



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

**EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EFECTO DEL
PROBIÓTICO *Bacillus clausii* EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATA
INDUCIDA CON DIETA HIPERCALÓRICA.**

T E S I S

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A :

BIOL. ELIZABETH NEGRETE LEÓN

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez

CODIRECTOR: Dr. Juan José Acevedo Fernández

COMITÉ TUTORAL

Dra. América Ivette Barrera Molina

Dra. Gabriela Castañeda Corral

Dra. D. Vanessa López Guerrero

RESUMEN

De acuerdo con la OMS, la obesidad es un problema de salud pública global y ha sido asociada a enfermedades crónicas no transmisibles. Recientemente se ha evidenciado que la microbiota intestinal es uno de los factores que participan en la obesidad y los trastornos metabólicos. En ratones libres de gérmenes se ha observado que el trasplante de la microbiota procedente de ratones obesos influye en el peso corporal. Asimismo, los alimentos funcionales podrían regular el peso corporal al influir en las funciones metabólicas, neuroendócrinas e inmunológicas del hospedero. Objetivo: Evaluar el efecto probiótico de *Bacillus clausii* en modelos de obesidad inducida por dieta hipercalórica en rata. Material y Métodos: En ratas inducidas a obesidad con agua azucarada 20% durante 3 meses, se evaluó el probiótico *Bacillus clausii*, en una dosis diaria de 8×10^{12} UFC, vía oral durante 2 meses. Se midió glucosa, peso y consumo de alimento antes y después del tratamiento con probiótico. Resultados: En ratas tratadas con agua azucarada, se observó un aumento de peso en comparación del grupo control con agua de uso ($P < 0.0001$). En los grupos tratados con probiótico durante 2 meses, disminuyó el peso corporal y la glucosa basal en ayunas, en comparación a sus grupos control. El consumo de alimento también se redujo en los grupos tratados con probióticos. La proporción de Gram (+) y Gram (-), se observó mayor cambio en las ratas tratadas con sacarosa y las tratadas con agua. Conclusiones: Los alimentos funcionales y productos bioactivos pueden modular la microbiota y funciones metabólicas, tal es el caso del probiótico *Bacillus clausii*.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 Obesidad	7
1.1 La obesidad como un factor de riesgo de Enfermedades Crónicas No Transmisibles....	8
1.2 Prevalencia de la obesidad en México y el mundo.	11
1.3 Prevalencia, incidencia y mortalidad a nivel mundial en población infantil y población adulta	12
1.4 Complicaciones de la obesidad.	14
1.4.1 Resistencia a Insulina	14
1.4.2 Diabetes tipo 2 (DT2).....	16
1.4.3 Dislipidemias.	16
1.5 Factores que influyen para el desarrollo de la obesidad.	18
1.5.1 Factores Dietéticos y Culturales.	18
1.5.2 Factores Genéticos	20
1.6 MICROBIOTA INTESTINAL.....	21
1.6.1 ANTECEDENTES ESPECIFICOS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	21
1.6.2 Funciones de la Microbiota Intestinal.....	24
1.6.3 Función Metabólica de la Microbiota Intestinal.	26
1.6.4 Microbiota intestinal y obesidad.....	30
1.7 Probióticos y microbiota intestinal.	32
1.7.1 Mecanismo de acción de los probióticos.	33
1.7.2 Efecto del probiótico sobre obesidad	34
1.7.3 Efecto de probiótico en niveles glucemicos.....	36
2. JUSTIFICACIÓN.....	39
3. HIPOTESIS	40
4. OBJETIVO GENERAL	40
5. OBJETIVOS PARTICULARES	40
6. METODOLOGÍA.....	41

6.1	Inducción de obesidad en la rata	42
6.2	Evaluación de los cambios en la microbiota intestinal.	43
6.3	Efecto de tratamiento con probiótico en la obesidad	44
6.4	Procesamiento y análisis de datos	45
7	RESULTADOS	46
7.1	Modelo de obesidad.....	46
7.1.1	Inducción de Obesidad en rata	46
7.1.2	Evaluación de los grupos tratados con probióticos.	51
	DISCUSION.....	59
	CONCLUSION	65
10	. PERSPECTIVAS	66
10	. BIBLIOGRAFIA.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enfermedades crónico - degenerativas asociadas a la obesidad.....	11
Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres.	12
Figura 3. Diseño experimental para evaluar el efecto del probiótico en las ratas obesas inducidas con sacarosa al 20%.	45
Figura 4. Consumo de alimento en ratas obesas	47
Figura 5. Porcentaje de cambio de peso corporal,	48
Figura 6. Hiperglucemia en ratas obesas.	49
Figura 7. Porcentaje de bacterias Gram(-) y Gram(+), en grupos tratados con sacarosa 20%.....	50
Figura 8. Consumo de alimento en grupos tratados con probióticos.....	52
Figura 9. Efecto antiobesogénico del probiótico <i>Bacillus clausii</i>	54
Figura 10. Niveles de glucosa de grupos con probiótico vs sacarosa 20%.	55
Figura 11. Proporción de bacterias Gram +/- Gram -.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de sobrepeso y obesidad según el IMC (OMS) (AHA)	8
Tabla 2. Composición de la microbiota intestinal independientes de cultivo.....	30
Tabla 3. Estudios de modelos de obesidad y efecto de tratamiento con probióticos	35
Tabla 4. Efecto de probiótico en los niveles de glucemia en modelos murinos.....	37
Tabla 5. Proporción bacterias Gram -/+ en grupos con sacarosa y agua	50
Tabla 6. Proporción bacterias Gram +/- en grupos tratados con probióticos.....	57

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad

La obesidad es un padecimiento crónico que se define como la acumulación de tejido adiposo, visible y cuantificable, producido como consecuencia de un incremento de la ingesta energética y un gasto energético disminuido. Se caracteriza por un grupo de desordenes metabólicos e inflamación de bajo grado, afectando a más de un tercio de la población mundial actual. La prevalencia de la obesidad ha aumentado en todo el mundo y es motivo de preocupación ya que las consecuencias negativas de la obesidad aumentan significativamente el riesgo de desarrollar Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT).¹ Si las tendencias continúan, en 2030 se estima que el 38% de la población adulta tendrá sobrepeso y el otro 20% será obeso.²

La herramienta antropométrica más comúnmente utilizada para evaluar peso y clasificar la obesidad, es el índice de masa corporal (IMC), que es expresado como la relación entre el peso corporal total y la altura cuadrado (kg / m^2). De acuerdo a la OMS, las personas con un IMC $<18.5 \text{ kg} / \text{m}^2$ son considerados como bajo peso, mientras que aquellos con un IMC entre 18.5 y $24.9 \text{ kg} / \text{m}^2$ se clasifican como normales o peso aceptable. Las personas con un IMC que van desde 25 a $29.9 \text{ kg} / \text{m}^2$ se clasifican como sobrepeso, mientras que la obesidad está presente cuando el IMC alcanza $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$. Más allá de ese punto, la obesidad se clasifica en 3 categorías: grado 1 (IMC desde 30 a $34.9 \text{ kg} / \text{m}^2$), grado 2 (IMC de 35.0 a 39.9 kg

/m²) y grado 3 (IMC ≥40 kg / m²). ³ La Asociación Americana del Corazón (AHA, por sus siglas en inglés), ha propuesto subgrupos de obesidad adicionales para tomar en consideración el subgrupo de pacientes con obesidad masiva e introdujeron obesidad de grado 4 correspondiente a un IMC ≥50 kg / m² y grado 5 como un IMC ≥60 kg /m² (Tabla 1). ⁴

Tabla 1. Clasificación de sobrepeso y Obesidad según el IMC (OMS) (AHA)

Clasificación	IMC (kg/ m ²)
Bajo peso	<18.5
Delgadez severa	<16.00
Delgadez moderada	16.00-16.99
Delgadez leve	17.00-18.49
Rango normal	18.50-24.99
Sobrepeso	≥ 25.00
Pre-obeso	25.00- 29.99
Obeso	≥30.00
Obeso clase I	30.00-34.99
Obeso clase II	35.00-39.99
Obeso clase III	≥40.00
*Obeso clase IV	≥ 50.00
*Obeso clase V	≥ 60.00

1.1 La obesidad como un factor de riesgo de Enfermedades Crónicas No Transmisibles

Actualmente, uno de los mayores retos de la salud pública a nivel mundial es el combate a la obesidad, debido al impacto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece. La obesidad aumenta el riesgo de muchos trastornos

asociados con alta mortalidad y morbilidad, ya que se presentan alteraciones en la respuesta inmunitaria en el que se genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico y de bajo grado, el cual está presente en las Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT) como diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedad coronaria (CHD), dislipidemia, resistencia a insulina, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa.^{5,6} (Figura 1). El exceso de peso aumenta el riesgo de estas enfermedades y el patrón de distribución de la grasa corporal es importante en muchas de estas condiciones. Además, la obesidad central definida por la circunferencia de la cintura es el componente esencial de la definición de síndrome metabólico de la Federación Internacional de Diabetes (FID) (triglicéridos elevados, colesterol HDL reducido, presión arterial elevada y glucosa plasmática en ayunas). Por otra parte, estudios transversales muestran que la distribución de la grasa abdominal está relacionada con diversas anormalidades y trastornos metabólicos de una manera similar a su relación con alto IMC.⁷ También se ha demostrado que el desarrollo de ciertos cánceres, entre ellos el colorrectal, el páncreas, el riñón, el endometrio, el seno posmenopáusico y el adenocarcinoma del esófago, pueden estar relacionado con los niveles excesivos de grasa y la naturaleza metabólicamente activa de este tejido adiposo.^{8,9} Los cánceres se han visto afectados por las complejas interacciones entre la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad, la hiperinsulinemia, la hiperglucemia sostenida, el estrés oxidativo, la inflamación y la producción de adipocinas⁸. Debido a que la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la denominó: “La

epidemia del siglo XXI". Tanto el sobrepeso como la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción a nivel mundial. Cada año fallecen aproximadamente 2.8 millones de personas como consecuencia de diferentes patologías relacionadas con la Obesidad. De esta forma, el 44% corresponde a diabetes, el 23% a cardiopatía isquémica, y entre el 7% y el 41% está representado por algunos cánceres.^{10,11}

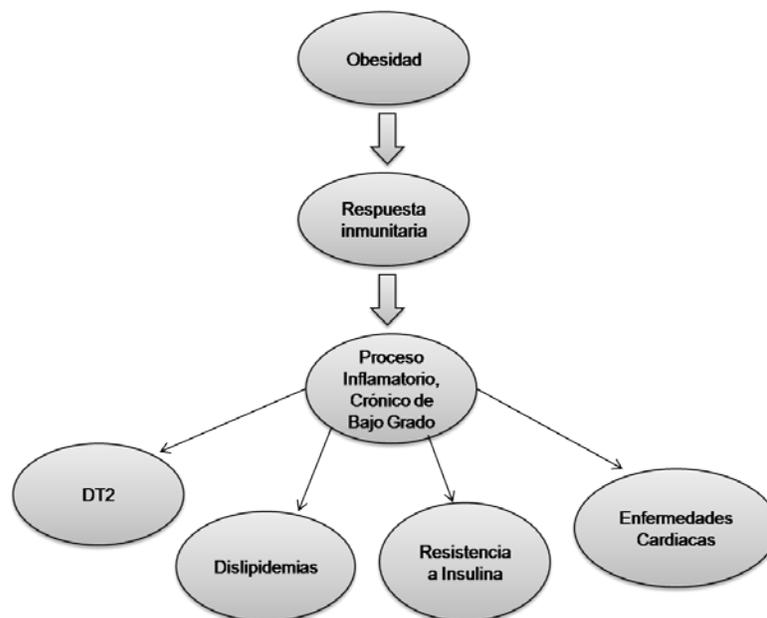


Figura 1. Enfermedades crónico - degenerativas asociadas a Obesidad.

1.2 Prevalencia de la obesidad en México y el mundo.

México y Estados Unidos ocupan los primeros lugares de prevalencia de obesidad a nivel mundial en la población adulta, tan solo en el año 2009, presentaron una prevalencia del 30% y 33.8 % respectivamente ¹². Los datos son alarmantes ya que México se posiciona entre los primeros lugares a nivel mundial con mayor prevalencia en sobrepeso y obesidad. Además hay un incremento paralelo de enfermedades cardiovasculares atribuibles a la obesidad, siendo las principales causas de muerte en nuestro país^{13,14,15}. La prevalencia significativa del sobrepeso y obesidad es evidente tanto en hombres como en mujeres. En el año 2006, se reportó la prevalencia de sobrepeso y obesidad de 69.7% de adultos mexicanos a los 20 años¹⁵, mostrando un aumento comparado con el 61.8% reportada por la ENSA

2000. Mientras que para el 2012, la ENSANUT reportó una prevalencia del 71.3%, ligeramente superior a lo reportado en el 2006 (Figura 2). Sin embargo, para el 2016, esta prevalencia aumentó a de 71.3% a 72.5%.¹⁶ Estos datos ubicaron a México como uno de los países con mayor prevalencia en sobrepeso y obesidad a nivel mundial.

