia bacterianos, cuando se incrementan en el cuerpo humano promueven una intensa respuesta de la inmunidad innata (Icaza-Chávez, 2013). Se ha demostrado que los LPS, así como los ácidos grasos saturados de la dieta, pueden actuar como ligando del receptor *toll-like* 4 (TLR4), el cual promueve la liberación de citocinas inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6) y otras citocinas proinflamatorias relacionadas con resistencia a la insulina (Farías *et al.*, 2011). Por otro lado, la hipoxia en el tejido adiposo, la muerte celular de los adipocitos periféricos, la angiogénesis y el aumento de proteínas de matriz extracelular producen una desregulación en la homeostasis debido al aumento de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias antes mencionadas (IL-6 y TNF- α); así como el descenso de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Izaola *et al.*, 2015). Por lo anterior, la microbiota intestinal se encuentra íntimamente relacionada con obesidad, evento en el destaca un estado proinflamatorio de bajo grado promovido por citocinas proinflamatorias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Obesidad

La obesidad es generada por múltiples factores: ambiente obesogénico la relación en el entorno donde se encuentra, hábitos alimentarios no tener una buena alimentación, como alimentos ricos en carbohidratos, sedentarismo no realizar actividad física, genéticos hay genes relacionados con la obesidad como leptina, entre otros, alteraciones endocrinas, y microbiota intestinal la disbiosis que se genera en la misma. (Figura 2) (Rodrigo-Cano *et al.*, 2017).

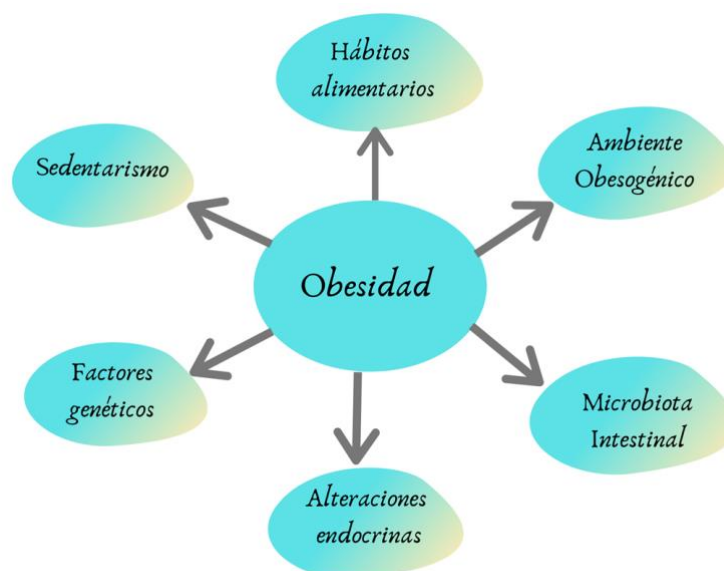


Figura 2. Factores relacionados con la obesidad (Modificado de Rodrigo-Cano *et al.*, 2017).

La causa principal de la obesidad es un balance energético positivo como resultado de un aumento del aporte calórico de la dieta y una disminución del gasto de energía asociado con baja actividad física (Corro *et al.*, 2016). Este desequilibrio en el cuerpo está relacionado con el tejido adiposo, el cual es un tejido endocrino complejo, metabólicamente muy activo en el que destacan funciones como: I) El mantenimiento del balance energético, II) la termorregulación, III) el metabolismo de lípidos y glucosa, IV) la modulación de la función hormonal y, V) la regulación de la presión arterial (Izaola *et al.*, 2015). La obesidad se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares,

arterioesclerosis y diabetes tipo 2, incluso se ha sugerido los potenciales problemas en la salud en niños con obesidad (Mercado y Vilchis, 2013).

La obesidad infantil tiene repercusiones en la adultez, se ha pronosticado que entre el 77 y 92% de los niños y adolescentes obesos continuarán así en la etapa adulta. En la actualidad, los niños registran enfermedades que eran comunes en personas adultas, tales como diabetes tipo 2, dislipidemias, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y problemas psicosociales como consecuencia de padecer el denominado síndrome metabólico (Muñoz y Arango, 2017; Huerta-Ávila et al., 2019). En contraste, los niños no obesos muestran una probabilidad de aproximadamente el 10% de desarrollar las patologías típicas antes mencionadas en la etapa adultos (Scudiero et al., 2019).

El sobrepeso y obesidad son problemas relacionados con el exceso de grasa corporal. Para determinar el peso corporal se calcula el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual se obtiene dividiendo el peso entre la altura. La OMS ha recomendado el uso del Puntaje Z en niños para determinar la medida antropométrica del peso. Por ejemplo, los niños entre el percentil 5 y 85 se definen como niños de peso normal; entre el percentil 85 y 95 se consideran con sobrepeso; y con percentil ≥ 95 , con obesidad (Pérez-Herrera y Cruz-López, 2018). En años recientes, la microbiota intestinal ha recibido especial atención en obesidad, debido a sus diversas funciones, entre ellas la de regular el metabolismo.

2.2 Microbiota intestinal

La microbiota es el conjunto de microorganismos que viven en un mismo hábitat, en el cual se incluyen bacterias, virus, hongos y eucariotas unicelulares (Donaldson *et al.*, 2015). El microbioma y la microbiota son dos conceptos relacionados con diferente significado. El microbioma representa a el conjunto de genes de una comunidad microbiana. La microbiota es un conjunto de microorganismos con diversas funciones y que viven en un mismo hábitat (Lagier *et al.*, 2018). La microbiota tiene una estrecha relación simbiótica con el huésped, generando un beneficio mutuo sin producir enfermedad (Donaldson *et al.*, 2015; Lagier *et al.*, 2018). La microbiota ha colonizado

diversas partes del cuerpo humano, por ejemplo, piel, fosas nasales, boca, faringe e intestino (colon); siendo en este último órgano en donde es más cuantiosa y diversa (Grice y Segre, 2012).

El intestino humano alberga 10¹⁴ bacterias, esto supera por 10 veces el número total de células eucariotas en el cuerpo humano (Cani, 2013). El intestino de los vertebrados está dominado principalmente por dos filos que constituyen del 80-90% de las bacterias residentes en esta región anatómica, Bacteroidetes (géneros representativos: Bacteroides y Prevotella) y Firmicutes (géneros representativos: Clostridium, Enterococcus y Lactobacillus). Otros filos representativos de la microbiota intestinal son Actinobacteria (género Bifidobacterium) y Proteobacteria (géneros Helicobacter y Escherichia) (Cani, 2013).

Algunas funciones de la microbiota intestinal son:

- Funciones metabólicas: Proceso de fermentación de los sustratos no digeribles de la alimentación. La diversidad genética de las comunidades microbianas que conforman la microbiota, determina la diversidad en el número de enzimas presentes en el intestino del huésped. Las diversas enzimas de la microbiota promueven la degradación de hidratos de carbono complejos generando los Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC), como butirato, acetato y propionato (Mena-Miranda, 2019).
- Funciones en respuesta inmune: La microbiota intestinal participa en el desarrollo y maduración del sistema inmune de las mucosas, permite establecer una eficiente respuesta contra los gérmenes patógenos a través de la liberación de bacteriocinas (Mena-Miranda, 2019).
- Funciones tróficas: Actúa en la proliferación y diferenciación de las células del epitelio intestinal (Mena-Miranda, 2019), a través de la liberación de AGCC en el colon (Castañeda Guillot, 2018).

La tasa de producción de AGCC varía según la composición y la diversidad de la microbiota del colon; además de factores como la edad, y el tipo de fibra dietética disponible para fermentación microbiana (Gómez-Gallego *et al.*, 2019). Además de los

AGCC antes mencionados, succinato, y formiato ejercen propiedades bioactivas, como la modulación del sistema endocrino, regulan el apetito, regulan la función intestinal y el metabolismo de los lípidos (Gómez-Gallego *et al.*, 2019). Adicionalmente, la microbiota intestinal favorece la absorción de iones de Ca^{+2} , Fe^{+2} y Mg^{+2} a nivel del colon, la producción de vitaminas K, B12, biotina, ácido fólico, pantoténico y la síntesis de los precursores de aminoácidos a partir de amoníaco o urea (Castañeda Guillot, 2018). Una mayor concentración de AGCC en las heces puede estar relacionada con el exceso de grasa corporal en humanos (Miranda *et al.*, 2019).

La relación entre la inmunidad intestinal y la microbiota tiene como principio mantener mecanismos inmunoreguladores íntimamente relacionados con los mecanismos de tolerancia inmunológica de los antígenos propios, aquellos presentes en la dieta y algunos componentes de la microbiota. Las alteraciones en la abundancia de las comunidades de la microbiota intestinal se han asociado a trastornos gastrointestinales y se ha sugerido su participación en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como: enfermedad de Crohn, la celiaquía (Polanco-Allué, 2015), y lupus eritematoso sistémico (González *et al.*, 2017). Además, la dieta alta en grasa y sus efectos en la microbiota intestinal y en la respuesta inmune, ha favorecido la incidencia de enfermedades inflamatorias como el asma y la diabetes (Icaza-Chávez, 2013).

En el humano, la microbiota intestinal presenta una plétora de microorganismos necesarios e indispensables, la mayoría benéficos para la salud; pero también hay microorganismos patógenos. La microbiota intestinal bacteriana está representada principalmente por cinco filos (Figura 3) que son: Actinobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes. Los filos bacterianos con mayor representatividad en el intestino son: Firmicutes (Gram positivos), Bacteroidetes (Gram negativos) y Actinobacteria (Gram positivos) (Donaldson *et al.*, 2015). El filo Firmicutes se encuentra en mayor proporción e incluye más de 200 géneros bacterianos, entre los que se encuentran *Mycoplasma*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Lactobacillus* (Farías *et al.*, 2011).

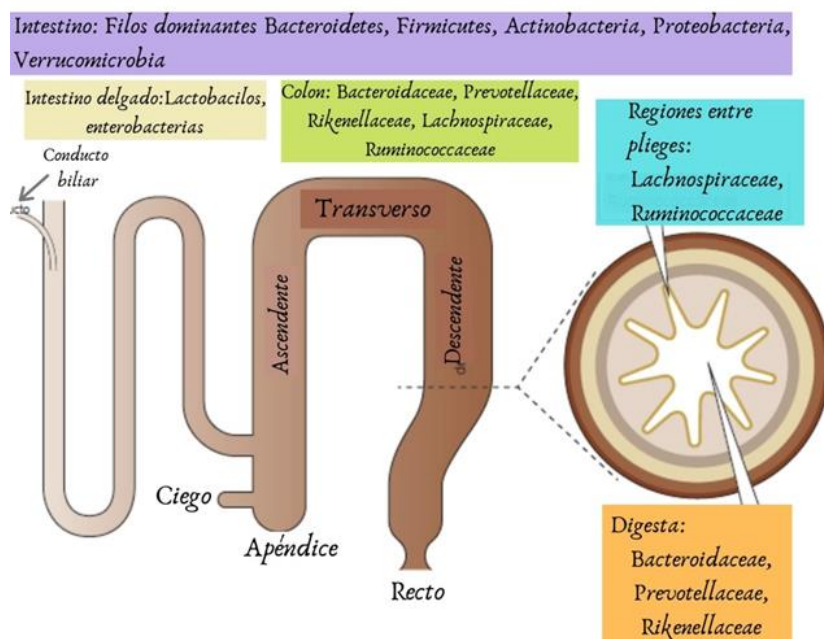


Figura 3. Filos predominantes de la microbiota intestinal y su ubicación geográfica en el intestino (Modificado de Donaldson *et al.*, 2015).

La colonización inicial del intestino por la microbiota en los neonatos inicia después del parto. Neonatos nacidos de forma eutócica adquieren microbiota similar a la microbiota intestinal y vaginal de la madre (*Lactobacillus* y *Prevotella*). Los neonatos que nacen a través de cesárea, suelen adquirir microbiota asociada a la piel (*Propionibacterium*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*) (Grice y Segre, 2012). En apoyo a lo anterior, García-Mantrana y colaboradores, recientemente reportaron que la cesárea y antibióticos alteran la transmisión natural de la microbiota de la madre al niño; promoviendo un mayor riesgo de desarrollo de sobrepeso en niños de 18 meses.

Esta colonización se complementa con la forma de alimentación del recién nacido (Rodríguez *et al.*, 2015). La lactancia es un proceso importante para el recién nacido, ya que la leche materna presenta diversos beneficios entre ellos el de contener una gran cantidad de oligosacáridos complejos con actividad prebiótica, que estimulan el crecimiento de grupos bacterianos específicos como las bifidobacterias, las cuales tienen un efecto positivo en la salud del neonato (Rodríguez *et al.*, 2015). Los niños alimentados con leche materna presentan principalmente las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Hunt *et al.*, 2011); sin embargo, la leche materna puede contener más de 700 especies de bacterias (Rodríguez *et al.*, 2015). Los

recién nacidos alimentados con fórmula están expuestos a diferentes carbohidratos, y micronutrientes, provocando una colonización microbiana del intestino con el género *Bacteroides*, con *Enterococos*, *Coliformes*, *Clostridios* y en menor proporción por las bacterias del género *Bifidobacterium* (Milani *et al.*, 2017).

