



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"
División de Estudios de Posgrado

Tesis

"PERFIL DE ENTEROBACTERIAS Y ZONULINA SÉRICA EN NIÑOS
CON OBESIDAD"

Para obtener el título de:
Maestría en Ciencias de la Salud

P R E S E N T A:
Química Farmacobióloga
Carolina Cabrera Díaz

Directora de tesis
D. en C. Yunuen Quintero Silva

Codirector de tesis
D. en C. Juan José Valdez Alarcón



Agosto 2016, Morelia Michoacán, México

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece a Padrón de Posgrados de Excelencia
Del CONACYT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Recibió beca del CONACYT
Durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

Este trabajo fue realizado con recursos de los programas:

Apoyo para la incorporación de NPTC PROMEP (PTC-341)

Investigación 2014-2015 de la CIC UMSNH

“Concentración de Zonulina en suero y su relación con microbiota intestinal en niños obesos”

Este protocolo de investigación tiene la autorización del comité local de investigación y ética en investigación y salud 1602 H. regional no.1 Michoacán (R-2012-1602-43)

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la memoria de tesis que
presentó:

Química Farmacobióloga **Carolina Cabrera Díaz**

Doctora en Ciencias Fisiológicas

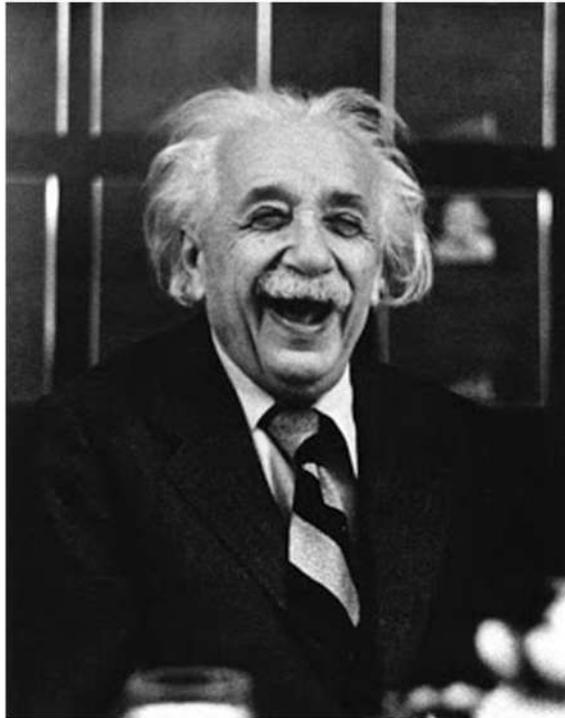
Bertha Fenton Navarro

Doctor en Ciencias Biomédicas

José Miguel Cervantes Alfaro

Doctor en Ciencias en Biotecnología

Eduardo Valencia Cantero



**"La alegría de
ver y entender
es el más
perfecto don de
la naturaleza."**

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis Padres por ¡TODO!

A mis asesores la D.C Yunuen y el D.C. Juan José por todo el tiempo, paciencia, recurso y sobre todo el conocimiento que me han brindado, no tengo palabras ni forma de agradecerles, fue un honor ser su estudiante.

Alguna vez escuche que una tesis no se hace sola, nunca había hecho una así que lo creí, ahora recapitulando todas las personas que mucho contribuyeron a este proyecto les agradezco infinitamente, para mi significo mucho...

¡SIN USTEDES NO HUBIERA PODIDO!

A los profesores

D.C. Bertha Fenton
D.C. J. Miguel Cervantes
D.C. Eduardo Valencia
D.C. A. Edith Higareda
M.C. Humberto Ruiz
D.C. M. Eva Viveros
D.C. Soledad Vázquez
D.C. Jesús Alveano
D.C. Javier Oviedo
D.C. Elvira Núñez
D.C. Marcos Cajero
D.C. Guadalupe Partida
Q.F.B. Rosa Alva

A mis compañeros
en la posta
Any
Clau
Samantha
Marvin
Ramón
Humberto
Andy
Mariana
Araceli
Ricardo
Octavio

Luis Omar
Daniela
Huante
Katy
Juan
Sandy

GRACIAS por guiarme, enseñarme, y contestar todas mis preguntas, GRACIAS por enseñarme ciencia.