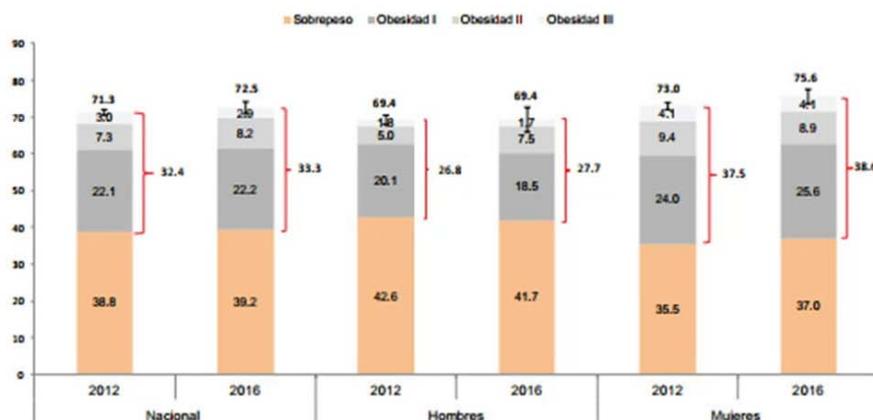


Figura 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres. ENSANUT 2012 Y ENSANUT MC 2016. *Clasificación de IMC descrita por la OMS: sobrepeso=25.0-29.9 kg/m², obesidad grado II= 35.0-39.9 kg/m², obesidad grado III >40.0 kg/m²

1.3 Prevalencia, incidencia y mortalidad a nivel mundial en población infantil y población adulta

La prevalencia de la obesidad ha aumentado dramáticamente en todo el mundo y en las últimas décadas la prevalencia global de obesidad se duplicó entre 1980 y 2008. Según la Organización Mundial de la Salud, el 35% de los adultos de todo el mundo mayores de 20 años tenían sobrepeso. Una tendencia creciente en la prevalencia de la obesidad desde principios de la década de 1980 ha representado un problema de salud en todo el mundo y podrían elevar más, según las predicciones de la obesidad para 2030.¹⁷

Un estudio en el 2017 de NCD Risk Factor Collaboration, sobre tendencias mundiales de bajo peso, sobrepeso y obesidad desde 1975 hasta 2016, notificó que la prevalencia mundial en niñas aumentó de 0.7% en 1975 a 5.6% en 2016 y de 0.9% aumentó a 7.8 % respectivamente en niños.¹⁸

La prevalencia a nivel nacional en adultos mexicanos representativos se estimó en 38.8% con sobrepeso y 32.4% obesidad. Esta prevalencia representa un aumento del 15% desde 2000, colocando a esta población entre las que se aceleran más rápidamente en términos de prevalencia de la obesidad en la última década. Tales números crecientes son una fuente de preocupación ya que existen consecuencias negativas derivado de la obesidad y pueden comenzar a temprana edad.¹⁹

La obesidad se asocia con un aumento significativo de la mortalidad, con una disminución de la esperanza de vida de 5 a 10 años.²⁰ Existe evidencia que indica que la mortalidad está asociada a ECV y a cáncer por lo que aumenta significativamente en individuos con obesidad, específicamente en las Etapas 2 o 3 del Sistema de Clasificación de Obesidad (Tabla 1). Recientemente, un meta análisis a gran escala que incluyó estudios en el que habían reclutado a más de 10 millones de individuos, indicó que el índice de riesgo para la mortalidad aumentó considerablemente con el incremento del IMC.²¹

1.4 Complicaciones de la obesidad.

La obesidad es un padecimiento que se desarrolla por una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo y es el resultado de la combinación de varios factores fisiológicos, psicológicos, metabólicos, genéticos, socioeconómicos, culturales y emocionales. Así mismo, representa un estado inflamatorio crónico de bajo grado, dando como resultado un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, con la cual están asociadas con otras enfermedades degenerativas tales como diabetes tipo 2 (DT2), resistencia a insulina, hipertensión, dislipidemias y enfermedades cardíacas (Figura 1).²²

1.4.1 Resistencia a Insulina

Una reducción en la sensibilidad a la insulina puede ocurrir a través de un defecto hereditario, o puede adquirirse como consecuencia de la obesidad. Una vez que se adquiere la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina, comienza una cascada de cambios metabólicos que conducen a la diabetes, dislipidemia, hipertensión, y finalmente, enfermedades cardiovasculares.

Tanto en el estado de ayuno como en el posprandial, los sujetos obesos requieren niveles de insulina que son varias veces más altos que los sujetos no obesos para mantener la tolerancia normal a la glucosa. A nivel celular, la insulina se une a su receptor en la superficie de las células diana, lo que provoca la autofosforilación de tirosina y la consiguiente señalización intracelular. Estos eventos culminan en respuestas celulares, como la translocación de los transportadores de glucosa a la

superficie celular para permitir la captación de glucosa para su uso o el almacenamiento de glucógeno. En la obesidad, sin embargo, la señalización de la insulina es defectuosa. La actividad de la proteína quinasa en el receptor de insulina, que media la autofosforilación de tirosina, se reduce en los sujetos obesos en relación con los no obesos, y se reduce aún más en los pacientes obesos con diabetes tipo 2.^{23,24} Además, la obesidad está asociada con otros defectos de unión a los receptores en la acción de la insulina, incluida la generación deficiente de segundos mensajeros, el menor transporte de glucosa y anomalías en algunos pasos enzimáticos críticos involucrados en el uso de la glucosa.²³

Las anomalías en la lipogénesis y la síntesis de proteínas también ocurren en la obesidad. Sin embargo, los sujetos obesos con transporte de glucosa mediado por insulina deprimido pueden recuperar esta respuesta después de la pérdida de peso. El aumento de los niveles de ácidos grasos libres (FFA) que se encuentran en individuos obesos también contribuye a los defectos en el uso y almacenamiento de la glucosa. A medida que aumenta la grasa corporal, aumenta la tasa de lipólisis, lo que lleva a un aumento de la movilización de FFA y, en consecuencia, a un aumento de la oxidación de FFA en el músculo y el hígado. A su vez, el uso de glucosa por parte de los músculos disminuye a medida que se usan los FFA como fuente de energía alternativa, y la producción de glucosa hepática aumenta en respuesta a la mayor oxidación de FFA. Estas acciones resultan en hiperglucemia y alteración de la tolerancia a la glucosa.^{24,25}

1.4.2 Diabetes tipo 2 (DT2)

En la Diabetes tipo 2 , la hiperglucemia es la consecuencia de la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta. La resistencia a la insulina periférica ocurre temprano en el curso de la enfermedad, e inicialmente es compensada por la hiperinsulinemia. Sin embargo, la hiperglucemia se produce con el tiempo como consecuencia de la disminución de la secreción de insulina. La DT2 tiene una etiología multifactorial, que incluye obesidad genética, fisiológica y relacionada con el estilo de vida, con ingesta dietética hipercalórica, bajos índices de actividad física y mayor comportamiento sedentario. Se caracteriza por tener resistencia a la insulina, y otras características del síndrome metabólico suelen estar presentes, como hipertensión, hiperlipidemia, acantosis nigricans, enfermedad del hígado graso y enfermedad del ovario poliquístico.

La hiperglucemia crónica de la diabetes tipo 2 también se asocia con daño a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, particularmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos .^{26,27}

1.4.3 Dislipidemias.

La progresión del estado magro a la obesidad trae consigo un cambio fenotípico en el tejido adiposo y el desarrollo de inflamación crónica de bajo grado.²⁸ Esto se caracteriza por el aumento de los niveles de ácidos grasos libres circulantes, factores pro inflamatorios solubles (como la interleucina IL 1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF α) y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP 1) y activación e infiltración de células inmunitarias en sitios de inflamación.²⁹ La

obesidad también suele estar relacionada con un perfil específico de dislipidemia (dislipidemia aterogénica) que incluye partículas pequeñas y densas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), niveles reducidos de partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y niveles elevados de triglicéridos³⁰. Este perfil crónico de bajo grado de inflamación y dislipidemia conduce a una disfunción vascular, incluida la formación de aterosclerosis, y al deterioro de la fibrinólisis. Estos, a su vez, aumentan el riesgo de Enfermedades Cardiovasculares (ECV), incluidos el accidente cerebrovascular y el tromboembolismo venoso³¹. Los aspectos metabólicos y cardiovasculares de la obesidad están estrechamente relacionados. El estado inflamatorio crónico asociado con la obesidad se establece como un factor importante que contribuye a la resistencia a la insulina, que a su vez es una de las patofisiologías clave de la Diabetes Tipo 2 (T2D)³². Además, la obesidad central definida por la circunferencia de la cintura es el componente esencial de la definición de la Federación Internacional de Diabetes (FID) del síndrome metabólico (triglicéridos elevados, colesterol HDL reducido, presión arterial elevada y glucosa plasmática en ayunas; Federación Internacional de Diabetes, 2006).

El uso deficiente de glucosa y el aumento de la producción de glucosa hepática no son las únicas consecuencias de los niveles más altos de ácidos grasos libres (FFA) en la obesidad. El aumento de los FFA también afecta el metabolismo de los lípidos al aumentar la producción de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado, reduciendo los niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y aumentando el número de partículas pequeñas y densas de lipoproteínas

de baja densidad (LDL). Estas partículas más pequeñas tienen mayor capacidad de penetrar en la pared arterial, se someten más fácilmente a la oxidación y la glucosilación, y son más aterogénicas que las partículas LDL más grandes y flotantes. Incluso cuando el nivel de colesterol LDL no cambia apreciablemente, el riesgo aterogénico puede ser mayor debido a la presencia de partículas LDL más pequeñas. En conjunto, estos cambios en el perfil de las lipoproteínas se asocian con un mayor riesgo de Enfermedades Cardiovasculares.³³

1.5 Factores que influyen para el desarrollo de la obesidad.

El ambiente obesogénico, es caracterizado por una alimentación alta en grasas y azúcares en conjunto con el sedentarismo, en el que los individuos tienen una disminución en los niveles de actividad física almacenándose el exceso de calorías como triglicéridos en el tejido adiposo; ambos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la obesidad.³⁴ Un estudio demostró que algunos factores de riesgo tempranos para el desarrollo a obesidad son los niveles altos de índice de masa corporal, insulina, glucosa, triglicéridos y presión arterial sistólica, así como un colesterol HDL más bajo.³⁵

1.5.1 Factores Dietéticos y Culturales.

El desarrollo de la obesidad se produce cuando la ingesta calórica es desproporcionada con respecto a la energía consumida. El consumo de una dieta no saludable al contener un mayor porcentaje de calorías provenientes de grasas

saturadas, así como un menor consumo de frutas y verduras, traerá como resultado un aumento en el peso del individuo. El sexo, la edad, la raza y el estado socioeconómico tienen un impacto en el aumento de peso, ya que el sobrepeso y la obesidad son más probables entre las mujeres, las personas mayores, los miembros de razas minoritarias y los de nivel socioeconómico bajo.

Hoy en día, los refrescos forman parte de nuestra cultura y su consumo ha ido en constante aumento durante los últimos 50 años. Se sabe que un refresco de 20 onzas (591.471 ml) fabricado con jarabe de maíz de alta fructosa tiene alrededor de 250 kcal. Por lo tanto, el consumo de un refresco diario, aunado al estilo de vida en el que no existe actividad física, es más que suficiente para explicar el aumento de peso corporal en el último cuarto de siglo³⁶. Además, se ha demostrado que el estrés psicológico agudo altera la preferencia de alimentos y la cantidad de ingesta de energía. Por lo tanto, el estrés psicológico agudo se asocia con la alimentación en ausencia de hambre, principalmente en aquellos individuos vulnerables que son caracterizados por la conducta alimentaria desinhibida y la sensibilidad al estrés³⁷. En el desarrollo de la obesidad también es importante mencionar la diversidad cultural, ya que en muchos países desarrollados (y en desarrollo), están evolucionando a presentar cambios en los patrones tradicionales de alimentación. La alimentación ha cambiado de una dieta rica en granos enteros, frutas y verduras, a una dieta más occidentalizada, alta en consumo de productos animales y bebidas azucaradas.

Las diferencias en la actividad física y el comportamiento sedentario ayudan a explicar las disparidades étnicas y socioeconómicas en las tasas de obesidad.

Vivir en vecindarios de bajos ingresos también se ha asociado con un comportamiento más sedentario y menos actividad física.³⁸

1.5.2 Factores Genéticos

En algunos estudios se han evaluado las contribuciones relativas de la genética. Aunque varía de un estudio a otro, el 30% al 40% de la variación en el IMC se puede atribuir a la genética y del 60% al 70% al medio ambiente. La interacción entre la genética y el medio ambiente también es importante. En una población dada, algunas personas están genéticamente predispuestas a desarrollar obesidad, pero ese genotipo puede expresarse solo bajo ciertas condiciones ambientales adversas, como las dietas ricas en grasas y los estilos de vida sedentarios.³⁹ Los niños nacidos de madres obesas o con sobrepeso tienen más probabilidades de tener sobrepeso a la edad de cuatro años, incluso si su IMC está dentro del rango promedio a los dos años.⁴⁰ Un estudio longitudinal de niñas indicó que en comparación con las familias en las que ninguno de los padres tenía sobrepeso, si los padres de una niña tenían sobrepeso, la niña tenía ocho veces más probabilidades de tener sobrepeso a los 13 años, incluso después de controlar el IMC de las niñas en la edad de cinco años.⁴¹ Los estudios de gemelos y de adopción, con la capacidad de atribuir similitud familiar a los efectos genéticos y ambientales, se apoyan con el aumento del IMC y con la influencia de los factores ambientales que se disipan en la adolescencia.⁴²

Aunado a los factores ambientales y sociales, estudios demuestran que los factores genéticos también pueden influir o están asociados al desarrollo de obesidad. Respecto a los factores genéticos, la investigación se ha centrado en la búsqueda de los genes responsables de la obesidad.

1.6 MICROBIOTA INTESTINAL

Recientemente, los microorganismos residentes en el intestino, conocidos en conjunto como microbiota intestinal, han sido identificados como uno de los factores ambientales responsables de la obesidad. Por ello, una mayor aproximación a esta población microbiana podría contribuir a conocer su potencial como medio terapéutico para tratar la obesidad.⁴³

Estudios realizados previamente indican que la microbiota intestinal (MI) es un actor importante en la regulación del metabolismo energético del organismo. La MI en obesos está alterada, comparada con normopesos, lo que podría explicar su mayor eficiencia en la extracción de energía a partir de los alimentos. El contenido en grasa de las dietas también es un factor que pueda alterar la composición de la MI, a través del aumento de las concentraciones plasmáticas de LPS, el cual favorece el desarrollo de un estado proinflamatorio que facilita la aparición de resistencia a la insulina.⁴⁴

1. 6.1 ANTECEDENTES ESPECIFICOS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

La Microbiota Intestinal (MI) se define como la comunidad microbiana que habita en el tracto gastrointestinal. Estos microbios juegan un papel importante en la

salud humana y su desequilibrio está relacionado con numerosas enfermedades. El número y la diversidad de los microorganismos están modulados por factores fisiológicos y ambientales, como el genotipo del huésped, el hábitat y, principalmente, la dieta. El número total de bacterias en un hombre de 70 Kg aproximadamente se estima que es alrededor de 3.8×10^{13} , que es aproximadamente el número de células en el cuerpo humano (Senderetal.2016). Las bacterias se clasifican morfológicamente y se basan en el tipo de pared celular, la forma celular, los requisitos de oxígeno, la producción de endosporas, la motilidad y los requisitos de energía. También se clasifican filogenéticamente en función del análisis de secuencias de nucleótidos. La agrupación filogenética de todos los genomas bacterianos, denominados colectivamente microbios, se divide en grupos taxonómicos (dominio, reino, filos, clase, orden, familia, género y especies). Por lo tanto, la metagenómica ha podido contribuir a la generación de conjuntos de datos para la caracterización del microbioma (TABLA 2).^{44,45}

El microbioma humano se divide en cuatro filos principales: *Firmicutes* (65%), *Bacteroidetes* (16%), *Actinobacteria* (9%) y *Proteobacteria* (5%). *Bacteroidetes* y *Firmicutes* representan más del 90% de la abundancia relativa de microbios intestinales.⁴⁶ El phylum *Bacteroidetes* está compuesto por bacterias anaerobias gramnegativas, no formadoras de esporas, que toleran la presencia de oxígeno pero no pueden usarlo para el crecimiento. *Firmicutes* es un filo diverso de microbiota intestinal compuesto principalmente por clases de Bacilli y Clostridia. Son aerobios grampositivos, anaeróbicos (clostridios) obligatorios o facultativos (bacilos). Las especies de *Clostridium* producen endosporas para sobrevivir a

condiciones adversas, lo que les permite regresar solo cuando el ecosistema es favorable para su crecimiento. Por el contrario, las actinobacterias, por ejemplo, *Bifidobacterium*, son grampositivas, con barras de ramificación múltiple, no móviles, no formadoras de esporas y anaeróbicas. Las proteobacterias (por ejemplo, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) son aerobios o anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, no forman esporas y habitan en el tracto intestinal de todos los vertebrados. Si bien *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli* son ejemplos de bacterias anaerobias facultativas, *Bacteroides* son anaerobios obligados.⁴⁷

La diversidad de la composición bacteriana, la carga calórica y la absorción de nutrientes ha servido para agrupar filotipos a nivel de especie en enterotipos^{46,48}. Un enterotipo personal se basa en la presencia en el intestino de cepas / especies microbianas sanas y asociadas a la enfermedad, y determina el estado fisiopatológico de cada individuo. Los microbiomas humanos de la piel, los pulmones, la boca, los genitales y el tracto gastrointestinal están influenciados por el medio ambiente y la colonización de microbios.⁴⁹

La investigación de conjuntos de datos de microbiomas tan numerosos y diversos es una tarea compleja. Requiere conocimientos y habilidades biológicas en un conjunto de herramientas para predecir con precisión la influencia de la red de interacción de microbios perturbados en la salud y los resultados de la enfermedad. También son importantes las estrategias nutricionales dentro de las cuales podríamos mencionar, los probióticos y los prebióticos.