El desarrollo de la microbiota intestinal es un proceso dinámico influenciado por factores intrínsecos (edad, sexo, etc.) y extrínsecos (modo de nacimiento, tipo de dieta, uso de antibióticos, ejercicio, factores geográficos, etc.) (Figura 4). La dieta y el ejercicio físico podrían englobarse en el concepto “estilo de vida”, ya que existe una asociación entre ellos. Un estilo de vida activo se asocia frecuentemente con un alto consumo de frutas y verduras y mayor gasto de energía, mientras que el sedentarismo está asociado con el consumo de alimentos ricos en calorías y grasas y menor o escasa actividad física (De Lucas *et al.*, 2019). La práctica de ejercicio físico aumenta la producción de butirato y otros ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota intestinal, promoviendo entonces una regulación del metabolismo energético (De Lucas *et al.*, 2019).

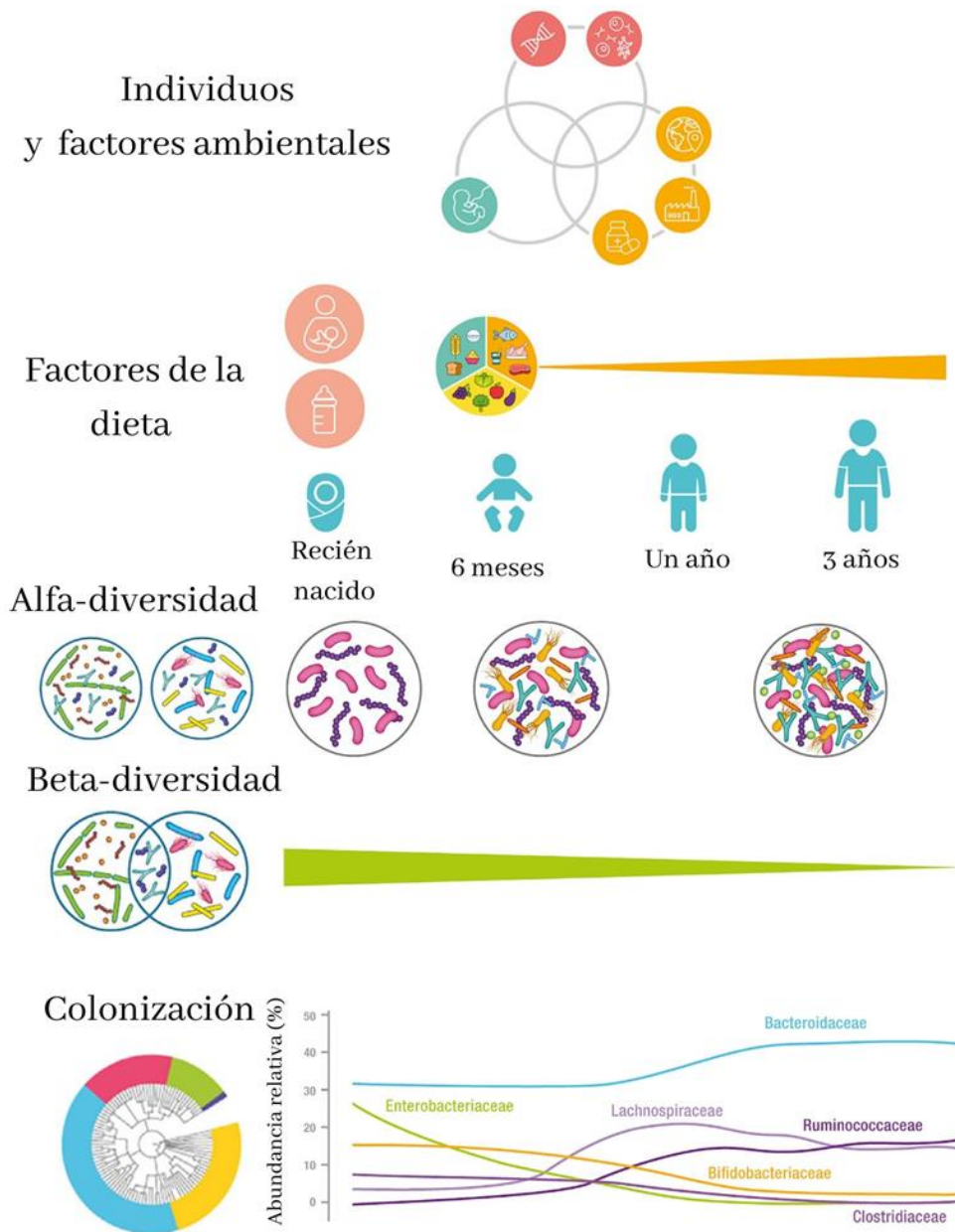


Figura 4. Desarrollo de la microbiota en los tres primeros años de vida (Modificado de Derrien *et al.*, 2019). El desarrollo de la microbiota intestinal es dependiente de factores ambientales, tipo de dieta, leche materna o fórmula, y posteriormente dieta no láctea que puede ser balanceada o no saludable. Todos estos factores generan la diversidad de microorganismo (alfa-diversidad y beta-diversidad) que se encontrarán en la microbiota intestinal.

Por otro lado, se ha reportado una asociación entre el uso de antibióticos y el IMC en niños. El uso de antibióticos (macrólidos) se han asociado con cambios en la diversidad y abundancia de la microbiota, aumento del IMC, adiposidad, enfermedades metabólicas

en niños y adultos, reducción del metabolismo bacteriano, reducción en la abundancia del género *Bifidobacterium* y de la familia Christensenellaceae; así como un aumento del género *Bacteroides* y familia *Erysipelotrichaceae* (Korpela y De Vos, 2016). Se ha sugerido que la dinámica de desarrollo de la microbiota intestinal durante los primeros tres años de vida presentan patrones comunes de desarrollo de un país a otro (Derrien *et al.*, 2019).

La microbiota intestinal presenta una simbiosis con nuestro cuerpo con base en lo que ingerimos, por lo que nuestra dieta es un factor altamente determinante en la composición y diversidad de la microbiota. La ingesta de hidratos de carbono complejos (principalmente fibra) son aquellos que más influyen en la composición de la microbiota. La fibra soluble e insoluble, promueve la presencia de bacterias comensales en la microbiota intestinal, como son los géneros *Bifidobacterium*, *Roseburia*, y la especie *Faecalibacterium prausnitzii*; bacterias que disminuyen la presencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., y *Listeria* sp. También, el consumo de fibra aumenta la producción de AGCC que tienen numerosos beneficios en la salud como fuente de energía para los colonocitos, previenen el cáncer de colon y regulan el metabolismo lipídico a nivel hepático, entre otros (De Lucas *et al.*, 2019).

2.3 Alteración de la abundancia de los filos Firmicutes y Bacteroidetes en la obesidad infantil

Como se ha mencionado previamente, la obesidad se caracteriza por presentar un proceso de disbiosis, evento en el que se observa un desequilibrio en la abundancia y diversidad de los microorganismos de la microbiota (Mueller, 2015). Una vez establecida, la microbiota intestinal es relativamente estable a lo largo de la vida adulta; sin embargo, las intervenciones con antibióticos, el estilo de vida y los cambios en la dieta pueden contribuir a cambios drásticos en la composición bacteriana (Koleva *et al.*, 2015). Todos los factores antes mencionados promueven una alteración en la diversidad bacteriana, entre lo que destaca una reducción de la abundancia del filo Bacteroidetes y un aumento de Firmicutes (Gómez-Gallego *et al.*, 2019).

Actualmente, los problemas de sobrepeso y obesidad inician a edades más tempranas. Una nutrición inadecuada durante el período prenatal y la infancia; adicional a una menor actividad física durante el desarrollo infantil genera un desbalance energético promoviendo la obesidad infantil (Moreira-Ochoa *et al.*, 2018). Las comunidades de la microbiota intestinal son dinámicas en un individuo desde el nacimiento hasta la tercera edad (Derrien *et al.*, 2019). El desarrollo de obesidad infantil fue asociado con una mayor ingesta de proteínas de origen animal y menor consumo de fibra; además de una mayor abundancia del género *Prevotella spp.* en la microbiota intestinal de las madres a las que se les realizó la cesárea (García-Mantrana *et al.*, 2020). La microbiota intestinal en niños sanos de tres años de edad muestra diferencias taxonómicas y funcionales en comparación con la microbiota de adultos. Sin embargo, en niños escolares (6-9 años) se observó que la microbiota intestinal se encuentra enriquecida en los filos Bacteroidetes y Actinobacteria, similar a la de los adultos sanos (Derrien *et al.*, 2019).

El consumo de alimentos ricos en proteínas derivados de carnes rojas aumenta la diversidad microbiana, lo que se considera benéfico para la salud; sin embargo, también puede aumentar la presencia de bacterias patógenas debido a la producción de compuestos tóxicos como el amonio, derivados sulfurados, y la presencia en la circulación sistémica de óxido de trimetilamina (TMAO). Dietas con alto contenido en grasa disminuyen la diversidad bacteriana, con lo que decrece la presencia de bacterias consideradas benéficas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Akkermansia muciniphila*), promoviendo el aumento en la permeabilidad intestinal, y el aumento de los niveles de lipopolisacárido (LPS) derivado de bacterias Gram-negativas en sangre (De Lucas *et al.*, 2019).

Para identificar las diferencias específicas entre la microbiota del intestino de individuos obesos y delgados, se realizaron los primeros estudios en ratones en donde se descubrió por primera vez la relación de la microbiota con la obesidad. Inicialmente, se realizaron estudios en ratones deficientes en la actividad del gen de leptina (*ob/ob*). Turnbaugh *et al.* (2006) mostraron que las heces de ratones obesos *ob/ob* presentaban menor abundancia de Bacteroidetes y mayor abundancia de Firmicutes que sus compañeros de camada magra; la reducción proporcional de Bacteroidetes y el aumento de Firmicutes promovió el enriquecimiento de genes que codifican para enzimas clave

implicadas en la digestión de carbohidratos, además de incrementar la obtención y almacenamiento de energía de los alimentos (Turnbaugh *et al.*, 2006). En la Figura 5 se resumen los principales cambios relacionados con obesidad.

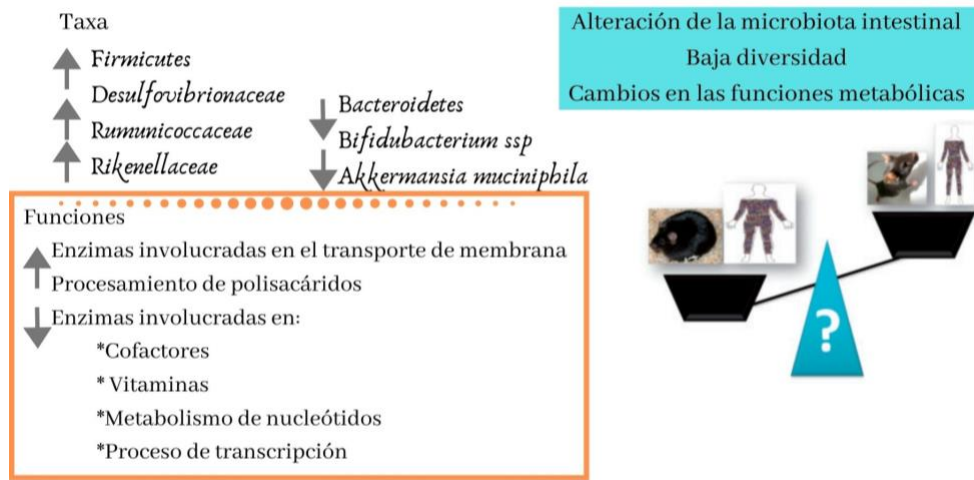


Figura 5. Cambios relacionados con la obesidad. La obesidad se asocia con cambios en la abundancia y diversidad de la microbiota intestinal, incluyendo menor diversidad de especies y cambios en la abundancia de genes implicados en el metabolismo (Modificado de Cani, 2013).

El modelo murino ha jugado un importante papel en la caracterización de la microbiota en el desarrollo de la obesidad. En este sentido, se encontró que los ratones gnotobióticos (ratones libres de microbiota/estériles) presentan capacidad de extracción de energía de la dieta, y por lo tanto el aumento de peso con una dieta alta en grasa es mucho menor que los ratones convencionales. Los ratones convencionales alimentados con dieta alta en grasas y oligofruktosa no se relacionaron con ganancia de peso corporal y tolerancia a la glucosa. Los grupos de ratones gnotobióticos alimentados con una dieta alta en grasa ganaron más peso y grasa corporal total en comparación de los ratones alimentados con una dieta baja en grasa. Los ratones de todos los grupos alimentados con alto contenido en grasa y oligofruktosa mostraron menos ganancia de peso y porcentaje de grasa corporal en comparación con los ratones alimentados solo con dieta alta en grasa (Woting *et al.*, 2015).