Caro, Lind y Paco desde el día 1 en que nos aceptaron hasta el día final han estado ahí, toda la vida no me alcanzara para pagarles no solo el apoyo sino la amistad que me han brindado. Los quiero mucho.

Un agradecimiento de manera especial a la Q.F.B. Ma. Del Carmen Medina por todos estos años de apoyo incondicional, este trabajo también es suyo. ¡Gracias!

Para Rodri.... Es el resultado de todas tus horas



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
Dr. Ignacio Chávez



“PERFIL DE ENTEROBACTERIAS Y ZONULINA SÉRICA EN NIÑOS CON OBESIDAD”

Introducción: La obesidad infantil es una patología metabólica altamente prevalente en nuestro país. Numerosos resultados sugieren que los cambios en la composición de la microbiota intestinal participan en el desarrollo de la obesidad. Se ha observado que la cantidad de enterobacterias aumentan considerablemente en personas con obesidad respecto a las personas eutróficas. Uno de los efectos de las altas cantidades de enterobacterias es el aumento de la respuesta inflamatoria mediada por proteínas y citoquinas. Una proteína llamada zonulina es secretada como respuesta a la inflamación y es la única proteína conocida como mediador fisiológico con capacidad de regular las uniones estrechas intercelulares del lumen intestinal, permitiendo un aumento de la internalización de nutrientes y por ende aumentando la captación energética.

Objetivo general: Identificar la posible correlación entre los perfiles de algunas enterobacterias con la concentración sérica de zonulina y un alto percentil de IMC para la edad en niños eutróficos sanos y obesos sin ninguna otra patología agregada.

Material y métodos: El estudio se realizó en 72 niños de 5 a 12 años. Se evaluaron parámetros antropométricos y bioquímicos; se cuantificó la concentración de Zonulina sérica por medio de la técnica de ELISA. Se realizó extracción de ADN de muestras fecales, se cuantificó relativamente enterobacterias por medio de la técnica PCR en tiempo real (Q-PCR) utilizando oligonucleótidos específicos.

Resultados: Se prefirió por la utilización del método de extracción BIOLINE por su relación 260/280 cercano a 1.8. Se obtuvieron ocho pares y sondas de oligonucleótidos específicos con un solo producto final de amplificación, probados en ecologías bacterianas. Se utilizaron cuatro de los ocho pares y sondas encontrados y se realizaron las rectas patrón correspondientes, estos fueron para bacterias totales, enterobacterias, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, la comparación relativa de enterobacterias es estadísticamente diferente con una $p=0.001$, para *Escherichia coli* una $p=0.018$. La cuantificación de zonulina sérica presentan una media= $597.80 \pm 372.94 \mu\text{g/mL}$ para niños eutróficos sanos y una media= $1060.23 \pm 573.62 \mu\text{g/mL}$ para niños con obesidad, presentando una diferencia estadísticamente significativa, con una $p=0.023$. Se encontraron correlaciones positivas de zonulina con las siguientes mediciones: percentil ($R^2=0.398$; $p=0.001$), glucosa ($R^2=0.300$; $p=0.014$), urea ($R^2=0.365$; $p=0.003$), BUN ($R^2=0.398$; $p=0.003$), creatinina ($R^2=0.310$; $p=0.011$), colesterol total ($R^2=0.303$; $p=0.013$), neutrófilos ($R^2=0.291$; $p=0.017$) y correlaciones negativas con fosforo ($R^2=-0.250$; $p=0.043$), linfocitos ($R^2=-0.343$; $p=0.004$) y DHL ($R^2=-0.039$; $p=0.001$).