1.6.2 Funciones de la Microbiota Intestinal

El intestino es colonizado por aproximadamente de 100 a 400 billones de microorganismos que viven en una relación simbiótica estrecha ⁵⁰. La mayoría de las bacterias están fuertemente adheridas a la mucosa de la barrera externa e interna de más de 7 m de largo. Muchos de estos organismos son transmitidos a los primeros años de vida a los bebés, principalmente a través de la leche materna, que contiene un gran número de *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*.⁵¹ En adultos, la mayoría de las bacterias que se encuentran en el intestino pertenecen a los géneros *Bacteroides*, *Parabacteroides* (Bacteroidetes) y *Clostridium* (Firmicutes).^{52,53}

El intestino es un ambiente anaeróbico y las especies patógenas aerobias no pueden invadir y colonizarlo. Sin embargo, las especies patógenas anaeróbicas y facultativas pueden invadirla causando enfermedad. Cada sitio del tracto gastrointestinal, tiene una microbiota única; la densidad de bacterias aumenta en el yeyuno e íleon y en el intestino grueso en comparación con el estómago y duodeno. La densidad bacteriana más alta está presente en el colon, aproximadamente 10^{12} colonias por unidades / ml (99%). La población de microbiota de colon está compuesta principalmente de anaerobios, tales como *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium* (géneros que pertenecen a los filos más abundantes: Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes).

Las comunidades anfitrionas y microbianas han desarrollado estrategias que promueven un estado estable por su beneficio mutuo. La disbiosis se refiere a un desequilibrio en la abundancia de especies microbianas, que está comúnmente vinculado a la función de barrera intestinal dañada y la activación de células inflamatorias.⁵⁴ Es probable que la falla en la regulación adecuada de la composición (diversidad microbiana) esté en el inicio y en la cronicidad de muchas enfermedades, incluidas las enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome del intestino Irritable, diabetes, obesidad y cáncer .⁵⁵

La asociación potencial entre disbiosis intestinal asociado a ciertas enfermedades humanas se pueden promover, por ejemplo, por la presencia de especies antiinflamatorias, como *Faecalibacterium prausnitzii*, que predominan en individuos sanos, o la presencia de bacterias potencialmente proinflamatorias *Bacteroides* y *Ruminococcus gnavus*, que están asociados con la enfermedad inflamatoria del Intestino.⁵⁶

Una disminución de Bacteroidetes y un aumento de Firmicutes además de la baja abundancia de especies de Bacteroides han sido asociado con la obesidad en estudios de modelos animales.⁵⁷ La disbiosis también se ha estudiado en otros microbiomas, como en la piel, la vagina, la cavidad oral, el estómago y particularmente en la forma de sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado.

La microbiota intestinal desempeña un papel crítico en el desarrollo de enfermedades. La respuesta inmune innata es mediada por células linfoides (ILCs) formadas por las células natural killer (NK) y subconjuntos de células linfoides no citotóxicas y auxiliares que incluyen ILC1, ILC2 e ILC3. Las células NK y ILC1

producen grandes cantidades de IFN- γ , así también péptidos antimicrobianos (AMPs), como granulinas, catelicinas y defensinas, y quimiocinas.⁵⁸

En conjunto, ejercen funciones críticas en la regulación de la ecología microbiana y tolerancia inmunológica.⁵⁹ Un desequilibrio de la actividad de las NK o producción de AMP puede conducir al desarrollo de enfermedades inflamatorias locales y sistémicas.⁶⁰

Las células epiteliales intestinales (IEC, por sus siglas en inglés) y las células inmunitarias expresan una variedad de receptores llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que median las interacciones entre el sistema inmunitario y la microbiota comensal. Los receptores tipo Toll (TLR) son ejemplo de PRR que reconocen moléculas microbianas únicas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que incluyen lipopolisacáridos, lípidos A y peptidoglucanos.⁶¹

Los firmicutes se asocian positivamente con la producción de TNF- α e IL-1 β , que son citoquinas críticas involucradas en la regulación de las células inmunitarias.^{62,63}

1.6.3 Función Metabólica de la Microbiota Intestinal.

Los microorganismos desempeñan sus funciones en gran parte a través de vías enzimáticas para digerir hidratos de carbono complejos y proteínas. La síntesis de una amplia gama de moléculas de señalización de bajo peso molecular, incluyendo metano, sulfuro de hidrógeno y los metabolitos, juegan efectos dañinos o beneficiosos para el huésped. Esos productos activan o desactivan los genes del

huésped y los genes de otras bacterias. Se han identificado miles de metabolitos derivados de la microbiota como componentes del metaboloma humano.⁶⁴ El mantenimiento de una microbiota intestinal fermentativa estable requiere dietas con alimentos particularmente ricos en fibra dietética y polifenoles, que son procesados por las enzimas de la microbiota intestinal, como las glucósidas hidrolasas y las polisacáridas liasas. En condiciones anaeróbicas, las especies que pertenecen a la familia Bacteroides y a las familias Clostridiaceae y Lactobacillaceae, en particular las cepas Citrobacter y Serratia, producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC producidos por la microbiota son acetato (con dos carbonos), propionato (con tres carbonos) y butirato (con cuatro carbonos). El butirato proporciona energía para el metabolismo celular. El acetato y el propionato pasan a la corriente sanguínea, y son tomados por el hígado y órganos periféricos, donde pueden actuar como sustratos para la gluconeogénesis y lipogénesis, que a su vez, controlan el aumento de peso corporal. Los AGCC son la fuente preferida de energía utilizada por los colonocitos (colon).⁶⁵ Los AGCC también se unen a los receptores acoplados a la proteína G (GPR), entre ellos el GPR41 y el 43, que están presentes en una variedad de tejidos, incluyendo el tejido adiposo, las células enteroendócrinas del intestino y las células inflamatorias. Así mismo, los AGCC inducen la secreción de péptido similar al glucagón (GLP-1) y péptido YY (PYY). PYY inhibe la absorción de nutrientes de la luz intestinal y el apetito, mientras que el GLP1 estimula las células β del páncreas para producir insulina. La microbiota intestinal contribuye a la deposición de grasa a través de la regulación del receptor (FXR), el receptor de ácidos biliares que es

responsable de la regulación de la síntesis de ácidos biliares y la acumulación de triglicéridos.

Los AGCC, desempeñan un papel clave en el control de la proliferación, diferenciación y mantenimiento de la mucosa Intestinal. Un deterioro en la producción de AGCC, metabolitos del triptófano, GABA, noradrenalina, dopamina, acetilcolina y 5-HT (5-hidroxitriptamina o serotonina), está involucrado en anomalías del sistema gastrointestinal, enfermedades metabólicas y trastornos neuropsiquiátricos.^{66,67} Además, la microbiota produce grandes cantidades de metabolitos epigenéticamente activos, como el folato y la vitamina A. Por lo tanto, los cambios en la microbiota intestinal (disbiosis) pueden provocar cambios en el epigenoma no solo directamente en las células intestinales adyacentes, sino también en poblaciones de células distantes, como hepatocitos y adipocitos.⁶² Finalmente, las bacterias pueden inhibir el crecimiento de sus competidores mediante la comunicación microbiana específica, la señalización celular a través del contacto célula a célula, los metabolitos y los péptidos sensores del quórum.^{68,58}

La microbiota intestinal participa en el equilibrio entre la ingesta de alimento y gasto de energía y tiene una conexión directa al eje hipotalámico, el cual puede asociarse con un efecto en la saciedad. Así mismo, está relacionada como regulador de homeostasis energética, a través de tres funciones principales 1) Función trófica, 2) Función inmunológica y 3) función metabólica.⁶⁹

Función trófica: Las bacterias intestinales pueden controlar la proliferación y diferenciación de las células epiteliales. Ayudan a mantener al epitelio en buen

estado. El efecto de barrera se debe a la capacidad de ciertas bacterias para segregar sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), que inhiben la proliferación de otras bacterias, y también a la competición entre bacterias por los recursos del sistema.

Funciones Inmunológicas: La microbiota intestinal, es el gran regulador de la respuesta inmune además participa en la regulación de síntesis y liberación de citocinas que tienen que ver con el proceso inflamatorio.

Funciones Metabólicas: metaboliza alimentos para la producción de ácidos grasos de cadena corta como propionato, butirato y acetato además metaboliza los azúcares, fibras y oligosacáridos. Esto se traduce en recuperación de energía de la dieta y favorece la absorción de iones (Ca, Mg, Fe) en el ciego. Las funciones metabólicas también incluyen la producción de vitaminas (K, B12, biotina, ácido fólico y pantoténico) y la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea.^{70,71}

Tabla 2. Análisis de la composición de la microbiota intestinal independientes de cultivo

Método	Muestras	Sujetos	Clones/ lecturas	TIPOS BACTERIANOS %				Referencias
				<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacterias</i>	<i>Actinobacterias</i>	
Hibridación por transferencia de manchas	Heces	27	6 sondas	30.6	37	0.7	0.7	Sghir et al 2000
Microscopia por HFIS	Heces	11	13 sondas	52.6	27.7	0.2	16.7	Harmsen et al; 2002
HFIS/Flujocitometría	Heces	91	18 sondas	57.1	8.5	0.1	4.4	Lay et al 2005
Metagenómica	Heces	8	652.30	4.5	14.3	5.2	2.2	Kurokawa 2007
Pirosecuenciado	Heces	6	12.76	81.2	2.5	1.7	14.6	Andersson 2008

HFIS= Hibridación fluorescente *in situ* .

1.6.4 Microbiota intestinal y obesidad

La permeabilidad de la barrera intestinal elevada y la translocación de bacterias o endotoxinas están asociadas con enfermedades gastrointestinales. La obesidad, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico resultan de una interacción compleja de factores genéticos, inmunes y microbianos asociados a la microbiota intestinal.^{72,73} El síndrome metabólico es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la translocación de bacterias a la sangre que causa endotoxemia metabólica. Las manifestaciones clínicas del síndrome metabólico incluyen enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina diabetes tipo 2, hipertensión y enfermedad del hígado graso. Individuos colonizados por bacterias de los géneros *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Coprococcus* , tienen una tendencia significativamente menor a desarrollar trastornos metabólicos e

inflamación que conducen a diabetes tipo 2 y trastornos cardiovasculares isquémicos^{72,74}. Estas especies se caracterizan por su alta producción de AGCC y peróxido de hidrógeno, que se sabe que inhiben la formación de biopelículas y la actividad de especies patógenas como *Staphylococcus aureus*⁷⁴. Los modelos de obesidad en ratones genéticos e inducidos por la dieta alta en grasa, han demostrado que la proporción de Firmicutes / Bacteroidetes se ve alterada en los animales obesos en comparación con los animales no obesos^{57,72,74}. Sin embargo, existen resultados contradictorios con respecto a las diferencias taxonómicas generales de microbioma intestinal.^{75,76} Las alteraciones metabólicas en los modelos humanos y animales de obesidad pueden ser causadas por el aumento de la permeabilidad intestinal y la difusión de LPS a través de la circulación, que a su vez promueve una inflamación de bajo grado y resistencia a la insulina^{77,78}. Recientemente, un estudio describió los efectos de la microbiota intestinal en una dieta alta en grasa utilizando un modelo de rata. Por lo que su efectos tanto en el tracto digestivo como el sistema parasimpático, de los niveles de acetato plasmáticos pueden ser responsable del aumento de la secreción de insulina inducida por glucosa, aumento de la grelina, hiperfagia y obesidad⁷⁹. Según algunos autores, la variación de los niveles de acetato podría explicar por qué el consumo de concentrados calóricos promueven la obesidad y la resistencia a la insulina. Se siguen realizando estudios para que la disbiosis asociada con enfermedades gastrointestinales, obesidad, diabetes y pueda tratarse mediante una modulación dirigida de algunas especies de bacterias y / o filos en el tracto intestinal, probablemente incorporando a la dieta probióticos.

1.7 Probióticos y microbiota intestinal.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que pueden sobrevivir y colonizar temporalmente el intestino. El pH del jugo gástrico varía de 3 a 5, y este es el primer obstáculo importante que un probiótico debe superar en la práctica clínica para llegar al intestino. Los probióticos también se definen como “suplemento alimentario microbiano viable que influye beneficiosamente sobre el hospedero a través de sus efectos en el tubo intestinal”. Son suplementos dietéticos microbianos que, tras su ingestión en cantidades adecuadas, son capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre el huésped, más allá de su inherente valor nutritivo. *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium* son bacterias probióticas capaces de modular los efectos negativos de las dietas ricas en grasas e incluso de controlar las reacciones inmunológicas mediadas por enfermedades inflamatorias.^{70,80} Las bacterias producen la hidrólisis de carbohidratos. Las enzimas y la fermentación de prebióticos producen hidrógeno, metano, dióxido de carbono y AGCC, que pueden afectar los niveles de energía del huésped y la regulación intestinal. Las mezclas de ingredientes probióticos y prebióticos pueden estimular selectivamente el crecimiento o actividad de bacterias promotoras de salud ⁸¹. Los estudios de metagenómica a gran escala han confirmado que la asociación sinérgica de pro y prebióticos realmente cambia la dinámica de la especie microbiana intestinal a nivel genómico.