Posterior a los cambios observados de la microbiota intestinal en ratones obesos y delgados, se realizaron estudios en humanos con normopeso y obesidad para identificar cambios en la microbiota intestinal. A continuación, se describen algunos trabajos

realizados de la microbiota intestinal en obesidad infantil relacionados con este proyecto de investigación.

Un estudio realizado en la ciudad de México encontró que las concentraciones de AGCC fueron más bajas en niños (9-11 años) con obesidad y sobrepeso que en niños con peso normal. Esta disminución en AGCC observada en heces puede ser generada por una disbiosis de la microbiota. En este mismo estudio, se observó que el filo Firmicutes fue menos abundante en niños con peso normal, que con sobrepeso y obesidad. En los niños con obesidad se observó una mayor abundancia de los géneros *Faecalibacterium* sp. *Roseburia* sp., y la familia *Lachnospiraceae* pertenecientes al filo Firmicutes. Los géneros *Blautia* sp. *Coproccoccus* sp., pertenecientes al filo Firmicutes y la familia *Enterobacteriaceae* perteneciente al filo Proteobacteria se encontraron en mayor abundancia en niños con sobrepeso. Además, se observó una disminución en los géneros *Succinivibrio* sp., *Erwinia* sp., perteneciente al filo Proteobacteria y *Oscillospira* sp., pertenecientes al filo Firmicutes en individuos con obesidad y sobrepeso, y solamente el género *Oscillospira* sp., se observó en menor abundancia en los individuos con sobrepeso (Murugesan *et al.*, 2015).

Estrada-Velasco y cols., en el 2015 realizaron un estudio en niños de la Ciudad de México para determinar la abundancia de los filios Firmicutes y Bacteroidetes. Los autores encontraron una abundancia relativa de Bacteroidetes mayor en los niños con normopeso y una abundancia relativa de Firmicutes mayor en los niños con sobrepeso/obesidad. Además, los investigadores encontraron que una abundancia relativa alta de Bacteroidetes presenta 40% menos probabilidad de presentar sobrepeso/obesidad. En relación con lo anterior, los autores encontraron que la interacción de la microbiota con una dieta alta en grasas saturadas y un menor consumo de alimentos saludables incrementan las posibilidades de presentar obesidad también, reportaron que niños con abundancia relativamente alta de Bacteroidetes y un alto consumo alimenticio no saludable tienen 51% menos posibilidades de presentar sobrepeso/obesidad, niños con una abundancia relativa alta de Bacteroidetes y un consumo alto de alimentación saludable tienen 55% menos posibilidades de tener sobrepeso/obesidad, y niños con abundancia relativa alta de Firmicutes y un consumo alto no saludable de alimentación puede promover el desarrollo de obesidad (Estrada-Velasco *et al.*, 2015).

En un estudio con 78 niños (6 a 16 años) que fueron inscritos en el Departamento de Pediatría del Hospital San Paolo, Milán, Italia lo que hicieron fue caracterizar la composición de la microbiota intestinal. La obesidad se asoció con una microbiota intestinal alterada caracterizada por niveles elevados de Firmicutes y niveles reducidos de Bacteroidetes (Riva *et al.*, 2017). Orbe-Orihuela y cols., evaluaron la asociación de la abundancia relativa de Firmicutes y el aumento de TNF- α relacionado con la obesidad en un estudio que incluyó a niños de la Ciudad de México. Los investigadores observaron una asociación estadísticamente significativa entre una proporción media alta de Firmicutes con los niños que presentaban obesidad y en la abundancia relativa baja de Bacteroidetes se vio asoció con los individuos obesos. Las concentraciones de TNF- α también se incrementaron significativamente en el grupo de niños obesos. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en otras citocinas evaluadas (IL-6 e IL10) y su asociación con sobrepeso u obesidad (Orbe-Orihuela *et al.*, 2018).

En otro estudio realizado para ver asociación de las citocinas con la microbiota se ha visto que TNF- α se asoció negativamente y la IL-10 se asoció positivamente con *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* (Aguilar *et al.*, 2020). En un estudio realizado recientemente se analizó información de dieta, perfiles de microbiota e IMC en niños de 6 a 12 años. Los resultados mostraron que una abundancia relativa alta de *Lactobacillus reuteri* e ingesta con alto contenido en fructosa están asociados con obesidad y algunos marcadores de riesgo cardiometabólico (niveles altos de triglicéridos y glucosa) en niños de 6-12 años (Huerta-Ávila *et al.*, 2019).

Da Silva y colaboradores, encontraron resultados similares. Los niños de la isla del Caribe, específicamente en Trinidad con sobrepeso y obesidad presentan mayor abundancia de Firmicutes, filo asociado con una mayor extracción de energía de la fermentación colónica y de los AGCC. Los niños de peso normal presentaron una abundancia mayor estadísticamente significativa de la familia *Bifidobacteriaceae* y del género *Bifidobacterium* que los niños con sobrepeso y obesidad; en contraste el género *Lactobacillus* fue significativamente más abundante en niños con obesidad/ sobrepeso que en los niños delgados (Da Silva *et al.*, 2020).

2.4 Estrategias Metodológicas de estudio de la microbiota

Aproximadamente el 70% de las especies bacterianas de la microbiota intestinal no pueden cultivarse, debido a que no se han identificado las condiciones de nutrientes, temperatura o concentración de oxígeno para el crecimiento de estos microorganismos (Cani, 2013). Los estudios que mayor éxito han presentado para identificar a la microbiota intestinal son los estudios de metagenómica, concepto que se define como la colección de todo el material genético que constituye una comunidad de microorganismos (específicamente para este caso). Esto consiste en la extracción del ADN de una muestra biológica, seguido de la amplificación y secuenciación de diversos segmentos del genoma de los microorganismos (Robles-Alonso y Guarner, 2013).

La diversidad bacteriana del intestino ha sido analizada a través del análisis del gen del ARN ribosomal 16S (Shin *et al.*, 2016). La importancia del gen del ARN ribosomal 16S radica en que ha sido ampliamente utilizado como un marcador taxonómico a través de sus regiones hipervariables (Valenzuela-González *et al.*, 2015). El gen del ARNr 16S contienen nueve regiones hipervariables (V1-V9) como marcadores filogenéticamente informativos (Shin *et al.*, 2016). Cada región del gen del ARNr 16S proporciona diferente información de la diversidad microbiana. Mediante un análisis *in silico* se determinó que el segmento que incluye las regiones V4/V5 es la región más adecuada para la clasificación de la microbiota intestinal (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

Uno de los métodos comúnmente utilizados para validar los ensayos de secuenciación es la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Utilizando oligonucleótidos específicos diseñados en alguna de las regiones hipervariables del gen del RNA ribosomal 16S para filos, familias, géneros o especies se han logrado identificar las abundancias de las bacterias de la microbiota intestinal en niños que tienen obesidad vs niños con normopeso u algún otro padecimiento.

Además de la disbiosis bacteriana, en la obesidad también se ha observado un estado inflamatorio lo que provoca un incremento en la concentración de algunas citocinas.

2.5 Citocinas

Las citocinas son proteínas bioactivas producidas por diferentes estirpes celulares del sistema inmune, las cuales tienen un papel en el mantenimiento de la homeostasis y en enfermedades inflamatorias. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (8 y 30 kDa), y en procesos patológicos podrían fungir como biomarcadores de diversas enfermedades por ejemplo Alzheimer, asma, aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, obesidad y artritis reumatoide (Stenken y Poschenrieder, 2015). Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL), algunos miembros de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), los interferones (IFN) y las quimiocinas (De Oliveira *et al.*, 2011).

Las citocinas pueden actuar como factores de crecimiento a través de un mecanismo autocrino (sobre la propia célula), paracrino (sobre una célula vecina), yuxtacrino (implicando interacciones intercelulares) y endocrino (se libera a la circulación y puede actuar en sitios distantes) (Figura 6) (Waykole *et al.*, 2009). Las citocinas interactúan entre sí de diversas formas las cuales pueden ser aditivas, sinérgicas o antagónicas. Además, las citocinas son pleiotrópicas, lo cual se refiere a su capacidad para abordar múltiples objetivos y efectos fisiológicos (Stenken y Poschenrieder, 2015).

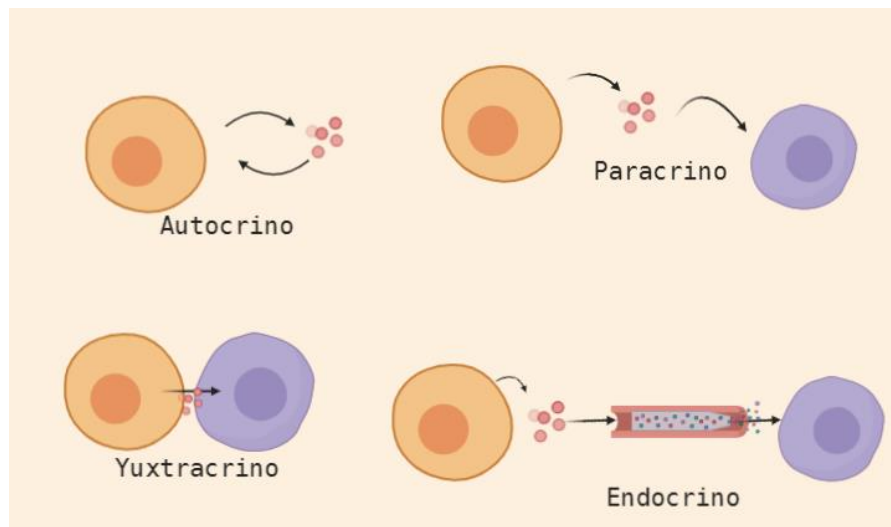


Figura 6. Mecanismo de acción de las citocinas (Modificado de Waykole *et al.*, 2009).

La producción de citocinas es a menudo transitoria y estrictamente regulada. En individuos sanos, las citocinas son indetectables o están presentes en concentraciones

bajas en los fluidos o tejidos. Las concentraciones elevadas de citocinas sugieren un proceso inflamatorio asociado a la progresión de una enfermedad (Stenken y Poschenrieder, 2015).

Las citocinas influyen en la actividad de las células inmunológicas, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia. También regulan la producción y la actividad de otras citocinas, que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria. Como mencionamos previamente, las citocinas pueden dividirse en citocinas proinflamatorias (Th1) o antiinflamatorias (Th2). Entre las consideradas proinflamatorias, tenemos las interleucinas (IL) -1, -2, -6, -7 y TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Las citocinas consideradas como antiinflamatorias son IL-10, IL-4, IL-13 y TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante β) (De Oliveira *et al.*, 2011).

El tejido adiposo secreta una variedad de adipocinas como adiponectina, resistina, Proteína de Unión a Retinol 4 (RBP4), visfatina, apelina, Inhibidor del Activador de Plasminógeno-1 (PAI-1), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleucina-6 (IL-6), Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1 (MCP-1) y Angiotensinógeno (AGE), entre otros. Estas características proinflamatorias del tejido adiposo podrían ser un detonante en la resistencia a la insulina (Ross y Pawlina, 2015). A continuación, se describirán las características de las tres citocinas importantes para este proyecto.

Interleucina-6 (IL-6)

IL-6 es una glicoproteína de 21 kDa importante en la señalización autocrina y paracrina; secretada por muchos tipos de células, como los macrófagos, monocitos, eosinófilos, hepatocitos y células de la glía. La expresión abundante de IL-6 produce fiebre y activa el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, a través de la unión a su receptor (IL-6R). IL-6 es una citocina proinflamatoria que participa en la maduración y la activación de los neutrófilos, maduración de los macrófagos, diferenciación de los linfocitos T citotóxicos y de las células asesinas naturales (NK) (Rose-John, 2018). La secreción de IL-6 está regulada por varios factores como: hormonas, dieta, actividad física, estrés, hipoxia, etc. (Eder *et al.*, 2009).

También IL-6, es secretada por el tejido adiposo e induce la producción hepática de proteína C reactiva, por lo cual las concentraciones de IL-6 y la proteína C reactiva deberían ser altas en la obesidad (Scudiero *et al.*, 2019). Ha sido demostrado que, en la inflamación de bajo grado, se observa un aumento de IL-6 en personas adultas obesas, mientras que la proteína C reactiva se correlaciona positivamente con la obesidad en niños y adultos (Eder *et al.*, 2009).

Interleucina-10 (IL-10)

IL-10 es un polipéptido de aproximadamente 18 kDa, es secretado por diversas células inmunológicas, tejidos neuroendocrinos y neurales, entre otras. El receptor de IL-10 (IL-10R) pertenece a la familia de receptores de citocinas de clase II, similar a los receptores para interferones (Oliveira *et al.*, 2011). IL-10 es producida en respuesta a señales proinflamatorias por las células inmunes, incluidas las células T, las células B, los macrófagos y las células dendríticas. La producción de IL-10 es regulada por muchas citocinas, como IL-4, IL-13 e IFN γ , incluyendo la misma IL-10. IL-10 inhibe la activación de macrófagos y monocitos, los cuales secretan citocinas proinflamatorias, principalmente TNF α , IL-1 e IL-6; estimulando la producción endógena de citocinas antiinflamatorias (Rutz y Ouyang, 2016).