Conclusión: No se encontró una correlación entre los niveles séricos de zonulina y los niveles de enterobacterias en esta población de estudio.

Palabras clave: Microbiota/ Obesidad/ Enterobacterias/ Niños/ Zonulina



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
Dr. Ignacio Chávez



“ENTEROBACTERIA PROFILE AND CIRCULATING ZONULIN IN OBESE CHILDREN”

Introduction: Childhood obesity is a highly prevalent metabolic disease in our country. Numerous results suggest that changes in gut microbiota composition are involved in obesity development. It has been observed that the amount of *Enterobacteriaceae* increase noticeably in obese people in relation to eutrophic people. One effect of high amounts of *Enterobacteriaceae* is the increase of inflammatory response mediated proteins and cytokines. A protein called zonulin is secreted in response to inflammation and is the only protein known as a physiological mediator capable of regulate intercellular tight junctions of the lumen allowing an increase in absorption of nutrients and thus increasing energy income.

General Objective: The principal goal of this study was to identify any correlation between the profiles of *Enterobacteriaceae* with serum concentration of Zonulin and a high percentile of Body Mass Index in both, eutrophic and obese children without pathologies.

Material and Methods: We studied 72 children, school age. Anthropometric and biochemist parameters were evaluated. Serum concentration of Zonulin was quantified by ELISA test. DNA isolation from fecal was tested in four different techniques. *Enterobacteriaceae* profile was established by Q-PCR.

Results: For DNA isolation Bioline kit showed best index 260/280 as well as integrity. Eight pairs of specific oligonucleotides were obtained from bibliography research with an specific amplification product. Just four of the eight pairs of oligonucleotides were used and straight corresponding pattern, for total bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Relative quantification of *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* were statistically different in eutrophic and obese with a significance of (0.001) and (0.018) corresponding. Serum zonulin showed a mean of 597.80 ± 372.94 $\mu\text{g/mL}$ for eutrophic and a mean of 1060.23 ± 573.62 $\mu\text{g/mL}$ for obesity child giving a significance of $p=0.023$. Zonulin showed positive correlation with Percentil ($R^2=0.398$; $p=0.001$), Glucose ($R^2=0.300$; $p=0.014$), Urea ($R^2=0.365$; $p=0.003$), BUN ($R^2=0.398$; $p=0.003$), Creatinine ($R^2=0.310$; $p=0.011$), Total cholesterol ($R^2=0.303$; $p=0.013$), Nutróphil ($R^2=0.291$; $p=0.017$), besides negative correlations were showed in zonulin with Phosphorus ($R^2=-0.250$; $p=0.043$), lymphocyte ($R^2=-0.343$; $p=0.004$) and DHL ($R^2=-0.039$; $p=0.001$).

Conclusions: In this study no correlation was found in serum levels of zonulin and *Enterobacteriaceae* levels.

Key words: Microbiota/ Obesity/ Enterobacteria/ Children/ Zonulin

ABREVIATURAS

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Q-PCR	PCR en tiempo real
Ct	Ciclo en fase exponencial en PCR (threshold Cycle)
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
mL	Mililitros
L	Litros
Kg	Kilogramos
G	Gramos
Mg	Microgramos
Ng	Nanogramos
mmol	Milimoles
Mg	Miligramos
U	Unidades

CDC	Centro para el control de Enfermedades
s	Segundos
min	Minutos
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en ingles)
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
SSA	Secretaria de Salud
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
BHI	Infusión Cerebro Corazón
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
nm	Nanómetros
MO	Microorganismo
IMC	Índice de Masa Corporal