Los probióticos suelen consumirse por ingestión de preparados liofilizados utilizados en la preparación de cápsulas, tabletas y jarabes, los cuales contienen mezclas constituidas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, y algunos otros componentes importantes de la microbiota intestinal. En 2001, la OMS y la FAO establecieron la guía de uso de microorganismos probióticos, los cuales deberían cumplir los siguientes requisitos: a) resistentes a la agresión de los jugos gástricos y de la bilis, para sobrevivir incluso en el ambiente ácido del estómago; b) adherencia a la mucosa, colonización y viabilidad intestinal; c) identificación taxonómica de la cepa y cuantificación de bacterias vivas; d) definir la dosis eficaz y las indicaciones terapéuticas, apoyadas por evidencia científica; e) reconocimiento por el organismo huésped, como constituyentes de la flora del intestino sano y no presenten efectos colaterales, incluso en pacientes con inmunodepresión.⁸²

1.7.1 Mecanismo de acción de los probióticos.

Los mecanismos de acción pueden ser por su adhesión a la mucosa intestinal ya que los probióticos son eficaces gracias a la producción de sustancias de actividad antimicrobiana, como las bacteriocinas, el peróxido de hidrógeno o el ácido láctico, que son responsables del bloqueo del crecimiento de los microorganismos patógenos sobre la mucosa intestinal.⁸³Otros, en cambio, pueden actuar reforzando la barrera intestinal directamente, previniendo la permeabilidad y la consiguiente pérdida de macromoléculas. Otros, por su parte, ejercen una acción trófica sobre la mucosa del colon y protegen el moco que reviste la pared intestinal. Además, hay probióticos con función inmunoestimulante que intervienen

indirectamente en la barrera intestinal estimulando las células productoras de IgA y los linfocitos epiteliales intestinales, además de modular la producción de IgE e interleucinas.⁸⁴

1.7.2 Efecto del probiótico sobre obesidad

Se ha demostrado en algunos estudios que el uso de probióticos pueden ayudar a reducir el peso corporal, disminuir los niveles de glucemia e incluso modificar la microbiota. Dentro de los probióticos evaluados se encuentra *Lactobacillus rhamnosus*, *gasseri* y *Bifidobacterium lactis* el cual se observó que pueden reducir la adiposidad así como el peso corporal.⁸⁵ Además, estos probióticos pueden prevenir o mejorar los síntomas clínicos del síndrome del intestino irritable, la enterocolitis inflamatoria y necrotizante y la diarrea aguda.⁸⁶ Otro estudio realizado en ratón con una dieta alta en grasa y administrando *Lactobacillus rhamnosus* durante 12 semanas, se pudo observar un efecto antiobesogénico, ya que el peso se mantuvo en comparación con el grupo control que solo tenía una dieta alta en grasa el cual aumentó un 22.3% más de peso, mostrando así una diferencia significativa.⁸⁷ En un estudio realizado por Alard en el 2016, un grupo de ratones mantuvo con una dieta alta en grasa el cual aumentó un 22.5 % más de peso que aquellos tratados con la mezcla de probióticos, que consistía en una dieta alta en grasa pero además bajo tratamiento con la mezcla de dos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* LMG S-28148 y *Bifidobacterium animalis* LMG P-28149 en una cantidad de 5×10^8 , durante 17 semanas.⁸⁸

En la Tabla 3 podemos observar el uso de probióticos en estudios de animales obesos, obteniendo como resultado un efecto antiobesogénico, teniendo como diferencia la cepa y la cantidad administrada en los diferentes estudios.

Tabla 3. Estudios de modelos de obesidad y efecto de tratamiento con probióticos

Modelo Experimental	Probiótico	Resultados	Referencia
Dieta alta en grasa Modelo a Obesidad en ratón C57BL/6 (10 semanas)	Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) (1x10⁷ UFC) (12 semanas)	Efecto antiobesogénico. Sin datos de glucemia	Ji Y (2018)
Dieta alta en grasa Modelo a Obesidad en ratón C57BL/6 (17 semanas)	Lactobacillus rhamnosus LMG S-28148 y Bifidobacterium animalis LMG P-28149	Efecto antiobesogénico. Niveles de glucemia menores al administrar probiótico .	Alard (2016)
Dieta alta en grasa Modelo a Obesidad en ratón C57BL/6 (12 semanas)	L. plantarum LG42 (1X 10⁹ UFC) 12 Semanas	Efecto antiobesogénico Sin datos de glucemia	Park (2014)
Dieta alta en grasa Modelo a Obesidad en ratón C57BL/6 (24 semanas)	L. gasseri SBT2055 (5x10⁸ UFC) 24 semanas	Efecto antiobesogénico Sin datos de glucemia	Miyoshi (2014)
Modelo de obesidad Dieta Alta en Grasa por 8 semanas y suplementación probiótica posterior durante 10 semanas	L. curvatus HY7601 y L. plantarum KY1032 (5x 10⁹ UFC) 10 semanas	Efecto antiobesogénico Sin datos de glucemia	Park (2013)
Dieta alta en Sacarosa Modelo a Obesidad en ratón (10 semanas)	L. gasseri BNR 17 (1x10⁹ y 1x 10¹⁰ UFC)	Efecto antiobesogénico Glucemia no significativa entre los grupos.	Kang (2013)
Dieta alta en Sacarosa Modelo a Obesidad en rata Sprague-Dawley (12 semanas)	L. gasseri BNR 17 (1x10⁹ UFC) 12 Semanas	Efecto antiobesogénico Glucemia no significativa entre los grupos	Kang (2010)

1.7.3 Efecto de probiótico en niveles glucemicos

Se ha observado que el aporte complementario de probióticos mejora los síntomas de diabetes en modelos de animales afectados de diabetes de tipo 1 o tipo 2. La ingestión de *Lactobacillus casei* retrasó el inicio de diabetes en ratones diabéticos no obesos así como en ratones con diabetes inducida por aloxano^{89,90}. Análogamente al aloxano, el tratamiento con estreptozotocina (STZ) en ratas y ratones induce una diabetes dependiente de la insulina debido a la toxicidad del fármaco en las células pancreáticas. El pronóstico de la diabetes por inyección neonatal de STZ puede mitigarse alimentando a las ratas con pienso al que se ha incorporado *Lactobacillus rhamnosus*⁹¹. Además, la administración de Dahi, un producto lácteo fermentado indio que contiene *Lactobacillus acidophilus* (NCDC14) y *L. casei* (NCDC19), en ratas tratadas con STZ mejoró la tolerancia a la glucosa y redujo los niveles de colesterol LDL y VLDL totales así como los niveles de triglicéridos⁹². En un modelo animal de diabetes de tipo 2 con ratones KKAY, en los que una mutación en el gen Ay causa obesidad y resistencia a la insulina, la administración por vía oral de *L. casei* redujo significativamente los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, así como el peso corporal, a pesar de una ingestión similar de alimentos⁹³. En un modelo animal de diabetes no genética, el inicio de la resistencia a la insulina inducido por una alimentación rica en fructosa también se retrasó por el tratamiento con Dahi⁹². En otros estudios realizados por Kang, no se observaron diferencias significativas en comparación al grupo control, tal es el caso del uso del probiótico *L. gasseri* BNR 17 (1×10^9 UFC y 1×10^{10} UFC) en un modelo de dieta alta en sacarosa en rata, el cual no se mostró

diferencia significativa en los niveles de glucosa en los dos estudios, uno del 2010 y otro en el 2013. ⁹⁴ (Tabla 4)

Tabla 4 Efecto de probiótico en los niveles de glucemia en modelos murinos

Modelo Experimental	Probiótico	Resultados	Referencia
Dieta alta en grasa Modelo a Obesidad en ratón C57BL/6 (17 semanas)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMG S-28148 y <i>Bifidobacterium animalis</i> LMG P-28149 17 semanas	Los niveles de glucosa se redujo en un 14.1% en el grupo con probiótico en comparación con el grupo sin probiótico	Alard (2016)
Dieta alta en Sacarosa Modelo a Obesidad en ratón (10 semanas)	<i>L. gasseri</i> BNR 17 (1x 10 ⁹ y 1x 10 ¹⁰ UFC) 10 semanas	Glucemia no significativa entre los grupos con probiótico versus el grupo con dieta alta en sacarosa	Kang (2013)
Dieta alta en Sacarosa Modelo a Obesidad en rata Sprague-Dawley (12 semanas)	<i>L. gasseri</i> BNR 17 (1x10 ⁹ UFC) 12 Semanas	Glucemia no significativa entre el grupo con probiótico y grupo on dieta alta en sacarosa	Kang (2010)
Modelo de diabetes con streptozotocina en ratas wistar	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NCDC14 1x 10 ⁷) y <i>L. casei</i> (NCDC19 1x 10 ⁴) 28 días	Mejóro la tolerancia a la glucosa en los grupos con probióticos en un 23 % en comparación con su control diabético.	Yadav (2008)
Modelo de diabetes tipo 2 C57BL/KS/J db/db	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17 (1x 10 ⁷ , 10 ⁸ , 10 ⁹ , 10 ¹⁰) 12 semanas	Niveles de glucosa con diferencia significativa en el grupo con probiótico 1x 10 ¹⁰ (120 mg/dl) en comparación con su grupo control (290 mg/dl)	Yun S.I (2009)

Estudios con este fin requerirán de evaluaciones simultáneas de los cambios que se producen en la composición global de la flora, en su expresión génica y la del huésped, y su repercusión global en funciones metabólicas (metaboloma) durante el tratamiento dietético.

Entre los probióticos que se encuentran en el mercado, Sinuberase (esporas de *Bacillus clausii*) es utilizado para tratar las alteraciones de la microbiota intestinal bacteriana, ya que restaura el desequilibrio que ocurre durante una diarrea o en el curso de una terapia con antibióticos, contribuyendo al rápido restablecimiento del paciente afectado. Las esporas de *Bacillus clausii* han demostrado ser resistentes a cambios de temperatura, por lo que pueden mezclarse con líquidos fríos o calientes; a cambios de pH del jugo gástrico, por lo

que las esporas atraviesan el estómago sin ser dañadas; a ciertos antibióticos, por lo que pueden administrarse conjuntamente⁹⁵. Llegan intactas al intestino, germinan y colonizan asegurando la restauración de la flora intestinal y ayudan a inactivar microorganismos causantes de la diarrea. Gracias a su alta resistencia a los agentes químicos y físicos, las esporas de *Bacillus clausii* cruzan la barrera del jugo gástrico y llegan al tracto intestinal donde germinan, colonizan y ejercen su efecto beneficioso mediante una acción antibacteriana de tipo sustitutivo-competitivo en el intestino, potenciada por la producción de sustancias con acción antimicrobiana, bacteriostática e inmunoestimulante. Como probiótico, Sinuberase® beneficia a una o varias funciones del organismo, además, proporciona un mejor estado de salud y bienestar, a través de la estimulación de las defensas naturales del organismo.

Además, dado que *Bacillus clausii* es capaz de producir varias vitaminas principalmente del complejo B, contribuye a corregir la falta de vitaminas provocada por antibióticos y agentes quimioterapéuticos en general⁹⁶.

2. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema complejo y de consecuencias graves, como las dislipidemias, diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, las cuales forman parte de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles.

Se han señalado factores conductuales, genéticos y medioambientales que contribuyen al sobrepeso y la obesidad.

La población de microorganismos residentes en el intestino, conocida como microbiota intestinal, puede influir sobre la absorción de nutrientes, el almacenamiento de energía y los mecanismos de resistencia a la insulina.

La composición microbiota difiere tanto entre ratones como entre humanos obesos y magros, lo que evidencia que la modulación de la composición de la microbiota intestinal ofrece una nueva vía para el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso.

Una mayor aproximación a esta población microbiana podría contribuir a conocer su potencial terapéutico para tratar la obesidad.

No obstante, el conocimiento sobre los mecanismos de acción de los probióticos es todavía muy limitado. Avances en este sentido posibilitarán el desarrollo futuro de productos con propiedades funcionales cada vez mejor definidas, y dirigidas a cubrir de forma selectiva las necesidades específicas de determinados grupos de población.

Por ello, la administración de probióticos puede constituir una estrategia idónea para modular la composición de la flora y potenciar sus efectos metabólicos beneficiosos.

3. HIPOTESIS

La administración del probiótico *Bacillus clausii* modificará la microbiota intestinal en un modelo de obesidad en rata, reduciendo el consumo de alimento, el peso corporal y la glucemia

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluación de la microbiota intestinal y el efecto del probiótico *Bacillus clausii* en un modelo de obesidad inducida por dieta hipercalórica en ratas Wistar.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Implementar y caracterizar un modelo de obesidad en rata, inducida por el consumo de agua azucarada (sacarosa al 20%) por un periodo de tres meses.
- 2) Determinar si el tratamiento con *Bacillus clausii* modifica parámetros corporales (peso), bioquímicos (glucemia), y dietéticos (consumo de alimento) en ratas obesas.
- 3) Determinar si la inducción de obesidad produce cambios en la microbiota intestinal de las ratas y si estos cambios son revertidos con el tratamiento con *Bacillus clausii*.

6. METODOLOGÍA

Modelos experimentales

Animales

Para la realización de este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 g de peso corporal al inicio del experimento, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM. Estos se mantuvieron bajo condiciones medio-ambientales controladas de temperatura (21 ± 1 °C), humedad relativa (55 y con un ciclo luz oscuridad de 12 horas. Previo y durante los experimentos las ratas tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*. Las ratas fueron alimentadas con pellets de alimento estándar (Rodent diet, Circulo ADN SA de CV.), el cual cumple con los requerimientos nutricionales para roedores. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, donde se dan especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Además el protocolo fue aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL) de la Facultad de Medicina. Al final de los experimentos fueron sacrificados en una cámara de CO₂. Se hicieron esfuerzos para reducir el número de animales utilizados.

6.1 Inducción de obesidad en la rata

Para la inducción de obesidad en las ratas, a estas se les sustituyó el agua por una solución de Sacarosa al 20% por un periodo de 3 meses. Para monitorear la inducción de obesidad se realizó un registro de peso corporal, la medición del consumo de alimento y la determinación de los niveles de glucosa en sangre una vez a la semana por un periodo de tres meses. Para monitorear el consumo de alimento las ratas fueron colocadas en grupos de 5 ratas en cajas de acrílico para roedores. A cada caja se le pusieron 800 gr de alimento al inicio de la semana y se pesó el alimento restante al finalizar esta, para calcular el consumo de alimento por diferencia de peso. Se puso dicha cantidad de alimento, debido a que resultados de un estudio piloto realizado en nuestro laboratorio mostraron que esa cantidad de alimento era suficiente para alimentar 5 ratas en una semana. Cabe destacar que el alimento, Laboratory Rodent Diet 5001 es un alimento de calidad Premium para las ratas ya que contiene productos de origen marino como harina de pescado, que le confieren mayor cantidad de ácidos grasos omega 3 (Ficha Técnica ANEXO I). Por otro lado, el monitoreo de los niveles de glucosa en sangre se realizó mediante el método de glucosa capilar, utilizando un dispositivo comercial (Accu-Chek). Para esto, previo a la medición de la glucosa, las ratas se sometieron a un ayuno de 8 horas, inmediatamente después se realizó una pequeña incisión en la punta de la cola para extraer una gota de sangre, la cual se colocó en el glucómetro. Este procedimiento se realizó semanalmente durante los tres meses de la inducción de obesidad. El pesado y registro de peso corporal se

realizó de acuerdo al procedimiento estándar, de igual manera, una vez a la semana por todo el periodo de evaluación.