IL-10 inhibe la actividad de las células Th1, lo cual puede ser clínicamente útil para tratar enfermedades autoinmunes mediadas por células-T, como la esclerosis múltiple y la diabetes (De Oliveira *et al.*, 2011). En la obesidad se produce un estado de inflamación en el tejido adiposo, este proceso implica hipertrofia de adipocitos e infiltración del tejido adiposo por macrófagos de predominio proinflamatorio, esto provoca una disminución de adiponectina, IL-10, y secreción aumentada de adipocitocinas proinflamatorias, tales como TNF α , IL-6 y proteína C reactiva (Izaola *et al.*, 2015). La pérdida de expresión de IL-10 resulta en el desarrollo espontáneo de la enfermedad inflamatoria intestinal como consecuencia de una respuesta inmune excesiva a la microbiota intestinal (Rutz y Ouyang, 2016).

Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α)

TNF- α es una citocina proinflamatoria producida principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos T. TNF- α presenta dos isoformas: una transmembranal de 26 kDa y otra isoforma de 17 kDa que es secretada, ambas isoformas biológicamente activas (De Oliveira *et al.*, 2011). TNF α es un potente inductor del metabolismo muscular al estimular la lipólisis e inhibir la Lipoproteína lipasa. Otras acciones de TNF- α consisten en activar la coagulación, estimular la expresión o la liberación de moléculas de adhesión, y regular la apoptosis celular (De Oliveira *et al.*, 2011). La concentración elevada de TNF- α se ha señalado como un factor causal en el desarrollo de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad y la diabetes (Ross y Pawlina, 2015).

Papel de las citocinas en la obesidad

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa en respuesta a infecciones por patógenos. Las células que se activan después de la presentación del antígeno son monocitos y macrófago, células que promueven la liberación de IL-6 y TNF- α . Los linfocitos T cooperadores (Th2) que producen citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13, promueven la diferenciación de macrófagos (Scudiero *et al.*, 2019). Es entonces el microambiente adiposo una interacción constante entre los macrófagos y monocitos con linfocitos Th2 y las citocinas que secretan. A continuación, se describirá la participación que tiene IL-10, IL-6 y TNF- α en obesidad.

En el desarrollo de la obesidad, se presentan diversas alteraciones en la respuesta inmune (Figura 7), ya que se genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico y de bajo grado. La inflamación de bajo grado también está presente en otras enfermedades crónicas degenerativas promovidas por obesidad como Diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión, enfermedades cardiovasculares, generación a la resistencia de la insulina, etc. (Blancas-Flores *et al.*, 2010). Algunas de estas enfermedades podrían iniciar por una infiltración de linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, y macrófagos en el tejido adiposo de sujetos obesos. Por lo anterior, el aumento en el número y la función de las células inmunes que migran al tejido adiposo promueven la inflamación en la obesidad (Scudiero *et al.*, 2019).

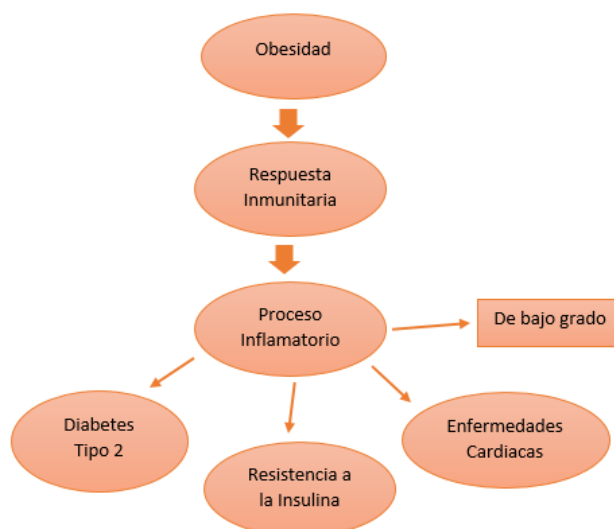


Figura 7. La obesidad se asocia en enfermedades crónico-degenerativas (Modificado de Blancas-Flores *et al.*, 2010).

En relación con lo anterior, se ha reportado que Grupos Linfoides Asociados a la Grasa (FALCs, por sus siglas en inglés) son tejidos linfoides asociados a adipocitos en mucosas. Además, se ha sugerido que la formación de los FALCs es parcialmente dependiente de la vía de señalización del receptor de TNF- α . Probablemente, la inflamación generada por LPS induce formación y expansión de los FALCs a través de TNF- α secretado por los macrófagos (Solís-Martínez *et al.*, 2016).

La hipoxia en el tejido adiposo, la muerte celular de los adipocitos periféricos, la angiogénesis y el aumento de proteínas de matriz extracelular producen una desregulación en la homeostasis debido al aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias principalmente IL-6 y TNF- α ; así como el descenso de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Izaola *et al.*, 2015). Las citocinas implicadas en la modulación de respuestas fisiológicas a cargo del tejido adiposo se denominan adipocitocinas. Leptina, adiponectina, TNF- α , IL-6, Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (MCP-1) e Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI-1) son algunas de las adipocitocinas más importantes (Izaola *et al.*, 2015). Se ha observado que, en el tejido adiposo de un individuo obeso, el incremento en la secreción de adipocitocinas proinflamatorias tales como Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF), Metaloproteinasas de Matriz (MMP-2 y MMP-9), IL-6, PAI-1, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y leptina están

incrementados de la hipoxia (Izaola *et al.*, 2015). Por otro lado, la adiponectina suprime la síntesis de TNF- α e IFN- γ (Izaola *et al.*, 2015).

Por otro lado, en la obesidad se genera una desregulación de las uniones estrechas de las células del epitelio intestinal, favoreciendo una translocación del LPS de las bacterias Gram negativas al torrente circulatorio. LPS se une a el Receptor *Toll tipo 4* (TLR4), promoviendo una sobreexpresión de TNF- α y como consecuencia activando la inflamación (Farías *et al.*, 2011). En relación con lo anterior, recientemente se reportó que la citocina proinflamatoria TNF- α aumenta en niños que presentan obesidad (Orbe-Orihuela *et al.*, 2018).

Entonces cuando en un individuo ocurre la inflamación crónica de bajo grado se ven expresadas ciertas citocinas en aumento y otras en disminución como: la IL-10 está en menor expresión en individuos obesos y esto provoca alteraciones en el perfil de monocitos, estas células pueden contribuir a favorecer la inflamación y la pérdida de regulación en la respuesta inmunitaria de los niños con obesidad (Mattos *et al.*, 2016). En un estudio realizado en individuos obesos y delgados pudieron observar que los neutrófilos del grupo obeso no pueden realizar señales coestimuladoras correctas y con esto se vio una mayor expresión de IL-6, IL-1 β , IL-12 y TNF- α , y una disminución de la expresión de IL-8 e IL-10 por los neutrófilos del grupo obeso en comparación con el grupo de peso normal, y solo TGF- β se expresa de manera equivalente en neutrófilos de ambos grupos (Medeiros *et al.*, 2018). En otro estudio realizado se pudo observar que en individuos de obesidad los biomarcadores resistina, MCP-1, TNF- α , IL-6 y Proteína C Reactiva fueron significativamente altos en sobrepeso/obesidad en comparación con el peso normal (Selvaraju *et al.*, 2019). Lo anterior sugiere la compleja interacción de las diversas moléculas que participan en el desarrollo del estado proinflamatorio de bajo grado.

3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema de Salud Pública a nivel mundial; y México no es la excepción. La obesidad en adultos ocupa el segundo lugar a nivel mundial y la obesidad infantil se encuentra entre los primeros 10 lugares. Diversos estudios han sugerido la importancia que tiene un desbalance de la microbiota (disbiosis) en el desarrollo del sobrepeso y la obesidad. La obesidad se ha asociado a la ingesta de una dieta no saludable potenciada por una disbiosis intestinal, la cual se caracteriza por una alteración en la abundancia de los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Además, la obesidad se caracteriza por un estado proinflamatorio promovido por diversas citocinas. Por lo anterior, en el presente proyecto se evaluó la potencial asociación entre la disbiosis intestinal y citocinas proinflamatorias. Los resultados aportaron evidencia científica para identificar factores que promueven obesidad.

4. HIPÓTESIS

El incremento en la abundancia relativa del filo Firmicutes se encuentra asociada a la expresión de citocinas proinflamatorias en la población infantil y adolescente con obesidad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la asociación en la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes con citocinas proinflamatorias en población infantil y adolescente con obesidad del Estado de Morelos.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes en la población infantil y adolescente con obesidad.
2. Determinar la concentración de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α) en la población de estudio.
3. Evaluar la asociación de la abundancia de Firmicutes y Bacteroidetes con los niveles de citocinas proinflamatorias en la población de estudio.

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

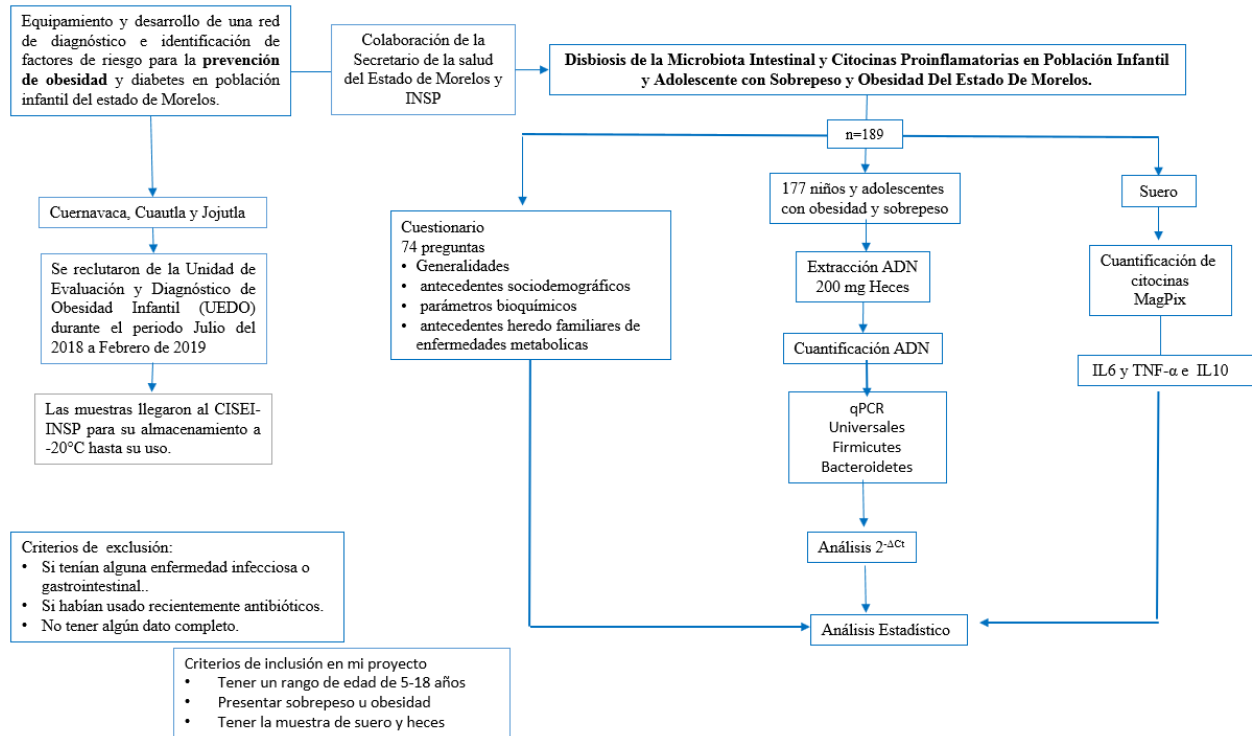


Figura 8. Diagrama Metodológico.