RELACIÓN DE FIGURAS

1.- Estructura del genero Enterobacteriaceae. -----	5
2.- Mecanismo de liberación de zonulina por inducción de Gliadina. -----	23
3.- Mecanismo propuesto a través del cual Zonulina. -----	24
4.- Fases de cinética de reacción de PCR en tiempo real. -----	33
5.- Gel de agarosa 0.8% de extracciones de DNA -----	43
6.- Electroforesis de extracción con kit BIOLINE. -----	44
7.- Recta patrón para Bacterias totales. -----	48
8.- Recta patrón para Enterobacterias. -----	48
9.- Recta patrón para <i>Klebsiella pneumoniae</i> . -----	49
10.- Recta patrón para <i>Escherichia coli</i> . -----	49
11.- Geles de agarosa 1% de las rectas patrón -----	50
12.- Comparación de la concentración de Bacterias totales. -----	52
13.- Comparación de la concentración de Enterobacterias. -----	53
14.- Comparación de la concentración de <i>Escherichia coli</i> . -----	54
15.- Comparación de la concentración de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . -----	55
16.- Concentración de zonulina respecto a la clasificación de obesidad.-----	57
17.- Concentración de zonulina sérica con respecto al percentil. -----	58

RELACIÓN DE TABLAS

1.- Enterobacterias más importantes ----- 6

2.- Características bioquímicas de enterobacterias ----- 16

3.- Comparación de edad y género entre los dos grupos ----- 38

4.- Química sanguínea de nuestro grupo de estudio.----- 39

5.- Perfil lipídico de nuestro grupo de estudio. ----- 40

6.- Pruebas de funcionamiento hepático de los grupos de estudio. ----- 41

7.- Electrolitos séricos de los grupos de estudio----- 42

8.- Parámetros hematológicos del grupo de estudio----- 43

9.- Relación de la secuencia de los oligonucleótidos específicos----- 45

10.- Cuantificación de bacterias en niños eutróficos y con obesidad. ----- 56

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Introducción -----	1
Justificación -----	26
Hipótesis de Trabajo -----	28
Objetivos -----	29
Material y Métodos -----	30
Resultados -----	38
Discusión -----	61
Conclusiones -----	65
Bibliografía -----	66

Total de Páginas: 87

INTRODUCCION

La obesidad es una patología metabólica de prevalencia alta en México, y constituye un gran problema de salud. Se ha demostrado que el apetito por sí solo no es el único factor causante de la obesidad, sino que situaciones como el aburrimiento, la tristeza o la depresión condicionan la ingesta de alimentos sin hambre y este tipo de conductas es observada mayoritariamente en personas del sexo femenino (Pérez-Morales et al 2013). Esta patología es clasificada como multifactorial, en la que se ha considerado que intervienen los factores de la alimentación, el sedentarismo, factores genéticos y ambientales, además en los últimos años se han publicado resultados en los que se demuestran que la composición de la microbiota intestinal es otro factor a considerar en la presencia o ausencia de la obesidad. La microbiota intestinal juega un papel importante en la homeostasis del funcionamiento del intestino, ya que estimula su desarrollo, mantiene el recambio epitelial y modula la respuesta inmunológica (Rodríguez et al 2013).

MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD

El intestino humano contiene microorganismos, llamados colectivamente microbiota, que consiste en por lo menos 10^{13} microorganismos, predominantemente bacterias anaerobias, entre 500 y 1000 especies aproximadamente; la microbiota puede ser vista como un “órgano” metabólico ajustado a nuestra fisiología y realizando funciones como digerir componentes dietéticos indigeribles para el ser humano, tales como polisacáridos de plantas. (Bäckhed et al, 2004). El estómago y el duodeno albergan un reducido número de microorganismos que se adhieren a la superficie mucosa o en tránsito, típicamente menos de 10^3 células bacterianas por gramo de contenido. Las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas destruyen la mayor parte de microorganismos ingeridos, y la actividad motora propulsiva impide una colonización estable de la luz intestinal. El número de bacterias a lo largo del yeyuno y el íleon aumenta progresivamente, desde alrededor de 10^4 en el yeyuno hasta 10^7 unidades

formadoras de colonias por gramo de contenido en el extremo ileal, con un predominio de aerobios Gram negativos y algunos anaerobios obligados. En comparación, el intestino grueso está densamente poblado de anaerobios y los recuentos de bacterias alcanzan densidades de alrededor de 10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo de contenido luminal (concentraciones 10.000 veces mayores que en la luz ileal). (Guarner 2007).