6.2 Evaluación de los cambios en la microbiota intestinal.

Con la finalidad de determinar si la obesidad produjo cambios en la composición de la microbiota intestinal, se determinó la proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en las heces de las ratas. Para esto, se tomaron muestras de heces de las ratas antes y después de la inducción de la obesidad. El día de la recolección, las heces se obtuvieron realizando el procedimiento estándar de sujeción de ratas de laboratorio y colocando un tubo eppendorf de 2 mL cerca de la cavidad anal de la rata debido a que esta maniobra induce que las ratas defequen espontáneamente. El mismo día de la recolección, se pesó una muestra de heces de aproximadamente 100 mg y se disolvió en 1.5 ml de solución salina fisiológica estéril. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm x 5 minutos. Se tomaron 50 μ L del sobrenadante y se colocaron en portaobjetos de vidrio limpios. Inmediatamente se realizó un barrido de la muestra con otro portaobjetos de vidrio para obtener un frotis. Después, el frotis se fijó con un mechero y se procedió a realizarla tinción de Gram de acuerdo al procedimiento descrito por el *Manual Básico de Microbiología*⁹⁷. Una vez teñidas las laminillas fueron cubiertas con Entellan (Merck), se colocó un cubreobjetos, y se les permitió un periodo de secado de al menos 12 horas antes de realizar el análisis microscópico. Para este procedimiento se analizaron las heces de 5 ratas por grupo y 2 laminillas por rata.

Finalmente, para cuantificar número de bacterias Gram positivas (*Firmicutes*) y Gram negativas (*Bacteroidetes*) presentes en las heces se realizó el análisis de las laminillas en un microscopio óptico con cámara digital (Carl Zeiss) a una magnificación de 100x. El conteo se realizó directamente al microscopio, cuantificando el número de bacterias presentes 5 campos distintos de la laminilla, cuatro a los extremos y el campo central. Los datos se presentan como el promedio de 2 laminillas por rata, y cinco ratas por grupo.

6.3 Efecto de tratamiento con probiótico en la obesidad

Con la finalidad de determinar si el tratamiento con un probiótico revertía los cambios inducidos por la obesidad inducida por sacarosa al 20 %, tales como el incremento de peso, los niveles de glucosa, la ingesta de alimento, así como los cambios en la microbiota intestinal, a ratas con o sin obesidad se les administró un tratamiento con el producto comercial: Sinuberase[®] que contiene esporas de *Bacillus clausii* en suspensión (Reg. No. 35955 SSA). El Sinuberase es un reconstituyente de la flora intestinal que contribuye a la recuperación de la flora microbiana alterada por diversas causas. Para esto se realizaron los siguientes grupos experimentales (n=10): Grupo 1: obesidad (sacarosa 20% por 3 meses) + probiótico disuelto en una solución de sacarosa al 20%; Grupo 2: obesidad (sacarosa 20% por 3 meses) + sacarosa 20%; Grupo 3: obesidad (sacarosa 20% por 3 meses) + probiótico disuelto en agua; Grupo 4: obesidad (sacarosa 20% por 3 meses) + agua; Grupo 5: agua por (por tres meses) + probiótico disuelto en

agua; y Grupo 5: Agua + agua (Figura 2). La duración del tratamiento con sinuberase o con agua después de la inducción tuvo una duración de dos meses. Durante este tiempo en todos los grupos se continuó con el monitoreo semanal de peso, ingesta de alimento y niveles de glucosa en sangre, siguiendo los procedimientos descritos en la sección anterior. Cabe destacar que las muestras de heces se obtuvieron antes del tratamiento (mes 3) y al final del tratamiento (mes 5)



Figura 3. Diseño experimental para determinar si el tratamiento con el probiótico Sinuberase revierte los cambios inducidos por la obesidad inducida por el consumo de sacarosa al 20%.

6.4 Procesamiento y análisis de datos

Los datos se presentan como el promedio de 10 animales \pm el error estándar de la media. El cálculo de área bajo la curva (AUC) se realizó mediante el método de los trapecios a partir de los cursos temporales de la medición de glucosa, consumo de

alimento y peso corporal. El procesamiento de los datos y los cursos temporales se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.

7 RESULTADOS

7.1 Modelo de obesidad

7.1.1 Inducción de Obesidad en rata

7.1.1.1 Consumo de Alimento en ratas con inducción a obesidad.

Se observó que en los grupos tratados con agua desde los 3 y hasta los 5 meses de ingesta, no hubo un cambio significativo, sin embargo, la ingesta de los grupos con sacarosa, se observó una diferencia significativa a los 3 y 5 meses, ya que desde el inicio que se incorporó la sacarosa al 20%, consumían menos alimento que aquellos, tratados con agua (Figura 6).

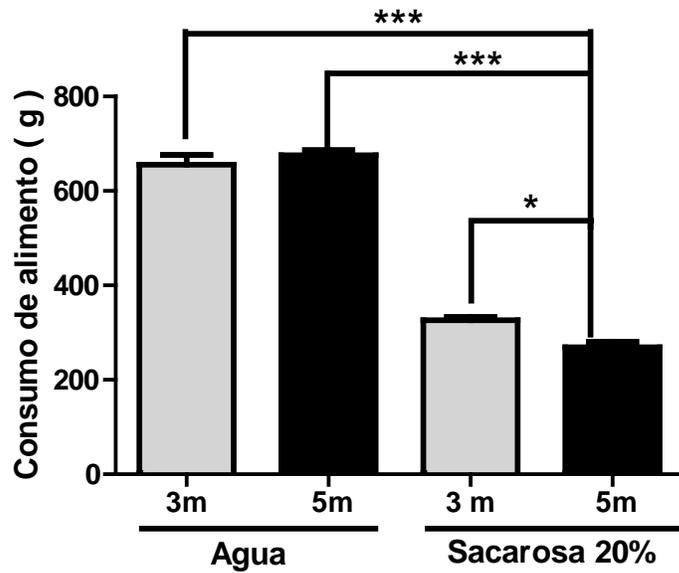


Figura 4. Consumo de Alimento del grupo con agua (3 y 5 meses) y sacarosa (3 y 5 meses) 20%. Prueba estadística, ANOVA post test Tukey's * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$

7.1.1.2 Incremento de Peso corporal en ratas inducidas a obesidad

En cumplimiento del primer objetivo, el modelo de obesidad fue inducido con dieta hipercalórica a base de sacarosa al 20% como agua de uso. Al comparar los cambios de peso en cada grupo experimental, el porcentaje de cambio de peso corporal en las ratas tratadas con sacarosa al 20% es significativamente elevado en un 50% ($P < 0.0001$) en comparación con las ratas tratadas con agua (Figura 7). Al final del periodo de inducción a obesidad, el grupo que continuó 2 meses más con la solución de sacarosa 20% (5 meses), tiene un porcentaje más elevado de cambio de peso en comparación con las ratas tratadas con agua ($P < 0.0001$). Por

lo tanto se puede mencionar que el efecto de la sacarosa sobre las ratas ayuda al aumento de peso en comparación con las ratas tratadas con agua de uso.

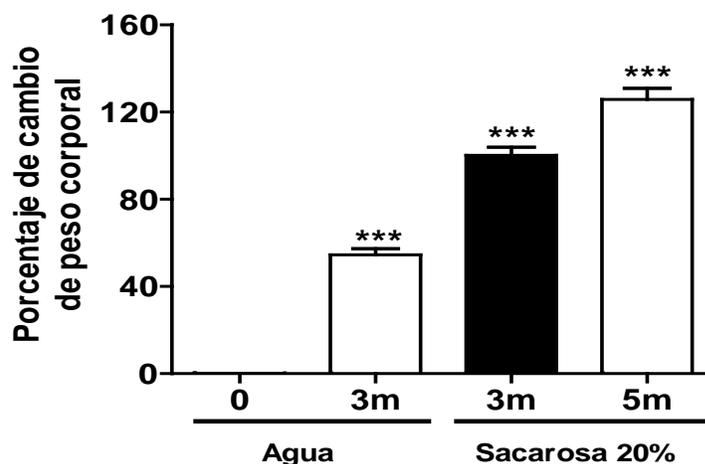


Figura 5. Porcentaje de cambio de peso corporal, de los grupos con sacarosa al 20% (3 y 5 meses) respecto al grupo con agua estéril (0 y 3 meses). Analizado con la prueba de t no pareada *** $P < 0.0001$ versus agua.

7.1.1.3 Niveles séricos de Glucosa

El análisis estadístico reveló que durante los 3 primeros meses de inducción con sacarosa al 20% y el grupo con agua, no presentaron una diferencia significativa. Sin embargo, se observó diferencia significativa en los grupos tratados con sacarosa al término de los 5 meses ($p < 0.05$; Figura 8). Al comparar los grupos con

sacarosa, se observa una diferencia significativa entre los 3 y 5 meses de inducción ($p < 0.05$).

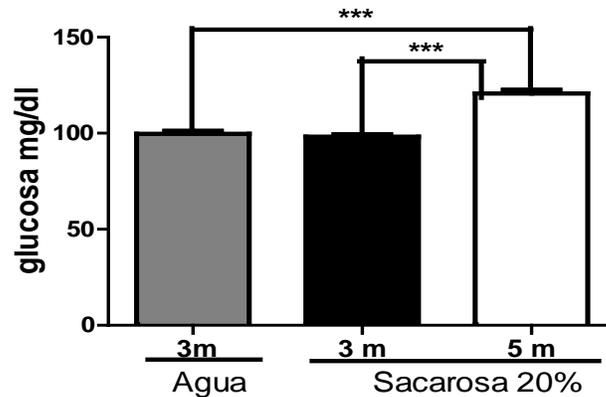


Figura 6. Hiperglucemia en ratas obesas. Glucosa medida durante los 3 y 5 meses de inducción con Sacarosa 20% en comparación con el grupo tratado con agua. Análisis estadístico ANOVA, post test Tukey's *** $P < 0.05$

Lo anterior sugiere que las ratas con sacarosa al 20% (5 meses, pero no la de 3 meses) puede inducir resistencia a la insulina, lo que se manifiesta con un incremento de los niveles de glucosa en ayunas. La obesidad crónica puede ser un factor de riesgo para la diabetes y la inducción de obesidad con sacarosa 20 %, durante 5 meses, puede ser considerado como un estado prediabético.

7.1.1.4 Identificación de Bacterias Gram (+) y Gram (-) en el modelo de inducción a obesidad.

La obesidad se ha relacionado con una mayor abundancia de *Firmicutes* (Gram +) y una disminución proporcional de *Bacteroidetes* (Gram -), por lo que en este trabajo se analizaron muestras biológicas (heces), esto con la finalidad de

observar la proporción de bacterias Gram (+) / Gram (-) de los grupos tratados con agua y sacarosa 20%.

Tabla 5. Proporción Bacterias Gram +/- en grupos con sacarosa y agua

TRATAMIENTO	GRAM+ (<i>Firmicutes</i>)	GRAM- (<i>Bacteroidetes</i>)
AGUA 3er mes	63%	37%
AGUA 5to mes	66%	44%
SACAROSA 3er mes	79%	21%
SACAROSA 5to mes	90%	10%

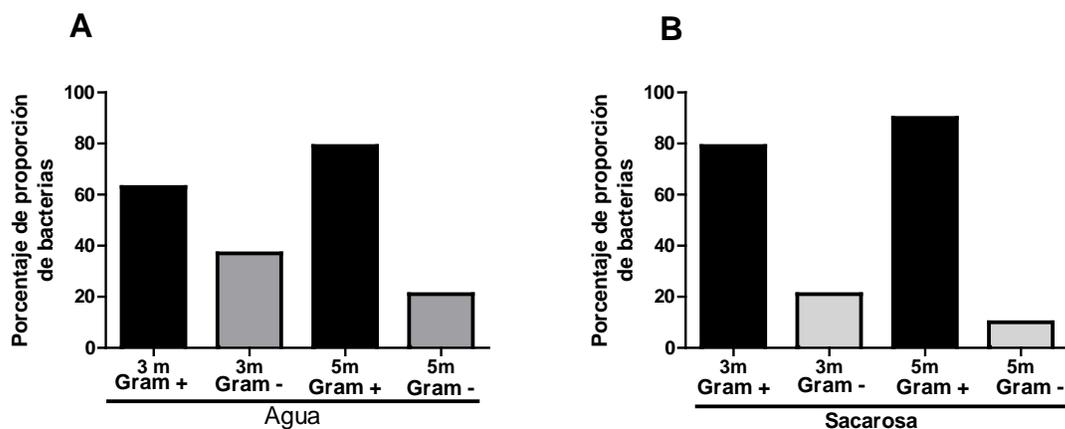


Figura 7. Porcentaje de bacterias Gram(-) y Gram(+), en grupos tratados con sacarosa 20%

Lo que se puede observar que los grupos con agua y una dieta normal a los 3 meses se observó un 63% de bacterias Gram (+) y un 37% de bacterias Gram (-), al final de los 5 meses cumplidos la proporción aumentó un 3% y 7% respectivamente. Para los grupos con sacarosa, en el tercer mes se obtuvo un 79% de bacterias Gram (+) y un 21% de bacterias Gram (-), sin embargo, aumentó a 90% y disminuyó a 10% respectivamente a los 5 meses con sacarosa

20%, por lo que el modelo de obesidad inducido con sacarosa cumple con lo descrito en la literatura, además comparado con el grupo de agua, el aumento a los 5 meses fue menor en comparación al grupo con sacarosa. En una evaluación realizada por Martínez 2017, utilizando cultivo MRS, un medio específico para bacterias ácido lácticas, se observó una mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en ratas con sacarosa al 20%, en comparación con las ratas tratadas con agua. En el medio enriquecido con Agar sangre y selectivo para Gram – (*Bacteroidetes*) también disminuyeron las unidades formadoras de colonias en el grupo de ratas obesas, en comparación con las ratas control (agua) $p < 0.001$.

7.1.2 Evaluación de los grupos tratados con probióticos.

7.1.2.1 Consumo de Alimento

Después del tratamiento con sacarosa al 20%, se suministró el probiótico (Sinuberase 8×10^{12} UFC) durante 2 meses en agua de uso. Al iniciar los tratamientos, podemos notar que al grupo al que se le cambió la sacarosa por agua y con probiótico, recuperan la ingesta de alimento, comparable con aquellos que solo tenían agua. Lo anterior no se observó en los grupos tratados con sacarosa + probiótico (Figura 10)

El grupo tratado con probiótico y sacarosa, redujo significativamente la ingesta de alimento en comparación con el grupo tratado exclusivamente con sacarosa

sugiriendo, que el probiótico puede ser clave importante en la disminución del apetito. No se mostró diferencia significativa en el grupo tratado con agua + probiótico comparado con el grupo que solo tenía agua, pero si es significativo con los grupos de sacarosa 20% (Figura 10).