6.1 Población de estudio

Este proyecto de investigación está anidado al proyecto “Equipamiento y desarrollo de una red de diagnóstico e identificación de factores de riesgo para la prevención de obesidad y diabetes en población infantil del estado de Morelos”. Niños y adolescentes con obesidad fueron invitados a participar en este estudio a través de los Centros de Salud de las Jurisdicciones Sanitarias de Cuernavaca, Cuautla y Jojutla Morelos. Los niños y adolescentes que decidieron participar asistieron a la Unidad de Evaluación y Diagnóstico de Obesidad Infantil (UEDO) de los Servicios de Salud del Estado de Morelos durante el periodo julio del 2018 a febrero de 2019. El presente proyecto inició con una n=189 participantes entre los que se encuentran niños (0-4 años), niños en edad escolar (5-12 años), adolescentes (13-18 años), y adultos jóvenes (19-20 años). Debido a la potencial variabilidad biológica, se consideró trabajar solo con una n=175 participantes (5-18 años) con diagnóstico de obesidad y sobrepeso, de acuerdo con el puntaje Z de IMC por edad y sexo propuestas por la OMS con los individuos de (0-4 años) y (19-20 años) no se trabajó. Se solicitó a los participantes cumplir con ayuno de ocho horas previa a la cita en

la UEDO para la obtención de sangre, además, se realizó la entrega de una muestra de heces (200 mg) por parte de los participantes. Las pruebas de laboratorio que se realizaron fueron glucosa y perfil lipídico (triglicéridos, colesterol, HDL y LDL). También, se aplicó un cuestionario de 74 preguntas, generando una base de datos divididas en cuatro rubros (generalidades, antecedentes sociodemográficos, parámetros bioquímicos y antecedentes heredofamiliares de enfermedades metabólicas). La investigación se realizó apegada a la Declaración de Helsinki. Los padres de los participantes firmaron el consentimiento informado. Se excluyó a todo niño y adolescente con diagnóstico de alguna enfermedad infecciosa y gastrointestinal, y uso reciente de antibióticos (dos meses previos a la evaluación). El suero para la determinación de citocinas y la alícuota de heces para determinar la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes fueron trasladadas al laboratorio 2 del CISEI-INSP para su almacenamiento a -20°C hasta su uso.

6.2 Extracción de DNA de heces

Se realizó la extracción de DNA a partir de 200 mg de heces mediante el kit QIAmp® DNA Stool Mini kit for human (Qiagen). Posteriormente se realizó la cuantificación del DNA tomando en cuenta la relación 260/280 en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Saveen Werner ApS, Dinamarca). Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su posterior uso.

6.3 PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando 10 ng de DNA, 5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos, 5 μl de Máster Mix 2X SYBR® Green y agua para aforar a 10 μl . Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el equipo Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems, E.U.). La reacción de amplificación presentó una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 min; seguido de 40 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una fase de amplificación a 58°C durante 1 min (condición para los oligonucleótidos universales). Los oligonucleótidos universales, reconocen una región del gen ribosomal 16S de los diversos filos bacterianos. Además, se utilizaron oligonucleótidos específicos para los filos Firmicutes y Bacteroidetes (Tabla 1). Las reacciones se realizaron por duplicado y un control negativo fue incluido en cada

reacción. La abundancia relativa (AR) de Firmicutes y Bacteroidetes fue obtenida utilizando el método comparativo de $2^{-\Delta Ct}$ (Ct Bacteroidetes – Ct universales). El análisis se realizó de forma similar para el filo Firmicutes (Schmittgen y Livak, 2008).

Tabla 1. Características de oligonucleótidos a utilizar en la qPCR.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Concentración (pmol)	Tm (°C)	Tamaño de amplificación (pb)
Universal	F: AAACTCAAAGGAATTGACGG	5	58	180
	R: CTCACRRCACGAGCTGAC	7		
Firmicutes	F: TGAAACTYAAAGGAATTGACG	5	60	120
	R: ACCATGCACCACCTGTC	5		
Bacteroidetes	F: CRAACAGGATTAGATACCCT	5	59	130
	R: GGTAAGGTTCCCTCGCGTAT	5		

En la tabla se muestra la secuencia Forward o sentido (F) y Reverse o anti-sentido (R) de los oligonucleótidos; en la secuencia las letras K, R e Y significan que hay un nucleótido no identificado. En K puede estar presente G o T, R puede ser purinas A o G, Y representa a pirimidinas C o T. Además, se muestra la concentración que se utilizó para cada oligonucleótido, la temperatura de alineamiento y el tamaño del producto amplificado (De Gregoris *et al.*, 2011).

6.4 Determinación de citocinas

Las moléculas IL-10, IL-6, y TNF- α se determinaron utilizando el kit Human cytokine/chemokine Magnetic Bead panel, (HCYTMAG-60K-PX29) (Millipore) de acuerdo con las recomendaciones del distribuidor. Primeramente, se adicionaron 200 μ l del buffer de lavado en cada pozo de la placa y se selló, realizando una agitación (500-800 rpm) por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se decantó el buffer de lavado, se adicionaron 25 μ l de cada estándar y controles en los pozos correspondientes, y se agregaron a cada uno de ellos 25 μ l de la solución matriz buffer con características fisicoquímicas similares al suero. A continuación, se agregaron 25 μ l de la muestra de suero y un volumen igual del diluyente del ensayo a los pozos correspondientes. Posteriormente, se adicionaron a todos los pozos 25 μ l de suspensión de perlas magnéticas que contienen unidos los anticuerpos correspondientes para las citocinas a cuantificar. Se selló la placa e incubó a 4°C toda la noche en agitación constante (500-800

rpm). Después de 16 horas, se colocó la placa en la base magnética antes de realizar cada uno de los lavados. Se decantó el contenido del pozo y se lavó dos veces con 200 μ l del buffer de lavado. A continuación, se adicionaron 25 μ l de la suspensión de anticuerpos que detectan las citocinas a cada pozo, se selló la placa e incubo una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se adicionaron 25 μ l de la solución Ficoeritrina-Estreptavidina a los pozos previamente incubados con la suspensión de anticuerpos. Se selló nuevamente la placa e incubo 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Se colocó la placa en la base magnética antes de realizar cada uno de los lavados. Cuidadosamente, se decantó el contenido del pozo y se lavaron dos veces con el buffer de lavado. Se adicionaron 150 μ l de la solución de lavado del equipo MagPix a cada uno de los pozos y se incubo en agitación constante durante 5 minutos. Finalmente, se analizó la fluorescencia y se calculó la concentración de las citocinas utilizando el software xPONENT en el equipo MagPix (Merck-Millipore).

6.5 Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como medias (desviación estándar) para variables continuas y porcentajes para variables categóricas. Para evaluar la normalidad de las variables continuas se realizó la prueba de Shapiro Wilk. Se utilizó U de Mann-Whitney para comparar la distribución de las variables continuas y chi2 para variables categóricas. Se realizó una regresión logística para evaluar la asociación de la abundancia relativa (AR) de la microbiota y obesidad, utilizando como categoría de referencia a los niños con sobrepeso. Además, se evaluó la asociación entre citocinas e IMC (puntuaciones z del IMC) mediante regresión lineal; los modelos se ajustaron por edad, sexo, y antecedentes heredofamiliares de obesidad. Así mismo, mediante regresión lineal se analizó la asociación entre citocinas y filos bacterianos ajustados por edad, sexo e IMC (puntuaciones z de IMC). Para este modelo de asociación se transformó a logaritmo los datos de las citocinas, para cumplir con el supuesto de normalidad del modelo, para una mejor interpretación de los coeficientes de la regresión lineal se calculó el antilogaritmo. Se estableció un nivel de significancia de $p < 0.05$ para los resultados estadísticamente significativos. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico STATA versión 14.

7. RESULTADOS

7.1. Abundancia relativa de filo Firmicutes y Bacteroidetes

Para determinar la abundancia relativa de ambos filios bacterianos se realizó una PCR cuantitativa utilizando el fluoróforo de SYBR Green. La gráfica de amplificación de la Figura 9a corresponde a una imagen representativa de la amplificación de los tres oligonucleótidos analizados (Firmicutes, Bacteroidetes y Universales). El análisis de disociación de los productos generados de cada oligonucleótido muestra un solo pico, confirmando la amplificación de un solo producto y excluyendo la posibilidad de que la fluorescencia generada sea por productos inespecíficos (Figura 9b). Los resultados de la abundancia de los filios bacterianos fueron obtenidos a través de la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

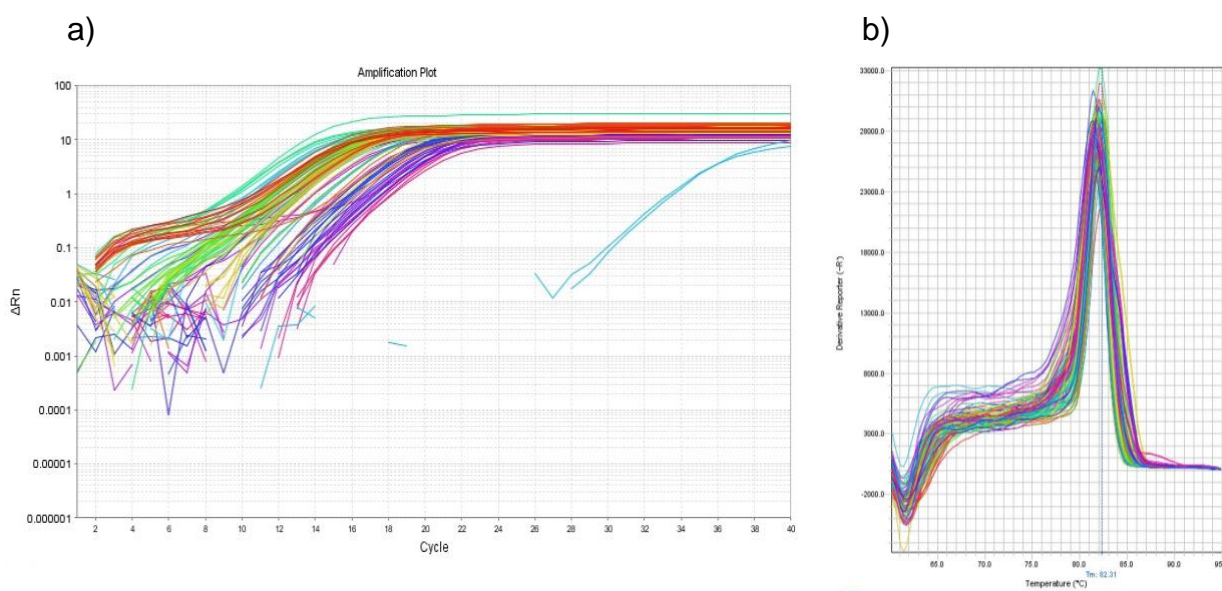


Figura 9. Grafica de amplificación y de disociación de productos amplificados. a) Imagen representativa de curva de amplificación utilizando los oligonucleótidos universales. b) Imagen representativa de curva de disociación de los productos generados con los oligonucleótidos universales.

7.2. Concentración de citocinas

Para identificar la concentración de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α en los grupos de sobrepeso y obesidad, se cuantificaron las citocinas en suero a través del sistema de detección MagPix. Los resultados muestran un aumento de IL-10 del 73% más en los individuos obesos comparado con los de sobrepeso. En el caso de IL-6, se observó un incremento del 82% más en obesidad comparado con sobrepeso y TNF- α mostró un aumento del 68% más en individuos obesos comparado con sobrepeso (Figura 10).

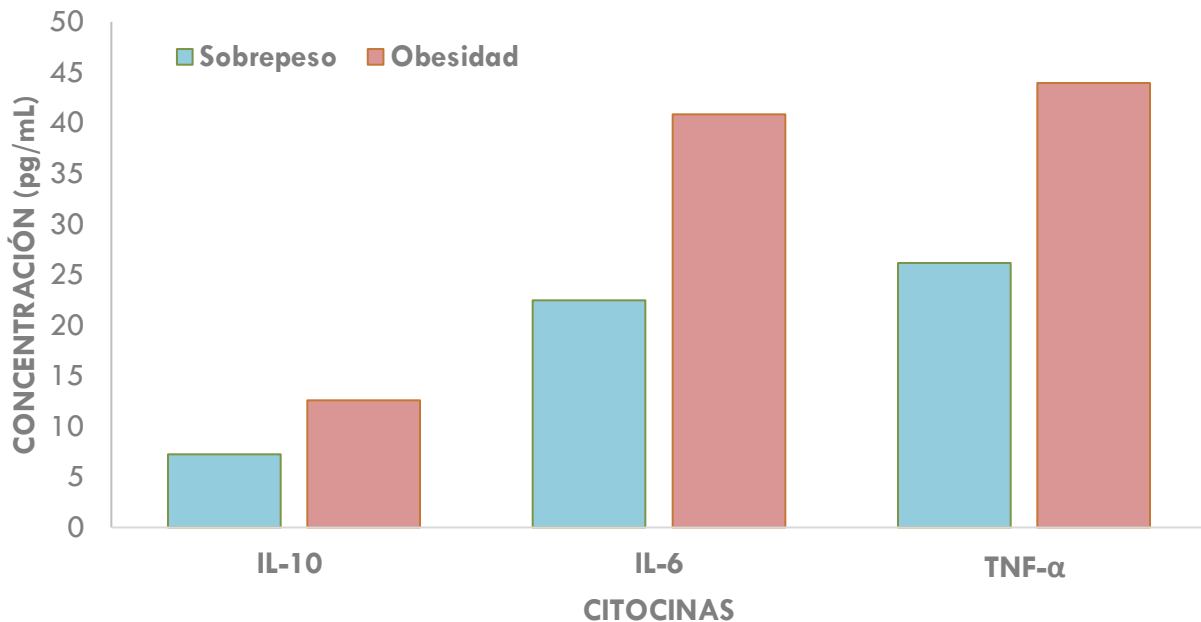


Figura 10. Distribución de la concentración de citocinas de acuerdo al grupo de sobrepeso y obesidad. La grafica muestra los resultados de las citocinas IL-10, IL-6 y TNF- α analizados en el equipo MagPix. Los resultados fueron analizados en el programa xPONEN. Las unidades de las citocinas se encuentran reportadas en pg/mL.

7.3. Características asociadas con la obesidad

En la tabla 2, se observa la distribución de las características generales de la población en estudio de acuerdo con el IMC estratificado en sobrepeso y obesidad. Se observa que del total de niños y adolescentes hay 23.43% clasificados en sobrepeso y 76.57% clasificados en obesidad. Los individuos con obesidad son de menor edad con una media de 11.24 (± 3.12), hay mayor porcentaje de hombres (77.3%), tienen mayor

circunferencia de cintura (91.88 ± 11.53), mayor concentración de IL-10 (12.56 pg/mL) y de TNF- α (43.99 pg/mL) en comparación con los niños con sobrepeso. La Presión Arterial Sistólica, glucosa, colesterol, triglicéridos, cVLDL (colesterol de muy baja densidad), cLDL (colesterol de baja densidad), IL-6 y AR Firmicutes presentaron valores más elevados en el grupo de obesidad, sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente significativos (Tabla 2). En el caso de esta tesis no se busca reportar un resultado de Bioquímica clínica; en el enfoque de este estudio se realizó una comparación entre las medias de los grupos de normopeso *versus* sobrepeso/obesidad con la finalidad de encontrar diferencias entre ambos grupos y las diferentes variables. Sin embargo, para términos de una mejor comprensión de los resultados, se incluyó en la tabla los valores de referencia de los parámetros bioquímicos y de presión arterial.

Tabla 2. Características generales de la población, de acuerdo con el IMC.

	Valores de referencia	Sobrepeso, n=41 (+1 a +2 S.D) (23.43%) Mean (S.D)	Obesidad, n=134 (>2 S.D) (76.57%) Mean (S.D)	p-value
Edad (años)		14.09 (2.81)	11.24 (3.12)	<0.0001
Sexo (%)				
Hombre		23.7%	77.3%	0.002
Mujer		43.7%	56.7%	
Circunferencia de cintura (cm)		78.95 (6.81)	91.88 (11.53)	0.0001
Circunferencia de cadera (cm)		94.20 (7.84)	96.52 (14.14)	0.27
Presión arterial diastólica (mmHg)	60-75 mmHg (6-12 años) * 65-85 mmHg (+12 años) *	80.24 (10.73)	80.07 (10.39)	0.84
Presión arterial sistólica (mmHg)	100-120 mmHg (6-12 años) * 110-135 mmHg (+12 años) *	111.14 (8.79)	117.91 (49.44)	0.11
Glucosa (mg/dL)	<110 mg/dl*	90.32 (7.51)	92.66 (7.77)	0.09
Colesterol (mg/dL)	<170 mg/dl*	149.62 (30.32)	153.25 (31.14)	0.70
Triglicéridos (mg/dL)	<75 mg/dl (0-9 años) * <90 mg/dl (10-19 años) *	132.78 (77.24)	144.87 (81.50)	0.18
cVLDL (mg/dL)	Sin valor de referencia	26.80 (13.94)	28.44 (14.25)	0.73
cLDL (mg/dL)	<110 mg/dl*	86.08 (25.94)	96.24 (24.72)	0.17
cHDL (mg/dL)	>45 mg/dl*	41.33 (7.85)	41.46 (8.62)	0.99
Antecedentes heredofamiliares obesidad (%)				
No		31.5%	68.5%	0.006
Si		11.48%	88.52%	
IL-10 (pg/mL)		7.25 (7.72)	12.56 (17.36)	0.03
IL-6 (pg/mL)		22.48 (59.80)	40.84 (74.86)	0.13
TNF- α (pg/mL)		26.18 (17.62)	43.99 (23.71)	<0.001
AR Firmicutes		0.79 (0.58)	0.93 (1.39)	0.23
AR Bacteroidetes		1.00 (1.80)	1.02 (2.55)	0.61

Resultados expresados como medias (desviación estándar) para variables continuas y porcentajes para variables categóricas. Se utilizó U Mann-Whitney para variables continuas, chi² para variables categóricas. Valor significativo p \leq 0.05. cVLDL: colesterol de muy baja densidad; cLDL: colesterol de baja densidad; cHDL: colesterol de alta densidad. * Información obtenida de Kliegman *et al.*, 2020

Para evaluar la asociación de AR de Firmicutes y Bacteroidetes con el grado de obesidad, se realizó un modelo de regresión logística múltiple ajustado por edad, sexo y antecedentes de obesidad. Los resultados sugieren que por cada unidad de abundancia de Firmicutes hay un incremento de un 19% de posibilidad de desarrollo de obesidad comparado con los que tienen sobrepeso. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativas ($p=0.46$) (Tabla 3).

Tabla 3. Asociación de abundancia relativa de filos de microbiota intestinal y obesidad.

	OR (IC95%)	<i>p-value</i>
AR Firmicutes	1.19 (0.74-1.92)	0.46
AR Bacteroidetes	1.05 (0.88-1.6)	0.56

OR: odds ratio (razón de momios, prueba que representa la probabilidad de ocurrencia de un evento) IC: intervalo de confianza, AR: abundancia relativa. Regresión logística ajustada por edad, sexo y antecedentes de obesidad. Categoría de referencia sobrepeso. Valor significativo $p \leq 0.05$.

Diversos trabajos han mostrado una asociación de diversas citocinas con obesidad (Mattos *et al.*, 2016; Orbe-Orihuela *et al.*, 2018), por lo que en este trabajo se analizó la potencial asociación de las citocinas IL-10, IL-6 y TNF- α con obesidad en la población de estudio. Se realizó un análisis de regresión lineal ajustado por edad, sexo y antecedentes de obesidad; sin embargo, no se encontró una asociación significativa de las citocinas con IMC (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación de citocinas de acuerdo con el IMC.

	β (IC95%)	p
IL-10 (pg/mL)	0.000045 (-0.011; 0.011)	0.993
IL-6 (pg/mL)	-0.0006 (-0.003; 0.0014)	0.82
TNF- α (pg/mL)	0.000003 (-0.007; 0.007)	0.99

β : Beta IC: intervalo de confianza. Regresión lineal ajustada por edad, sexo y antecedentes de obesidad. Categoría de referencia sobrepeso. Valor significativo $p \leq 0.05$

Finalmente, se evaluó la asociación de la AR de los filos bacterianos con las concentraciones (pg/mL) de citocinas (IL-10, IL-6 y TNF- α) mediante modelos ajustado por edad, sexo e IMC. Se observó una asociación positiva entre la abundancia relativa de Firmicutes y la citocina IL-10, lo cual nos indica que por cada incremento de unidad de AR

de Firmicutes hay un incremento promedio del 28% de la concentración (pg/mL) de IL-10 ($p=0.037$). Además, se observó una asociación negativa entre la abundancia relativa de Bacteroidetes y la citocina TNF- α que nos indica que por cada incremento de unidad de AR de Bacteroidetes hay una disminución promedio del 36% de la concentración (pg/mL) de TNF- α (Tabla 5). La comparación de la concentración de IL-6 con la AR de los filos bacterianos no presentó asociación.

Tabla 5. Asociación entre citocinas y AR de los filos bacterianos.

	IL-10		
	β	IC95%	p
Bacteroidetes	0.88	0.41-1.88	0.75
Firmicutes	1.28	1.05.-1.60	0.037
	IL-6		
	β	IC95%	p
Bacteroidetes	0.60	0.29-1.20	0.12
Firmicutes	1.20	0.95-1.46	0.14
	TNF-α		
	β	IC95%	p
Bacteroidetes	0.64	0.46-0.88	0.006
Firmicutes	1.0	0.89-1.09	0.78

Regresión lineal, ajustado por edad, sexo y z-IMC. Valor significativo $p \leq 0.05$.

8. DISCUSIÓN

La microbiota intestinal promueve múltiples beneficios en nuestra salud a través de la obtención de energía de carbohidratos complejos, síntesis de vitaminas esenciales y regulación de la repuesta inmune (Mena-Miranda, 2019). Sin embargo, la pérdida de la homeostasis intestinal podría promover un desequilibrio en la diversidad de la microbiota, generando disbiosis y como consecuencia un potencial desarrollo de sobrepeso y obesidad. En este estudio, se evaluó la relación de los filos bacterianos de la microbiota intestinal Firmicutes y Bacteroidetes con citocinas en niños con sobrepeso y obesidad. Los resultados muestran que los niños con obesidad presentan mayor circunferencia de cintura y expresión de las citocinas IL-10 y TNF- α (Tabla 2). Estos hallazgos han sido previamente reportados por otros grupos de investigación (Mattos *et al.*, 2016; Medeiros *et al.*, 2018; Orbe-Orihuela *et al.*, 2018; Aguilar *et al.*, 2020).

La microbiota intestinal es de gran interés en los estudios relacionados con obesidad. Turnbaugh y colaboradores describió por primera vez un incremento en la abundancia del filo Firmicutes en la microbiota intestinal de ratones obesos (Turnbaugh *et al.*, 2006), posterior a este trabajo se han replicado múltiples estudios en muestras de heces de humanos, encontrado un aumento del filo Firmicutes y una disminución del filo Bacteroidetes en individuos con obesidad (Estrada-Velasco *et al.* 2015; Murugesan *et al.*, 2015; Riva *et al.*, 2017; Orbe-Orihuela *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en este proyecto muestran un incremento del filo Firmicutes en niños y adolescentes con obesidad; sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo. Una potencial explicación de la discrepancia en los resultados podría ser que en los trabajos antes mencionados la categoría de referencia son individuos con normopeso, y en este estudio son individuos con sobrepeso. Además, el tamaño de muestra de nuestro este estudio podría ser una limitación (Tabla 2).

Orbe-Orihuela y colaboradores en el 2018 observaron un aumento significativo de la abundancia relativa (AR) de Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes en niños con sobrepeso/obesidad en comparación con niños con normopeso. Estrada-Velasco y colaboradores en el 2015 encontraron que una abundancia relativa alta de Firmicutes presenta 2 veces más de probabilidad de presentar sobrepeso u obesidad. Los resultados

sugieren que por cada unidad de abundancia de Firmicutes incrementa un 19% la probabilidad de desarrollar obesidad comparado con los que tienen sobrepeso. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($p=0.46$) (Tabla 3). A pesar de no tener significancia estadística, los resultados muestran una tendencia de asociación del filo Firmicutes con obesidad. En un estudio de Italia con un tamaño de muestras menor al proyecto, lo que hicieron fue caracterizar la composición de la microbiota intestinal en niños obesos, por lo cual la obesidad se asoció con una microbiota intestinal alterada caracterizada por niveles elevados de Firmicutes y niveles reducidos de Bacteroidetes, razón por la cual pudieron tener resultados estadísticamente significativos fue porque el grupo de referencia era de normopeso, por lo cual hay una diferencia entre la microbiota intestinal en individuos con normopeso que individuos con obesidad (Riva *et al.*, 2017).

Por otro lado, resultados similares a los nuestros han sido reportados por López-Contreras y colaboradores; en este trabajo los autores no observaron diferencias significativas en la abundancia del filo Firmicutes entre los niños con peso normal y los niños que presentan obesidad por lo cual, los autores realizaron un análisis a nivel de especies y observaron que la AR de *Bacteroides eggerthii* fue significativamente mayor en niños con obesidad. La abundancia de esta especie presentó una correlación positivamente con el porcentaje de grasa corporal y una correlación negativamente con la ingesta de fibra insoluble. Además, la AR de *Bacteroides plebeius* fue significativamente más alta en los niños con normopeso (López-Contreras *et al.*, 2018).

Resultados similares a López-Contreras en el 2018 y este trabajo han sido reportados, en los cuales no hay diferencias estadísticamente significativas a nivel de filo bacteriano, pero ellos si encontraron diferencias a nivel de género y especie (Hollister *et al.*, 2018). Por lo anterior, es probable que este proyecto de tesis diferencias entre los grupos de sobrepeso y obesidad sean encontrados a nivel de género y especie.

En la obesidad se ha reportado un proceso de inflamación de bajo grado (Orbe-Orihuela *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2018), caracterizado por un desbalance en los niveles de citocinas, principalmente un incremento en citocinas proinflamatorias (Kindt y Goldsby, 2007). Al respecto, se ha observado en niños con obesidad un aumento de

citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α (Orbe-Orihuela *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2018, Selvaraju *et al.*, 2019) y una disminución de IL-10 (Mattos *et al.*, 2016; Aguilar *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos de esta tesis mostraron altos niveles de la concentración de citocinas IL-10 y TNF- α en individuos obesos.