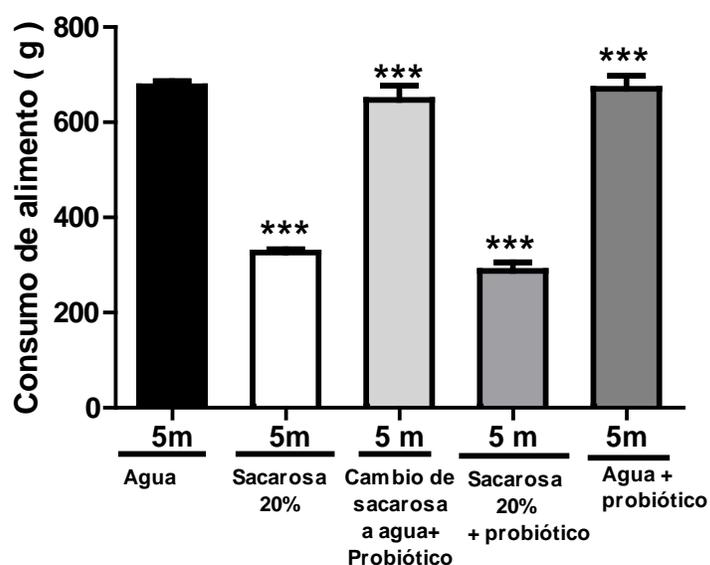


Figura 8. Consumo de Alimento durante el tratamiento con probiótico. Análisis estadístico ANOVA, post test Tukey's *** $P < 0.0001$

El alimento utilizado es Laboratory Rodent Diet 5001, un alimento de calidad Premium para las ratas. Contiene alimentos de origen marino, tal como harina de pescado, que le confieren mayor cantidad de ácidos grasos omega 3 (por lo que es importante pensar que podrían disminuir en cierto grado el ambiente pro-inflamatorio generado por la obesidad). Tiene como componentes principales

cáscaras de granos, frijol de soya, maíz, trigo, avena, los cuales son excelentes prebióticos y favorecerían el crecimiento de especies bacterianas benéficas.

Lo anterior sugiere que el uso de probiótico podría reducir el apetito, aunque el alimento también podría actuar como un prebiótico y estimular la saciedad.

7.1.2.2 Porcentaje de cambio de peso

Cómo se pudo observar anteriormente las ratas con sacarosa al 20% aumentaron de peso a los 5 meses, en comparación con los grupos con agua (Figura 7). Sin embargo, el grupo, con sacarosa 20% + probiótico, no tuvo un cambio de peso significativo al compararlo con el grupo de sacarosa 20% al término de los 5 meses ($p < 0.0001$) (Figura 10). Los resultados sugieren que el uso del probiótico de *Bacillus clausii*, aún en presencia de la dieta hipercalórica, podría participar como un producto antiobesogénico. Otro de los grupos evaluados en el proyecto fue aquel que inició con la dieta con sacarosa 20% por 3 meses, pero después se le cambió a una dieta, utilizando agua con el probiótico *Bacillus clausii* 8×10^{12} UFC. En la Figura 11 se puede observar que el grupo tratado con probiótico sí presentó una diferencia significativa ($P < 0.05$). El grupo que no fue inducido con sacarosa continuó su consumo habitual de agua durante los 3 meses y durante los dos meses restantes (5m) se incluyó el probiótico. No se presentó diferencia significativa al grupo de agua + probiótico, en comparación con agua. Sin embargo, ambos grupos tuvieron cambios significativos en comparación con el grupo obeso con sacarosa al 20% .

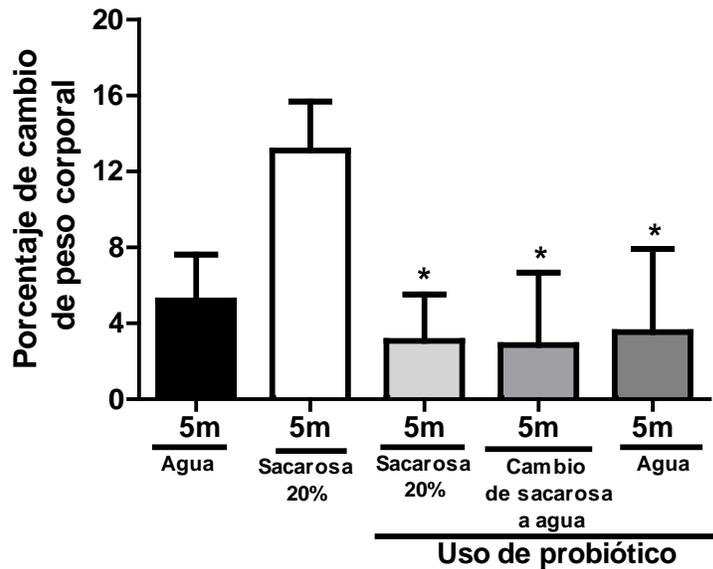


Figura 9. Efecto antiobesogénico del probiótico *Bacillus clausii*. Porcentaje de cambio de peso corporal, del grupo con agua, sacarosa al 20% y grupos con *Bacillus clausii*. Analizado con Prueba de t no pareada, * P < 0.05.

7.1.2.3 Niveles de Glucosa

En el grupo tratado con sacarosa + probiótico, se observó una disminución significativa aproximadamente a 90 mg/dl, en comparación, con el grupo tratado solo con sacarosa 120 mg/dl (P<0.05; Figura 12).

Existen algunos reportes en dónde los ratones tratados con probióticos (*Lactobacillus gasser*), no tienen efecto sobre la glucosa. Por lo tanto, los animales que consumen una dieta hipercalórica y además añaden *Bacillus clausii* como probiótico, podría regular los niveles de glucosa independientemente de la dieta. El cambio de sacarosa a agua de uso + probiótico, presentó un descenso significativo en comparación con el grupo con sacarosa 20% (Figura 12, P<0.05).

El grupo tratado con agua + probiótico, al término de los 5 meses del experimento, presentó un cambio significativo ($P < 0.05$) en comparación del grupo con agua y estos a su vez fueron significativos con el grupo tratado solo con sacarosa. Por lo que una dieta saludable y además el uso de probiótico, puede ayudar a mantener niveles de glucosa normales.

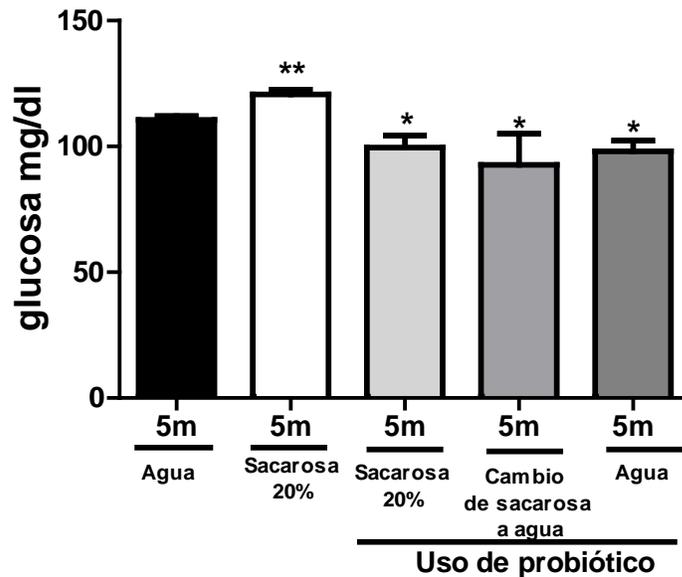


Figura 10. Niveles de glucosa de grupos con probiótico vs Sacarosa 20%. Análisis estadístico ANOVA, post test Tukey's $*P < 0.05$. Prueba de t no pareada Sacarosa 20% versus agua, Agua vs agua+probiótico $** P < 0.05$.

7.1.2.4 Identificación de Bacterias Gram + y Gram –

Posterior al análisis de la tinción de Gram del grupo con sacarosa 20% y agua, a los 3 y 5 meses, se continuó con el conteo de bacterias de los grupos tratados con probióticos.

En la Tabla y Figura 13, se observa la proporción *Gram (+)/ Gram (-)*, para todos los grupos experimentales a partir de los 3 meses hasta los 5 meses. El grupo tratado con agua + probiótico, se observó una disminución de las bacterias *Gram (+)* de 71 % a 66.5 % y *Gram (-)* aumentó de 29% a un 33.5%, comparándolo con el grupo de agua, por lo que el grupo con probiótico se ve beneficiado en su microbiota. Sin embargo, el grupo que fue tratado con sacarosa + probiótico, a partir de los 3 meses a los 5 meses, se observó que previo al probiótico, se tenía una proporción 95% *Gram (+)* y 5 % *Gram (-)* y al añadir el probiótico por 2 meses, bacterias *Gram (+)* disminuyó a un 65% y *Gram (-)* aumentó a un 35%, esto nos permite saber que el probiótico ayuda a restablecer la microbiota del animal además del alimento actuando como un prebiótico. Los grupos con cambio de dieta, de sacarosa a agua estéril con probiótico, ayudó a disminuir los *Firmicutes* de un 79% a 71% y a aumentar los *Bacteroidetes* de 21% a 29%, sin embargo para el grupo con probiótico aumentaron *Firmicutes* y disminuyeron *Bacteroidetes*.

Tabla 6 Proporción Bacterias Gram +/- en grupos tratados con probióticos.

TRATAMIENTO	GRAM+	GRAM-
Agua 3er mes	63%	37%
Agua 5to mes	66%	44%
Sacarosa 3er mes	79%	21%
Sacarosa 5to mes	90%	10%
Agua + prob 3er mes	71%	29%
Agua + prob 5to mes	66.50%	33.50%
Sac + prob 3er	95%	5%
Sac + prob 5to	65%	35%
cambio de sacarosa a agua+prob3er	79.00%	21.00%
Cambio de sacarosa a agua+prob 5to	71%	29%

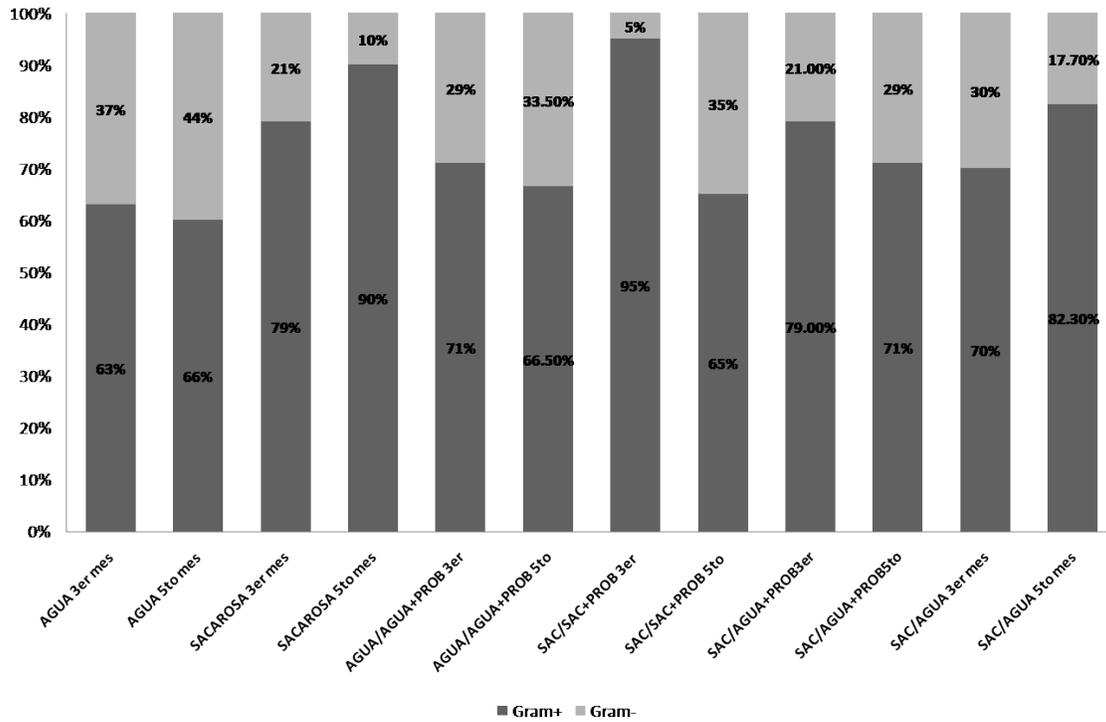


Figura 11. Gráfica de proporción de bacterias Gram +/ Gram –

En los grupos que cambiaron su dieta hipercalórica a una dieta con agua además de añadir probiótico, se logra ver un descenso de *firmicutes* en comparación a aquellas tratadas con sacarosa. Un efecto similar se observa con *bacteroidetes*, que aumentan en el primer mes y se reduce en el segundo mes. Lo anterior sugiere que una dieta libre de carbohidratos, podría ayudar a restablecer la microbiota intestinal. Martínez en 2017 realizó un cultivo con Agar MRS, y se observó una disminución de Unidades formadoras de colonias con los grupos que fueron previamente tratados con sacarosa durante los 3 meses de inducción a obesidad, y que posteriormente se les cambio a agua y se añadió probióticos, en comparación con las ratas tratadas con sacarosa ($P < 0.05$).

DISCUSION

En el presente estudio se evaluó el efecto del probiótico *Bacillus clausii*, en un modelo de obesidad inducido con dieta hipercalórica (sacarosa 20%), teniendo diferencias significativas en el aumento del peso corporal a los 3 y 5 meses de inducción con sacarosa, en comparación a las ratas tratadas solo con agua. Sin embargo, en otros reportes, el porcentaje de sacarosa utilizado es mayor, hasta 50% y es añadida al alimento durante 10 semanas.⁹⁴ También se utiliza sacarosa al 25% añadida al alimento más grasa 32%, aunque en estas condiciones no se observó diferencia significativa en el peso, comparado al control con agua⁹⁵, lo mismo se reportó en el estudio de Jie Yu y colaboradores.

En general, la dieta hipercalórica alta en carbohidratos o grasas es uno de los factores que causan la obesidad, y la ingesta a largo plazo induce un aumento significativo en el peso de la grasa abdominal. Por lo tanto, muchos investigadores en ciencias alimentarias se han concentrado en encontrar un alimento o bebida con una función que prevenga la obesidad inducida por la dieta hipercalórica.⁹⁹

Muchos estudios se han enfocado al uso de probióticos como antiobesogénicos. En este estudio se administró *Bacillus clausii*, un probiótico comercial y se observó que los grupos tratados con probiótico durante 2 meses, no aumentaron de peso en comparación con el grupo tratado con sacarosa. El estudio fue por 5 meses (20 semanas), con o sin tratamiento con probióticos. En el trabajo de Alard y colaboradores, el modelo de obesidad y el tratamiento con probióticos se realizan al mismo tiempo, durante aproximadamente 15 semanas, mientras que en nuestro modelo primero se induce la obesidad y después se somete el tratamiento con el

probiótico. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro trabajo es similar a los reportados por otros grupos en el uso de probióticos.

En algunos estudios se administra una mezcla de probióticos para potenciar su efecto sobre el peso corporal, nivel de glucosa, tamaño de adipocitos y la evaluación de células antiinflamatorias. Por lo que en un estudio posterior se podría combinar de *Bacillus clausii* con otro tipo de probiótico.

El aumento en los niveles de obesidad, debido a factores conductuales y culturales tales como la ingesta excesiva de alimentos dulces y altos en grasa y el ejercicio insuficiente, aumenta significativamente la incidencia de la diabetes tipo 2. La diabetes tipo 2 es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina. La hiperglucemia crónica de la diabetes tipo 2 también se asocia con daño a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, particularmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.⁵⁵

El uso de fármacos para el tratamiento de la hiperglucemia tiene algunas limitaciones por sus efectos secundarios. Se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de medicamentos tradicionales (ginseng, té verde, frutas de mora, gusanos de seda y extractos de hierbas, etc.) como tratamiento diabético complementario o alternativo, ya que estos productos naturales se han tomado durante años para diversas dolencias sin efectos secundarios o toxicidad.¹⁰⁰

En los últimos años, se ha informado que los probióticos, bacterias del ácido láctico (BAL) tienen eficacia relacionada con la progresión de la diabetes.^{57,38} Los

estudios, con BAL, previnieron o retrasaron el inicio de la diabetes en varios modelos experimentales, incluidos los animales alterados genéticamente (ratones db / db)⁵⁷. En este estudio se midieron los niveles de glucosa a todos los grupos tratados con /sin probióticos, además de los grupos tratados con sacarosa al 20%. De lo anterior se pudo observar que durante los 3 meses de inducción con sacarosa, no hubo diferencia significativa entre los grupos, y tampoco entre los tratados con agua, similar al estudio realizado por Ji Hee Kang y colaboradores, el cual no hubo cambios en glucosa en ratones tratados con *Lactobacillus gasseri* BNR17, pero si encontraron un efecto anti-obesogénico. Contrario a nuestro estudio, no hubo diferencia significativa en los 3 primeros meses, pero sí a los 5 meses de tratamiento con probiótico. Todos los grupos tratados con probiótico, tuvieron una diferencia significativa al compararlo con el grupo que tenía una dieta alta en carbohidratos (sacarosa 20%). Recientemente, muchos investigadores se han centrado en la relación del microbioma huésped-intestino de los mamíferos con la diabetes, lo que sugiere que los microorganismos intestinales desempeñan un papel importante en el metabolismo y la aparición de enfermedades. Cani et al. (2007) informaron que un aumento en el contenido de bifidobacteria intestinal se correlaciona de manera significativa y positiva con una mejor tolerancia a la glucosa, la secreción de insulina y el tono inflamatorio normalizado.

La microbiota desempeña un papel esencial en el metabolismo energético del huésped y constituye un complejo ecosistema que promedia 70 divisiones bacterianas diferentes que colonizan el intestino de un adulto. Sin embargo, el número específico y las actividades de estos microbios varían con respecto a los

factores ambientales; de hecho, el estado metabólico de estos grupos microbianos puede ser latente, lo cual es crucial para comprender y explicar el papel de la microbiota intestinal.

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino. El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos. En general, las personas con obesidad están asociadas a una menor diversidad en su microbiota intestinal, entendida como la cantidad de especies diferentes y la proporción en que se encuentran. Sin embargo, se ha demostrado que esta menor diversidad también se refleja en el número de genes presentes en el microbioma de los obesos y esto se correlaciona con la reducción de la salud metabólica⁵⁰. Jumpertz et al. (2011) muestran que los cambios en el perfil de las bacterias de la microbiota intestinal de las personas obesas están más directamente relacionados con los cambios en la composición de su dieta que la propia obesidad. Los altos niveles de grasa, los azúcares simples y las dietas bajas en fibra contribuyen a la disbiosis de la microbiota intestinal. Esta alteración es un importante factor de predisposición para la obesidad. Comparando la composición de la microbiota intestinal de ratones obesos genéticamente inducidos (ratones deficientes en leptina ob / ob) y ratones delgados, la obesidad se ha relacionado con una mayor abundancia de *Firmicutes* (Gram +) y una disminución proporcional de *Bacteroidetes* (Gram -).

Recientemente aumentaron los estudios de las diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre individuos obesos y delgados. Estos estudios han demostrado que la obesidad está asociada con un desequilibrio en la microbiota intestinal normal.⁵⁸ En adultos sanos, el 80% de la microbiota fecal identificada se puede clasificar en tres phyla dominantes: Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias. En general, se cree que la relación Firmicutes / Bacteroidetes es particularmente relevante para la composición de la microbiota humana. La proporción difiere en humanos obesos y delgados. Esta proporción disminuye con la pérdida de peso en una dieta baja en calorías. Los probióticos, que consisten en especies de bacterias vivas individuales o múltiples, como *Lactobacillus* y bifidobacterias, confieren un beneficio para la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas (Delzenne et al., 2011, FAO y OMS, 2001). Otros estudios también demuestran que algunos probióticos pueden usarse para controlar el peso corporal y los trastornos metabólicos (Lee et al., 2007). Entre ellos podría estar el probiótico *Sinuberace*, que reduce el peso corporal y regula los niveles de glucosa en ayunas.

Por último, el alimento utilizado podría funcionar como prebiótico ya que contiene diferentes tipos de fibra. Uno de sus componentes favorables es la lignina que es uno de los polímeros orgánicos más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono.

Estos componentes son sustrato de algunas bacterias intestinales y podría promover su proliferación; entre ellas están: Especies de Bacteroides, Clostridium, Peptostreptococcus y Eubacterium (Jandhyala et al, 2015). Otro de los componentes del alimento es el Frijol de soya descascarillado, que contiene isoflavonas, tales como: genisteína y daidzeína. Estas isoflavonas son sustrato de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

También es importante mencionar que las isoflavonas son fitoestrógenos y podrían participar en la regulación del recambio de las células epiteliales del intestino, principalmente en el duodeno donde se encuentra mayor cantidad de los receptores de estrógeno (ER-a y ER-b). Además, en humanos, los estrógenos tienen una actividad regulatoria en la secreción de bicarbonato a nivel duodenal, por lo que podría incluso modificar el pH intestinal (Tuo et al, 2011; Tuo et al, 2012). Otros de los componentes del alimento Premium es la Avena molida y la avena contiene β -glucanos, los cuales son polímeros de D-glucosa y son parte de la fibra soluble y fermentable. Algunas bacterias intestinales metabolizan estos polisacáridos y sintetizan ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato, propionato). Estos ácidos grasos tienen efectos moduladores de la secreción de hormonas anorexigénicas intestinales (PYY y GLP-1) que podrían disminuir el apetito de la rata. Por otra parte, las células del sistema inmunológica también poseen receptores para estos ácidos grasos (FFAR-3 y FFAR-2 o GPR41 y GPR43), la activación de dichos receptores inhibe la vía NF- κ B, por lo que genera un efecto antiinflamatorio a nivel intestinal siendo relevante en la permeabilidad intestinal (Martínez et al. 2013). Por lo tanto podrían conferir un efecto sinérgico

con el resto de los componentes de la dieta, por ejemplo los tratados con sacarosa, agua o probióticos.

CONCLUSION

La obesidad en humanos es ocasionada principalmente por hábitos dietéticos poco saludables (alto consumo de azúcares y alimentos fritos, bajo o nulo consumo de frutas y/o verduras, alto consumo de alimentos de origen animal), la cual puede reproducirse en los modelos experimentales con el consumo de sacarosa al 20%.

Una estrategia terapéutica dietética para el tratamiento de la obesidad puede ser la manipulación de la microbiota intestinal, a través del uso de probióticos como Sinuberase, los cuales pueden constituir alimentos funcionales.

El intestino alberga una comunidad diversa de bacterias comensales, en una relación de simbiosis con el anfitrión, que pueden influir en el metabolismo y parámetros bioquímicos del modelo experimental, regulando los niveles de glucosa.

La evidencia experimental y clínica muestra que la obesidad se correlaciona con cambios en la microbiota intestinal y los datos obtenidos sugieren que la manipulación de la microbiota intestinal mediante el uso de Sinuberase favorece

la pérdida de peso. También se reducen los niveles de glucosa y la grasa visceral en los grupos experimentales en comparación a los grupos control.

Así, el uso del probiótico Sinuberase, puede ayudar al control de peso y la glucosa en ayunas, por lo que podría funcionar como un tratamiento anti-obesidad o antidiabético, como el probiótico *Lactobacillus gasseri* reportado por Ji-HeeKang y colaboradores en el 2013.

10 . PERSPECTIVAS

- Evaluar el perfil lipídico de los grupos experimentales para determinar el efecto hipolipémico de *Bacillus clausii*.
- Realizar cortes histológicos de intestino grueso
- Realizar cortes histológicos de grasa visceral.
- Terminar el análisis de las curvas de tolerancia a la glucosa para cada grupo.
- Establecer el análisis genómico para determinar la composición de la microbiota intestinal antes y después del tratamiento con Sinuberase.
- Combinar más de un grupo de probióticos para establecer mecanismos sinérgicos en la regulación de peso, grasa visceral, niveles de glucosa y lípidos.

10 . BIBLIOGRAFIA

1. Haiming Cao. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. [J Endocrinol.](#) 2014
2. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes* 2005. Sep; 2008 32(9):1431–7.
3. Organización WH. Obesity and Overweight. World Health Organ Tech Rep Ser.2000;894(894):-xii,1-253.
4. Poirier P, Cornier MA, Mazzone T, et al. Bariatric surgery and cardiovascular risk factors: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123(15):1683-1701.
5. Cefalu, W. T., Bray, G. A., Home, P. D., Garvey, W. T., Klein, S., Pi-Sunyer, F. X., ... Ryan, D. H., et al. (2015). Advances in the science, treatment, and prevention of the disease of obesity: Reflections from a diabetes care editors' expert forum. *Diabetes Care*, 38(8), 1567–1582
6. Johnson, A. R., Milner, J. J., & Makowski, L. (2012). The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological Reviews*, 249(1), 218–238.
7. Feller S, Boeing H, Pischon T. Body mass index, waist circumference, and the risk of type 2 diabetes mellitus: implications for routine clinical practice. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 470–476.
8. Booth A, Magnuson A, Fouts J & Foster M (2015). Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2015; 21(1): 57–74

9. Eheman, S. J. Henley, R. Ballard-Barbash et al., "Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975–2008, featuring cancers associated with excess weight and lack of sufficient physical activity," *Cancer*, vol. 118, no. 9, pp. 2338– 2366, 2012.
10. Hussain SS BS. Treatment and management of obesity. *Posgrmed*. 2011;123 (1): 34-44
11. Rivera Ja, Barquera, Campirano F, Campos I, Safdie M, Tovar V. Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non communicable chronic diseases and obesity *Public Health Nutr*. 2002; 5 (1A):113-122.doi: 10.1079/PHN2001282.
12. States U. Obesity Update 2012. Update. 2012:1-7. doi:10.1787/888932523956
13. INEGI. Consulta interactiva de datos, defunciones generales, y lista mexicana de enfermedades. 2016. <http://www.inegi.org.mx/>
14. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernandez-Barrera L, et al. Obesity and central adiposity in Mexican adults : results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex*. 2009;51suppl 4(3):S595-S603.
15. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernandez-Barrera L, Pedroza A, Rivera Dommarco J a. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos 2002-2012. *Salud Publica Mex*.2013;55 Suppl 2(SUPPL):S151-S160
16. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 Informe Final de Resultados.

http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf

17. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynold K & He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity* (2008) 32, 1431–1437
18. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 2017; 390: 2627–42
19. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr.* 2012; 10(1):22. [PubMed: 23167948]
20. Berrington de Gonzalez, Phil D, Hartge P, James R. Cerhan, Ph.D., Alan J. Flint, Dr.P.H., Lindsay Hannan, M.S.P.H., Robert J. MacInnis, Ph.D., Steven C. Moore, Ph.D., Geoffrey S. Tobias, B.S., Hoda Anton-Culver, Ph.D., Laura Beane Freeman, Ph.D., W. Lawrence Beeson, Dr.P.H., Sandra L. Clipp, M.P.H., Dallas R. English, Ph.D., Aaron R. Folsom, M.D., D. Michal Freedman, Ph.D., Graham Giles, Ph.D., Niclas Hakansson, Ph.D., Katherine D. Henderson, Ph.D., Judith Hoffman-Bolton, Jane A. Hoppin, Sc.D., Karen L. Koenig, Ph.D., I-Min Lee, Sc.D., Martha S. Linet, M.D., Yikyung Park, Sc.D., Gaia Pocobelli, M.S., Arthur Schatzkin, M.D., Howard D. Sesso, Sc.D., Elisabete Weiderpass, Ph.D., Bradley J. Willcox, M.D., Alicja Wolk, Dr.Med.Sci., Anne Zeleniuch-Jacquotte, M.D., Walter C. Willett,

M.D., Dr.P.H., and Michael J. Thun, M.D. Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. NIH Public Access Author Manuscript N Engl J Med . Author manuscript; available in PMC 2011 June 02.