Además de TNF- α , IL-6 y IL-10, se han estudiado otras citocinas potencialmente relacionadas con obesidad, como IL-1 β , IL-12, IL-8, TGF- β , proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), Proteína C reactiva (Medeiros *et al.*, 2018, Selvaraju *et al.*, 2019; Mattos *et al.*, 2016) entre otras. Sin embargo, en los diferentes trabajos reportados frecuentemente se ha encontrado una asociación de IL-10, IL-6 y TNF- α con obesidad, por lo cual se analizaron en este proyecto.

Diversos reportes han encontrado una asociación filotaxiónomica de la microbiota intestinal con citocinas. Específicamente, se ha encontrado que la citocina TNF- α se asocia negativamente e IL-10 se asocia positivamente con las familias *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae* y *Prevotellaceae* (Aguilar *et al.*, 2020). Orbe-Orihuela y colaboradores, reportaron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre la concentración de TNF- α con el IMC en la AR más alta de Firmicutes y la AR baja de Bacteroidetes.

Similar a lo antes mencionado, nuestros resultados también mostraron una asociación negativa entre la abundancia relativa Bacteroidetes (uno de los filos predominantes de la microbiota) con la citocina TNF- α . Además, se observó una asociación positiva entre la AR de Firmicutes y la citocina IL-10. Además, también se observaron que estos hallazgos sugieren una asociación del filo Firmicutes con el aumento de la concentración de IL-10 y Bacteroidetes con disminución de TNF- α .

9. CONCLUSIONES

En este presente proyecto con las muestras de los niños con obesidad del estado de Morelos se pretendió observar la asociación de la microbiota intestinal con la obesidad. Por lo cual se determinó la AR de los filos y la concentración de las citocinas y así poder evaluar su asociación y con esto se observó que la concentración de IL-6 y AR Firmicutes fueron elevados en el grupo de obesidad, pero no estadísticamente significativos. Los niveles de las citocinas IL-10 y TNF- α , fueron elevados y estadísticamente significativos, con lo cual podemos ver que hay una relación citocinas en individuos obesos que demuestra un estado proinflamatorio.

El filo Firmicutes tiene 19% de probabilidad de desarrollar obesidad. Los niños con obesidad del estado de Morelos presentaron una asociación del filo Firmicutes con el aumento de IL-10 y de Bacteroidetes con niveles más bajos de TNF- α sugiriendo una potencial Disbiosis Intestinal y un estado proinflamatorio en esta población, con esto podemos decir que la microbiota intestinal es un factor íntimamente relacionado con el desarrollo de obesidad. Diversos factores promueven disbiosis intestinal bacteriana promoviendo una inflamación crónica de bajo grado a través de un incremento de citocinas proinflamatorias.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la potencial asociación de la microbiota intestinal y citocinas en nuestra población de estudio realizando dos evaluaciones una en grupos de 2-12 años y un grupo de adolescentes de 13-20 años para determinar la potencial variabilidad biológica.
- Determinar la potencial asociación de la abundancia relativa de especies bacterianas que hayan sido previamente identificadas con protección o promoción de la obesidad (por ejemplo: *Bacteroides fragilis* y *Lactobacillus reuteri*).
- Debido a que se tiene información de la frecuencia del consumo de alimentos, que no fueron evaluados en este proyecto de tesis por limitaciones de tiempo, se

sugiere evaluar la potencial asociación de la dieta con las AR de los filos bacterianos y citocinas con obesidad y así poder implementar una dieta adecuada para la población.

- Analizar otras citocinas que han sido relacionadas con obesidad, pero poco estudiadas (IL-1 β , IL-12 e IL-8).

11. LIMITACIONES

- Se tuvo una (n) pequeña a comparación de otros estudios; sin embargo, los resultados de algunas variables fueron estadísticamente significativos.
- El grupo de referencia no fue normopeso. A pesar de lo anterior, utilizando el grupo de sobrepeso como referencia se obtuvieron tendencias de gran importancia biológica en la obesidad.

12. AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios por permitirme realizar mis estudios de licenciatura y poder culminar los mismo. A la universidad Autónoma del Estado de Morelos que me dio la oportunidad de convertirme en una profesionista y poder adquirir conocimientos con los cuales yo pude terminar la licenciatura. De igual manera agradezco al Instituto Nacional de Salud Pública y al equipo de Laboratorio 2 de plata baja del CEIB por su apoyo y permitirme realizar mi proyecto de tesis con el cual me título de mi licenciatura. Agradezco grandemente al Dr. Alfredo Lagunas Martínez por permitir conocernos y trabajar juntos en el proyecto, por su apoyo, conocimiento y consejos que me dio y a cada una de mis sinodales por el apoyo y de igual manera los consejos para poder terminar mi proyecto. Por último, doy gracias a mi familia que siempre me apoyo y me dio ánimos para seguir adelante y así terminar un ciclo en mi vida profesional.

13. LITERATURA CONSULTADA

- Aguilar T, Nava G.M., Olvera-Ramírez A.M., Ronquillo D., Camacho M., Zavala G.A., Caamaño M.C., Acevedo-Whitehouse K., Rosado J.L. y García O.P. (2020). Gut Bacterial Families Are Associated with Body Composition and Metabolic Risk Markers in School-Aged Children in Rural Mexico. *Childhood Obesity*. 16(5):358-366. [doi: 10.1089/chi.2019.0312](https://doi.org/10.1089/chi.2019.0312).
- Blancas-Flores G., Almanza-Pérez J. C., López-Roa R. I., Alarcón-Aguilar F. J., García-Macedo R. y Cruz M. (2010). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 67 (pp.88-97).
- Cani. P. D. (2013). Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. *Briefings In Functional Genomics*. 12(4): 381-387. [doi:10.1093/bfgp/elt014](https://doi.org/10.1093/bfgp/elt014)
- Castañeda Guillot C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*. 90(1): 94-110.
- Corona-Cervantes K., García-González I., Villalobos-Flores L.E., Hernández-Quiroz F., Piña-Escobedo A., Hoyo- Vadillo C., Rangel-Calvillo M.N. y García-Mena J. (2020). Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns. *PeerJ* 8:e9205 <http://doi.org/10.7717/peerj.9205>
- Corro A. C., Matheus N. y Medina C. E. (2016). Microbiota intestinal y su relación con trastornos metabólicos. *Revista Venezolana de Salud Pública*. 4(2): 41-44.
- Da Silva C.C., Monteil M.A., Davis E.M. (2020). Overweight and Obesity in Children Are Associated with an Abundance of Firmicutes and Reduction of Bifidobacterium in Their Gastrointestinal Microbiota. *Children Obesity*. 16(3): 204-210. [doi: 10.1089/chi.2019.0280](https://doi.org/10.1089/chi.2019.0280)
- De Gregoris T.B., Aldred N., Clare A.S. y Burgess J.G., (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods*. 86(3): 351-356. [doi:10.1016/j.mimet.2011.06.010](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010)
- De Lucas Moreno B., González Soltero R., Bressa C., Bailén M. y Larrosa M. (2019). Modulación a través del estilo de vida de la microbiota intestinal. *Nutrición Hospitalaria* 36(3): 35-39. DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02805>
- De Oliveira C. M. B., Sakata R. K., Issy A. M., Gerola L. R. y Salomão R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Bras Anestesiol*. 61(2): 137-142.
- Derrien M., Alvarez A.S. y de Vos W.M. (2019). The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* Vol. xx, No. xx. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>

- Donaldson G. P., Melanie Lee S. y Mazmanian S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. [doi:10.1038/nrmicro3552](https://doi.org/10.1038/nrmicro3552).
- Eder K., Baffy N., Falus N. A. y Fulop A. K. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation Research* 58(727). <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0060-4>
- Estrada-Velasco B. I., Cruz M., García-Mena J., Valladares Salgado A. Peralta Romero J., Guna Serrano M.R., Madrid-Marina V., Orbe Orihuela C. López Islas C. y Burguete-García A. I. (2015). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre Firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutrición Hospitalaria*. 31(3):1074-1081. [DOI:10.3305/nh.2015.31.3.8302](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8302)
- Farías, M. M., Silva, C., Rozowski, J. (2011). Microbiota Intestinal: Rol En Obesidad. *Revista de Nutrición para niños* 38(2): 228-233.
- Gao X., Jia R., Xie L., Kuang L., Feng L. y Wan C. (2018). A study of the correlation between obesity and intestinal flora in school-age children. *Scientific Reports* 8:14511 [DOI:10.1038/s41598-018-32730-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-32730-6)
- García-Mantrana I., Selma-Royo M., González S., Parra-Llorca A., Martínez-Costa C. y Collado M.C. (2020). Distinct maternal microbiota clusters are associated with diet during pregnancy: impact on neonatal microbiota and infant growth during the first 18 months of life. *Gut Microbes*. [DOI: 10.1080/19490976.2020.1730294](https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1730294)
- Gómez-Gallego C., García-Mantrana I., Martínez-Costa C., Salminen S., Isolauri E., Collado M. C. (2019). The Microbiota and Malnutrition: Impact of Nutritional Status During Early Life. *Annu Rev Nutr*. 29(39): 267-290. [Doi: 10.1146/annurev-nutr-082117-051716](https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051716).
- González S., Gutiérrez-Díaz I., López P., Suárez A., Fernández-Navarro T., Sánchez B. y Margolles A. (2017). Microbiota and oxidant-antioxidant balance in systemic lupus erythematosus. *Nutr Hosp*. 34(4): 935-941. [Doi: http://dx.doi.org/10.20960/nh.546](http://dx.doi.org/10.20960/nh.546)
- Grice E. A y Segre J. A (2012). The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 13: 151–170. [Doi:10.1146/annurev-genom-090711-163814](https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814).
- Hollister, E. B., Foster, B. A., Dahdouli, M., Ramirez, J. y Lai, Z. (2018). Characterization of the Stool Microbiome in Hispanic Preschool Children by Weight Status and Time. *Childhood obesity (Print)*, 14(2), 122–130. <https://doi.org/10.1089/chi.2017.0122>
- Huerta-Ávila E.E., Ramírez-Silva I., Torres-Sánchez L.E., Díaz-Benítez C.E., Orbe-Orihuela Y.C., Lagunas-Martínez A., Galván-Portillo M., Flores M., Cruz M. y Burguete-García A.I. (2019). High Relative Abundance of *Lactobacillus reuteri* and Fructose Intake are Associated with

Adiposity and Cardiometabolic Risk Factors in Children from Mexico City. *Nutrients* 11(6)
[doi: 10.3390/nu11061207](https://doi.org/10.3390/nu11061207).

Hunt K. M., Foster J. A., Forney L. J., Schütte U. M., Beck D. L., Abdo Z., Fox L. K., Williams J. E., McGuire M. K., y McGuire M. A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one*, 6(6), e21313.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021313>

Icaza-Chávez M.E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 78(4): 240-248.

Izaola O., De Luis D., Sajoux I., Domingo J. C y Vidal M. (2015). Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutrición hospitalaria*. 31(6): 2352-2358.
[DOI:10.3305/nh.2015.31.6.8829](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829)

Kindt T.J., Goldsby R. A. y Osborne B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. Capítulo 1: Panorama general del sistema inmunitario (pp.1-20) 6ª Edición. McGRAW-HILL Interamericana Editores.

Kliegman Robert M., Geme III Joseph W. St., Blum Nathan J., Shah Samir S., Tasker Robert C. y Wilson Karen M. (2020). *Nelson tratado de pediatría*. Capítulo 60: Sobrepeso y Obesidad; tabla 60.4 “Valores normales de laboratorio de las pruebas recomendadas” pg. 353. Capítulo 81: Emergencia y reanimación pediátrica; tabla 81.1 “Constantes vitales normales según la edad” pg. 530. Edición 21.ª Elsevier España

Koleva P.T., Bridgman S.L. y Kozyrskyj A.L. (2015). The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients*. 7(4): 2237-2260. [Doi:10.3390/nu7042237](https://doi.org/10.3390/nu7042237).

Korpela K. y De Vos W.M. (2016). Antibiotic use in childhood alters the gut microbiota and predisposes to overweight. *Microbial cell*. 3(7): 296–298. [Doi: 10.15698/mic2016.07.514](https://doi.org/10.15698/mic2016.07.514)

Lagier J. C., Dubourg G., Million M., Cadoret F., Bilen M., Fenollar F., Levasseur A., Rolain J. M., Fournier P. F. y Raoult D. (2018). Culturing the human microbiota and Culturomics. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0041-0>

López-Contreras B.E., Morán-Ramos S., Villarruel-Vázquez R., Macías-Kauffer L., Villamil-Ramírez H., León-Mimila P., Vega-Badillo J., Sánchez-Muñoz F., Llanos-Moreno L.E., Canizalez-Román A., Del Río-Navarro B., Ibarra-González I., Vela-Amieva M., Villarreal-Molina T., Ochoa-Leyva A., Aguilar-Salinas C.A. y Canizales-Quinteros S. (2018). Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatric Obesity*. 13(6):381-388. [Doi: 10.1111/ijpo.12262](https://doi.org/10.1111/ijpo.12262).

- Mattos R. T., Medeiros, N. I., Menezes C. A., Fares, R. C., Franco E. P., Dutra, W. O., Rios-Santos F., Correa-Oliveira, R. y Gomes, J. A. (2016). Chronic Low-Grade Inflammation in Childhood Obesity Is Associated with Decreased IL-10 Expression by Monocyte Subsets. *PloS one*, 11(12), e0168610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168610>
- Medeiros N.I., Mattos R.T., Menezes C.A., Fares R. C.G., Talvani A., Dultra W. O., Rios-Santos F., Correa-Oliveira R. y Gomes J.A.S (2018). IL-10 and TGF- β unbalanced levels in neutrophils contribute to increase inflammatory cytokine expression in childhood obesity. *European Journal of Nutrition* 57, 2421–2430 <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1515-y>
- Mena-Miranda V. R. (2019). Relación entre microbiota intestinal, epigenética y exposoma en la salud materno infantil. *Revista Cubana de Pediatría*. 91(2)
- Mercado, P. y Vilchis, G. (2013) La obesidad infantil en México. *Alternativas en Psicología*. Revista Semestral. Tercera Época. Año XVII. Núm. 28 (pp. 49-56).
- Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes S., Mancabelli L., Lugli G. A., Rodríguez J. M., Bode, L., de Vos W., Gueimonde M., Margolles A., van Sinderen D., y Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 81(4), e00036-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>.
- Miranda V.P.N., Dos Santos Amorim P.R, Bastos R.R., Rodrigues de Faria E., Castro Moreira M.E., Castro Franceschini S.C., Gouveia Peluzio M.C., Fortes Ferreira M.C.F., Priore S.E. (2019). Abundance of Gut Microbiota, Concentration of Short-Chain Fatty Acids, and Inflammatory Markers Associated with Elevated Body Fat, Overweight, and Obesity in Female Adolescents. *Mediators Inflamm*. [doi:10.1155/2019/7346863](https://doi.org/10.1155/2019/7346863)
- Moreira Ochoa D. C., Rodríguez Ortiz V. P., Mera Cedeño J. P., Medranda Zambrano R. G., Medranda Ortiz F.J. y Avendaño Alonzo G. C. (2018). Factores de Riesgo más relevantes en el aumento de obesidad infantil. *Revista de investigación actualización del mundo de las ciencias*. 2(4):24-40. [DOI: 10.26820/reciamuc/2.\(4\).diciembre.2018.24-40](https://doi.org/10.26820/reciamuc/2.(4).diciembre.2018.24-40)
- Mueller N.T. (2015). The Gut Microbiome and Childhood Obesity: Connecting the Dots. *Child Obesity* 11(3):227-30. <https://doi.org/10.1089/chi.2015.29000.nm>
- Muñoz Muñoz F. L. y Arango Álzate C. (2017). Obesidad infantil: un nuevo enfoque para su estudio. *Salud Uninorte*. Barranquilla 33(3): 492-503.

- Murugesan S., Ulloa-Martínez M., Martínez-Rojano H., Galván-Rodríguez F.M., Miranda-Brito C. Romano M.C., Piña-Escobedo A., Pizano-Zárate M. L., Hoyo-Vadillo C. y García-Mena J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Vol. 34 (pp.1337–1346) [DOI 10.1007/s10096-015-2355-4](https://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4)
- OECD (2019). *The Heavy Burden of Obesity: The Economics of Prevention*, OECD Health Policy Studies, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/67450d67-en>.
- Orbe-Orihuela Y.C., Lagunas-Martínez A., Bahena-Román M., Madrid-Marina V., Torres-Poveda K., Flores-Alfaro E., Méndez-Padrón A., Díaz-Benítez C.E., Peralta-Zaragoza O., Antúnez-Ortiz D., Cruz M. y Burguete-García A.I. (2018). High relative abundance of Firmicutes and increased TNF- α levels correlate with obesity in children. *Salud Pública Mex.* 60(1): 5-11. [doi: 10.21149/8133](https://doi.org/10.21149/8133)
- Pérez-Herrera A. y Cruz López M. (2018) Situación actual de la obesidad infantil en México. *Nutrición Hospitalaria.* 36 (2):463-469. [DOI: http://dx.doi.org/10.20960/nh.2116](http://dx.doi.org/10.20960/nh.2116).
- Polanco Allué I. (2015). Microbiota y enfermedades gastrointestinales. *An Pediatría (Barc).* 86 (6): 443e1-443e5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.07.034>
- Riva, A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., Borghi, E. y Berry, D. (2017). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environmental Microbiology.* 19(1), 95–105. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13463>
- Robles-Alonso V. y Guarner F. (2013). Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutrición Hospitalaria.* 28(3): 553-557.
- Rodrigo-Cano, S., Soriano del Castillo, J. M., Merino-Torres, J. F. (2017) Causas y tratamiento de la obesidad. *Nutrición clínica, dietética y hospitalaria.* 37(4): 87-92. [DOI: 10.12873/374rodrigo](https://doi.org/10.12873/374rodrigo)
- Rodríguez J. M., Murphy K., Stanton C., Ross R. P., Kober O. I., Juge N., Avershina E., Rudi K., Narbad A., Jenmalm M. C., Marchesi J. R., y Collado M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>.
- Rose-John S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Perspectivas de Cold Spring Harbor en biología* 10 (2), a028415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>

- Ross M.H. y Pawlina W. (2015). *Histología Texto y Atlas. Correlaciones con biología celular y molecular*. Capítulo 9 Tejido Adiposo (pp.275-285). 7° edición publicada por Wolters Kluwer.
- Rutz S. y Ouyang W. (2016). Regulation of Interleukin-10 Expression. In: Ma X. (Eds.) *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 941. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_5
- Selvaraju V., Babu J. R. y Geetha T. (2019). Association of salivary C-reactive protein with the obesity measures and markers in children. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 12, 1239–1247. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S211624>
- Schmittgen, T.D. y Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Scudiero O., Pero R. Ranieri A., Terracciano D., Fimiani F., Cesaro A., Gentile L., Leggiero E., Laneri S., Moscarella E., Mazzaccara C., Frisso G., D’Alicandro G., Limongelli G., Pastore L., Calabrò P., y Lombardo B. (2019). Childhood obesity: an overview of laboratory medicine, exercise and microbiome. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0789>
- Shamah-Levy T., (2021). Directora del CIEE, mostró por primera vez datos de la ENSANUT 2020 en relación con el sobrepeso y la obesidad en México. En el día Mundial de la Obesidad publicados en el INSP [Instituto Nacional de Salud Pública de México - Publicaciones | Facebook](https://www.facebook.com/instituto.nacional.saludpublica)
- Shin, J., Lee, S., Go, M.J., Lee S.J. Kim S. C., Lee. C.H. y Cho B.K. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Scientific Reports* 6, 29681 <https://doi.org/10.1038/srep29681>
- Solís-Martínez R., Hernández-Flores G., Jiménez-Luevano M. Á., Ortiz-Lazareno P. C., Cancino-Marantes M., Cruz-Gálvez C. C. y Bravo-Cuellar A. (2016). Macrófagos del tejido adiposo, asociación con obesidad y alteraciones metabólicas. *Revista Médica*. 8(1):11-15.
- Stenken, J. A. y Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines--areview. *Analytica chimica acta*, 853, 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.009>
- Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R. y Gordon J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 444(7122):1027-1031. [doi:10.1038/nature05414](https://doi.org/10.1038/nature05414)

- Valenzuela-González F., Casillas-Hernández R., Villalpando E. y Vargas-Albores F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas* 41(4): 297–313. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Waykole, Y. P., Doiphode, S. S., Rakhewar, P. S., & Mhaske, M. (2009). Anticytokine therapy for periodontal diseases: Where are we now?. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 13 (2): 64–68. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.55837>
- Woting, A., Pfeiffer, N., Hanske, L., Loh, G., Klaus, S., y Blaut, M. (2015). Alleviation of high fat diet-induced obesity by oligofructose in gnotobiotic mice is independent of presence of *Bifidobacterium longum*. *Molecular nutrition y food research*, 59(11): 2267–2278. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500249>

Cuernavaca, Morelos a 28 de febrero de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **ELIENAI SANTANA NAVA**, con el título del trabajo: **DISBIOSIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN POBLACIÓN INFANTIL Y ADOLESCENTE CON SOBREPESO Y OBESIDAD DEL ESTADO DE MORELOS.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de **Titulación Profesional por Etapas** como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

SECRETARIO: DRA. MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

VOCAL: DR. ALFREDO LAGUNAS MARTINEZ

SUPLENTE: M. EN C. MARIA LUISA BARROSO GARCIA

SUPLENTE: DRA. CINTHYA ESTEFHANY DIAZ BENITEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-02-28 18:04:42 | Firmante

GOAherBaCWeX/Pxl+oIGwPxiJBQZMAIHBi68kVt6ZHPLveNHLuYqV/hS2G8XuW9kfbLoAjFa+8uCtv/tZMExfyu1dIboj+5Axkue7VBPLcLhaMYlun+1tSxstjRjwsKNuf1mPF7nHwu9nxKqPNUyGebseKpTpiX1f/L5yXVROFBnTLyem6ywGKMsqyrfGqXA9AGmxsXJEFOtI9vx9DheFNb11oOuCvLm5h/gDt7DwxGluNMYAQ0bIIPQkriLnTxEOFOkTtOa/GCxfjZMYV T45q2q8Jg859BZ32Gp79LgGn2Sf+tkYHiMO/ThmBtqLMW2V1FVZj6YkH8DEfuPWaw==

ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ | Fecha:2022-03-01 00:34:29 | Firmante

N4k1t5vseWLYk7JqGCXdKtm7Ib3IDiHe7WljiVOLzJiTq4qCtQD0MEO3rMgl9JdutjpnGJ9NsB9+6QM/Wswz9e3Tk9J4FYkddK6CTi8JpQ9oUMwscAhZVmrK+GGYV8yW78Wduf7LdOgAQ0FWNZQHlgL1XLv2gNjNmAlR6H4fdcGcTuGn/0gSdRACe0DEjuoYfjdtAfmgli/863M+YaOiG9f9gfYVQiYa1Myf6gh1AO2p8VNjSLagOFDraGEPzxFJ+ExhmRCn9GIMCK BsX/drOcocLbQon91ERT/SsH4pYAXxMEihTVMw7IL1YOGdIRgUCnK3N0zk/f0yOZpsRHWw==

CINTHYA ESTEFHANY DÍAZ BENÍTEZ | Fecha:2022-03-01 18:34:37 | Firmante

kFlakUjzRAyB+CVjQ6A/MUIYYVln0IK4kUtxIHfQqfZANTewMfzYZE9IDbnu/Vx5wH24TJ0wL1OCsMXGeu3Zr6/buygEh7gUxP4kOfdTnerDmQinJcg6h+Jp6k17IPjj2DvhQEIbnzaVIB8laN0SEx1KcallPawsd2C2rnMzIDPMh+vMCCyYj+wlyi21zhSyYDYQbKYgZK+FLgqA3sJPOBrpz12Blg5mFgAEJd2iP84EkdTC4WXC/OWpHVWpYB4cUKZHaCD0mh/frv19GJ2elq9DIOTX/rZPfr1820YA+OY6qiWwEDKCSZILD0ElyRHByVqHZgnDgA+UAbgcAg==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2022-03-02 13:41:19 | Firmante

jB1TrGW1JIVP03huAZenyXYERje/r1z7pel5RsZ6Rny67R1g8AkH0kgrDJSiPxtw49JMA0vG0FX/6tQ793q0JO863V6+S29DH42hWB+78e06d9m5/r9gE4JQcYQZun4SpYcF89KG8bhaoNRdLWu4Gg87Jg0FJgYnkNjI6CTSWx25FR4tvrHEaaNwj8U/MWw72yyp7LdvEzVid2pSJKkBA8TF3gaGcdzzy4g+0j13ecCu0Y0aLDKYjcsK9QXSxU74PjBsQZ3Ypy7FQ9dx Cea8+AZpzjRBolkvY0wKHvO+2644T6N2mBHW8D05b+FSfky5yukRn9Zku63lr4SB0/4A==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2022-03-06 22:12:30 | Firmante

VF2TIRRwtajxGKjAxOk5mbzMGAm6y7znwdl3wWkPE5Csh6K3mogntdtQwNPku7ws1HVC/7XG6XNZFEnpXbyP9hvekSjmRUwr5QyxX2AmW+3l/M5gE9sbuke/15GILsYm+xrf8XeGSmMPswUK46uF4N0bFZaNBpO3FoiDk8FmKJ7mVWFu0RL9ZKzTCLqPqtMAih5gAriyfc13el8ibrhDrHzjAO6tJDAe9d5SWV092bXxf55IDXkLVQxfggLcGfbvjEa+p8uLQyAxFh4MnBoEi3FXQbzKwPpZTXKqldN9cZmyHoLzNmEdJIQFTRxyki+FffVufBdJc6DKLANihJRQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



CkdMh6EZJ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/iMJaW58OMt6Ni8Vlcys6bNDdfHfvFiPV>