21. Flegal K, Ioannidis P. A meta-analysis but not a systematic review: an evaluation of the Global BMI Mortality Collaboration. *Journal of Clinical Epidemiology* 88 (2017) 21-29
22. Sharon M. Fruh Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management 2017 *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* 29 (2017) S3–S14
23. PI-SUNYER, F. XAVIER. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res.* 2002;10:97S–104S.
24. Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 2006;6:177–181
25. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994;93:2438– 2446
26. Schuster, MD, Vani Duvuuri. Diabetes Mellitus. Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio. Volume 19, number 1, januray 2002
27. Odegaard JI, Chawla A. Connecting Type 1 and Type 2 Diabetes through Innate Immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012; 2:a007724. [PubMed: 22393536]

28. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, et al. FAT SIGNALS-Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 2012;15(3):279-291. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.018
29. Secretaría de Salud. Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias; 2012. doi:9786077790624.
30. Shepherd A. Obesity: prevalence, causes and clinical consequences. *Nurs Stand.* 2009;23(5):51-58
31. Saydah S, Bullard KM, Cheng Y, Ali MK, Gregg EW, Geiss L, et al. Trends in cardiovascular disease risk factors by obesity level in adults in the United States, NHANES 1999–2010. *Obesity.* 2014;22(8):1888–95.
32. Rutter F, Nieuwenhuizen AG, Lemmens SG, Born JM, Westerterp-Plantenga MS. Acute stress-related changes in eating in the absence of hunger. *Obesity.* 2009;17(1):72-77
33. Despre's JP. Dyslipidemia and obesity. *Balliere's Clin Endocrinol Metab.* 1994;8:629–60.
34. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007;132:2087–2102
35. Wijnhoven TMA, van Raaij JMA, Spinelli A, Rito AI, Hovengen R, Kunesova M, et al. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative 2008: weight, height and body mass index in 6–9-year-old children. *Pediatr Obes.* 2013; 8(2):79–97. [PubMed: 23001989]

36. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy Balance and Obesity. *Circulation*. Jul 3; 2012 126(1):126–32. [PubMed: 22753534]
37. Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle Modification for Obesity: New Developments in Diet, Physical Activity, and Behavior Therapy. *Circulation*. Mar 6; 2012 125(9):1157–70. [PubMed: 22392863]
38. Li, G., Zhang, P., Wang, J., Gregg, E. W., Yang, W., Gong, Q., . . . Bennett, P. H., et al. (2008). The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: A 20-year follow-up study. *Lancet*, 371(9626), 1783–1789.
39. Polsky Sarit, Obesity, insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015, 22:277–282
40. Kitsantas P, Gaffney KF. Risk profiles for overweight/obesity among preschoolers. *Early Hum Dev*. 2010; 86(9):563–8. [PubMed: 20716472] .
41. Francis LA, Ventura AK, Birch LL, et al. Parent overweight predicts daughters' increase in BMI and disinhibited overeating from 5 to 13 Years. *Obesity*. 2007; 15:1544–1553. [PubMed: 17557992] .
42. Silventoinen K, Rokholm B, Kaprio J, Sørensen TI. The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies. *Int J Obesity*. 2010; 34:29–40.
43. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15718-23.

44. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59–65
45. Gevers D, Po M, Schloss PD, Huttenhower C (2012) Bioinformatics for the human microbiome project. *PLoS Comput Biol* 8(11):e1002779
46. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T et al (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346):174–180
47. Belizario JE, Napolitano M (2015) Human microbiomes and their role in dysbiosis, common diseases and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol* 6:1050
48. Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, Huttenhower C, Ley RE (2013) A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Comput Biol* 9(1):e1002863
49. Moeller AH, Li Y, Mpoudi Ngole E, Ahuka-Mundeke S, Lonsdorf EV, Pusey AE, Peeters M, Hahn BH, Ochman H (2014) Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(46):16431–16435

50. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 14(8):e1002533
51. Palmer DJ, Metcalfe J, Prescott SL (2012) Preventing disease in the 21st century: the importance of maternal and early infant diet and nutrition. *J Allergy Clin Immunol* 130(3):733–734
52. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L et al (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635–1638
53. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottière HM, Raes J, Ehrlich D, Doré J (2013) A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 62(1):146–158
54. Backhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor B, Sherman PM, Versalovic J, Young V, Finlay BB (2012) Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* 12:611–622
55. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2013) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148(6):1258–1270

56. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43:3380–3389
57. Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, Buurman WA, de Vos WM, Rensen SS (2013) Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21(12):E607–E615
58. Ostaff MJ, Stange EF, Wehkamp J Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* (2013) 5:1465–1483
59. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E The microbiome and innate immunity. 2016. *Nature* 535:65–74
60. Fuchs A, Colonna . A Natural killer (NK) and NK-like cells at mucosal epithelia: mediators of anti-microbial defense and maintenance of tissue integrity. 2011 *Eur J Microbiol Immunol* 1:257–266
61. Sangiuliano B, Perez M, Moreira D, Belizário J .2014 .Cell death associated molecular-pattern molecules: inflammatory signalling and control. *Mediators Inflamm* 2014:249784

62. Honda K, Littman DR (2016) The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535:75–84
63. Webb CR, Kobozev I, Furr KL, Grisham MB . Protective and pro-inflammatory roles of intestinal bacteria. 2016. *Pathophysiology* 23:67–80
64. Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang HY, Cohoon M, de Crécy-Lagard V et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. 2005. *Nucleic Acids Res* 33(17):5691–5702
65. Meijer K, de Vos P, Priebe MG (2010) Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:715–721
66. Round JL, Mazmanian SK The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. 2009 *Nat Rev Immunol* 9(5):313–323
67. Tremaroli V, Bäckhed F . Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. 2012 *Nature* 489:242–249
68. Miller MB, Bassler BL Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001 55:165–199
69. Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., et al., 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336,1262–1267.
70. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336:1268–1273

71. Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62,67–72
72. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022–1023
73. Cani DP, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. 2007. *Diabetologia* 50:2374–2383
74. Chatelier EL, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M et al (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500:541–546
75. Harley ITW, Karp CL. Obesity and the gut microbiome: striving for causality. (2012) *Mol Metab* 1(1–2):21–31
76. Almonacid DE, Kraal L, Ossandon FJ, Budovskaya YV, Cardenas JP, Bik EM, Goddard AD, Richman J, Zachary S, Apte ZS 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. (2017) *PLoS One* 12(5):e0176555
77. Cani DP, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50:2374–2383

78. Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, Dallinga-Thie GM, Zoetendal EG, de Vos WM et al (2012) The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 14:112–120
79. Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, Petersen KF, Kibbey RG, Goodman AL, Shulman GI (2016) Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 534(7606):213–217
80. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT (2012) Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489:231–241
81. Roberfroid MB (2007) Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 137(3):830s–837s
82. Roberfroid MB: Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1682S –1687S
83. Redman, M., Ward, E., Phillips, R., 2014. The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: a systematic review. *Ann. Oncol.* 25, 1919–1929.
84. Caricilli, A.M., Castoldi, A., Camara, N., 2014. Intestinal barrier: a gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5, 18–32.
85. Mekkes MC, Weenen TC, Brummer RJ, Claassen E .2014 The development of probiotic treatment in obesity: a review. *Benef Microbes* 5(1):19–28

86. Whelan K, Quigley EM (2013) Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 29(2):184–189
87. (Ji Y, Park S, Park H, Hwang E, Shin H, Pot B and Holzapfel WH (2018) Modulation of Active Gut Microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Diet Induced Obesity Murine Model. *Front. Microbiol.* 9:710)
88. Jeanne Alard, Véronique Lehrter, Moez Rhimi Irène Mangin, Véronique Peucelle, Anne-Laure Abraham, Mahendra Mariadassou, Emmanuelle Maguin, Anne-Judith Waligora-Dupriet, Bruno Pot, Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota *Environmental Microbiology* (2016) Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd (2016) 18(5), 1484–1497
89. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T: Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J* 1997; 44:357–365.
90. Yadav H, Jain S, Sinha PR: Antidiabetic effect of probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 2007; 23: 62–68.
91. Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, et al: Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Bio-technol Biochem* 2003; 67:14 21–14 24

92. Yadav H, Jain S, Sinha PR: Oral administration of Dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocina induced diabetes in rats. *J Dairy Res* 2008; 75: 189–195.
93. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T: Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J* 1997; 44:357–365.
94. Kang J-H, Yun S-I, Park M-H, Park J-H, Jeong S-Y, et al. (2013) Anti-Obesity Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in High-Sucrose Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE* 8(1): e54617. doi:10.1371/journal.pone.0054617
95. Gabrielli M, Lauritano EC, Scarpellini E, et al. (mayo de 2009). «*Bacillus clausii* as a treatment of small intestinal bacterial overgrowth». *Am. J. Gastroenterol.* **104** (5): 1327-8.
96. Loris R. Lopetuso, Franco Scaldaferri, Francesco Franceschi & Antonio Gasbarrini (2016) *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 10:8, 943-948,
97. Manual Básico de Microbiología CULTIMED .2003. Editorial Panreac Química S.A
98. Jie Yu, Jing Yang, Mizhuan Li, Xuesong Yang, Pan Wang & Jie Xu (2018) Protective effects of Chinese Fenggang zinc selenium tea on metabolic syndrome in high-sucrose-high-fat diet-induced obese rats. *Nature* 8:3528 DOI:10.1038/s41598-018-21913-w

99. Jumpertz Reiner ,Duc Son Le ,Peter J Turnbaugh ,Cathy Trinidad ,Clifton Bogardus ,Jeffrey I Gordon, Jonathan Krakoff. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 94, Issue 1, July 2011, Pages 58–65, <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>
100. Henning SM, Yang J, Hsu M, Lee RP, Grojean EM, Ly A, Tseng CH, Heber D, Li Z. Decaffeinated green and black tea polyphenols decrease weight gain and alter microbiome populations and function in diet-induced obese mice. *Eur J Nutr*. 2017 Sep 30. doi: 10.1007/s00394-017-1542-8.
101. Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R. and Delzenne, N.M. (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383.
102. Jumpertz Reiner ,Duc Son Le ,Peter J Turnbaugh ,Cathy Trinidad ,Clifton Bogardus ,Jeffrey I Gordon, Jonathan Krakoff. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 94, Issue 1, July 2011, Pages 58–65, <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>

Laboratory Rodent Diet

5001*

DESCRIPTION

Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 70 years.

Features and Benefits

- Managed Formulation delivers Constant Nutrition®
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Formulated for multiple species for single product inventory
- The rodent diet standard for biomedical research

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

Other Versions Available

- 5L0D PicoLab® Laboratory Rodent Diet (Mammal ester regime)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	8.0%
Moisture not more than	12.0%

INGREDIENTS

Dehulled soybean meal, ground corn, dried beet pulp, fish meal, ground oats, dehydrated alfalfa meal, cane molasses, brewer's dried yeast, wheat germ, whey, porcine animal fat preserved with BHA and citric acid, wheat middlings, porcine meat and bone meal, salt, calcium carbonate, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, folic acid, vitamin A acetate, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate, biotin, nicotinic acid, calcium pantothenate, dl-alpha tocopheryl acetate (form of vitamin E), vitamin B₁₂ supplement, riboflavin supplement, ferrous sulfate, manganese oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

Rats—All rats will eat varying amounts of food depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of food at one time.

Mice—Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Food should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

Hamsters—Adults will eat up to 14 grams per day.

For information regarding shelf life please visit www.labdiet.com.

021915

CHEMICAL COMPOSITION¹

Nutrients²			
Protein, %	25.0	Sulfur, %	0.36
Arginine, %	1.57	Sodium, %	0.39
Cystine, %	0.39	Chloride, %	0.64
Glycine, %	1.28	Fluorine, ppm	15
Histidine, %	0.62	Iron, ppm	240
Isoleucine, %	1.06	Zinc, ppm	85
Leucine, %	1.89	Manganese, ppm	75
Lysine, %	1.48	Copper, ppm	15
Methionine, %	0.59	Cobalt, ppm	0.91
Phenylalanine, %	1.11	Iodine, ppm	0.99
Tyrosine, %	0.77	Chromium (added), ppm	0.01
Threonine, %	0.97	Selenium, ppm	0.41
Tryptophan, %	0.28		
Valine, %	1.16	Vitamins	
Serine, %	1.18	Carotene, ppm	2.3
Aspartic Acid, %	2.81	Vitamin K, ppm	1.3
Glutamic Acid, %	4.74	Thiamin Hydrochloride, ppm	1.6
Alanine, %	1.44	Riboflavin, ppm	4.7
Proline, %	1.47	Niacin, ppm	120
Taurine, %	0.03	Pantothenic Acid, ppm	24
Fat (ether extract), %	5.0	Choline Chloride, ppm	2250
Fat (acid hydrolysis), %	6.4	Folic Acid, ppm	7.1
Cholesterol, ppm	209	Pyridoxine, ppm	6.0
Linoleic Acid, %	1.05	Biotin, ppm	0.30
Linolenic Acid, %	0.09	B ₁₂ , mcg/kg	51
Arachidonic Acid, %	0.02	Vitamin A, IU/gm	15
Omega-3 Fatty Acids, %	0.30	Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.6
Total Saturated Fatty Acids, %	1.48	Vitamin E, IU/kg	42
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.62	Ascorbic Acid, mg/gm	—
Fiber (Crude), %	3.3		
Neutral Detergent Fiber ³ , %	16.7	Calories provided by:	
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.9	Protein, %	29.829
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	47.5	Fat (ether extract), %	13.427
Starch, %	21.0	Carbohydrates, %	56.744
Glucose, %	0.19	*Product Code	
Fructose, %	0.27	1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.	
Sucrose, %	3.83	2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.	
Lactose, %	2.01	3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.	
Total Digestible Nutrients, %	73.8	4. ADF = approximately cellulose and lignin.	
Gross Energy, kcal/gm	4.69	5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.	
Physiological Fuel Value ⁵ , kcal/gm	3.33		
Metabolizable Energy, kcal/gm	2.91		
Minerals			
Ash, %	7.0		
Calcium, %	0.95		
Phosphorus, %	0.70		
Phosphorus (non-phytate), %	0.42		
Potassium, %	1.28		
Magnesium, %	0.23		

LabDiet
www.labdiet.com



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN**

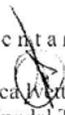
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Elizabeth Negrete León , estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula, 72201006 y que lleva por título **EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EFECTO DEL PROBIÓTICO *Bacillus clausii* EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATA INDUCIDA CON DIETA HIPERCALÓRICA**, ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente :

- I.) La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.
- II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos.
- III. Se rechaza.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr(a). América  Wette Barrera Molina
Sinodal Titular.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de enero de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Elizabeth Negrete León , estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 72201006, y que lleva por título EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EFECTO DEL PROBIÓTICO *Bacillus clausii* EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATA INDUCIDA CON DIETA HIPERCALÓRICA ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente :

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.
- II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos.
- III. Se rechaza.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente


Dr(a). D. Vanessa López Guerrero
Sinodal Titular.

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de enero de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Elizabeth Negrete León , estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 72201006, y que lleva por título EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EFECTO DEL PROBIÓTICO *Bacillus clausii* EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATA INDUCIDA CON DIETA HIPERCALÓRICA ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente :

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.
- II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos.
- III. Se rechaza.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr(a). Ollin Celgste Martínez Ramírez
Sinodal Titular .

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de enero de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN**

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Elizabeth Negrete León, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 72201006 que lleva por título **EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EFECTO DEL PROBIÓTICO *Bacillus clausii* EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATA INDUCIDA CON DIETA HIPERCALÓRICA**, ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente :

I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos.

III. Se rechaza.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr(a). Juan José Acevedo Fernández
Sinodal Suplente

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de enero de 2019.



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN

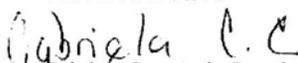
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. Elizabeth Negrete León, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 72201006 que lleva por título EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EFECTO DEL PROBIÓTICO Bacillus clausii EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATA INDUCIDA CON DIETA HIPERCALÓRICA, ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente :

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.
- II. Condicionada a que se modifique en algunos aspectos.
- III. Se rechaza.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente


Dr(a). Gabriela Castañeda Corral.
Sinodal Suplente

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 22 días del mes de enero de 2019.