Estas bacterias participan en la depuración de toxinas provenientes de la dieta; biosíntesis de micronutrientes como vitamina K, vitamina B12 y ácido fólico, fermentación de carbohidratos indigeribles, absorción de electrolitos y minerales, producción de ácidos grasos de cadena corta, los que estimulan el crecimiento y desarrollo de los enterocitos y colonocitos. (Farías et al 2011). El efecto metabólico de la microbiota en relación con la extracción de la energía se entiende gracias al rol que juegan estas bacterias al transformar nutrientes complejos como fibra dietética y mucina en azúcares simples y ácidos grasos de cadena corta. Sin el efecto de la microbiota intestinal tanto la fibra dietética como la mucina serían eliminadas en la materia fecal; por otra parte se ha observado que el proceso de colonización no solo mejora la extracción de energía de los alimentos sino que aumenta la capacidad de almacenamiento en los adipocitos, mediante la modificación en la expresión de genes que influyen en el metabolismo de lípidos y glúcidos. (Farías et al 2011). Una inequívoca evidencia de que la microbiota intestinal es esencial para la vida y el metabolismo y está dada por el hecho de que los mamíferos que crecen libres de gérmenes y no adquieren su microbiota intestinal normal al nacimiento, suelen tener un desarrollo corporal anormal con pared intestinal atrófica y motilidad alterada, metabolismo reducido, corazón, cifras elevadas de colesterol en sangre y un sistema inmunológico inmaduro con niveles bajos de inmunoglobulinas y sistema linfático atrófico. (Macpherson et al 2001)

Estos microorganismos han convivido con nosotros formando relaciones de mutuo beneficio (simbiosis), que son típicamente fundadas en una colaboración nutricional. Una de las manifestaciones de esta relación simbiótica es el proceso microbiano de componentes de la dieta que proporcionan una cantidad de energía

extra en los depósitos de grasa del hospedero. La habilidad de almacenar energía pudo ser benéfica para antiguos humanos quienes tenían una ingesta de comida variable. Sin embargo, en la actualidad, las sociedades poseen libre acceso a abundantes porciones y altas cargas calóricas en sus dietas, cambiando este “beneficio” por un deterioro. (Bäckhed et al, 2004); la abundancia o escasez de alimento determinara la presencia o no de especies bacterianas que se producen bien cuando hay disponibilidad limitada de alimentos o de especies más eficientes cuando los nutrientes son escasos. (Icaza-Chávez ME, 2013).

Se especula que los cambios en la microbiota intestinal impulsados por dietas occidentales y/o las diferencias en la microbiota de los individuos de dichas sociedades pueden funcionar como un factor “ambiental” que predispone al almacenamiento de energía y a la obesidad. (Bäckhed et al, 2004).

En años recientes la perturbación de la microbiota intestinal, también conocida como disbiosis, y su relación con la prevalencia y el desarrollo de la obesidad ha sido confirmada, sin embargo los reportes no han sido concluyentes (Tsukumo et al 2014), debido a la cantidad de variables que intervienen en la identificación de la microbiota, y por lo tanto no ha habido un consenso acerca de cuáles son los componentes causales de dicha disbiosis. Karlsson y colaboradores en el 2012 demostraron las diferencias específicas en grupos bacterianos del intestino en niños preescolares con peso normal y peso corporal excesivo; encontraron por primera vez una diferencia significativamente elevada en cantidad de copias de DNA de la familia *Enterobacteriaceae* en sujetos del grupo Sobrepeso/Obesidad en comparación con niños de peso normal. También encontraron una significancia en las cantidades de los géneros *Akkermansia muciniphila-like* (este género favorece el microambiente para el desarrollo de *Desulfovibrio*) y *Desulfovibrio* encontrándose más elevados en el grupo de niños con peso normal. (Karlsson 2012).

Más tarde, en el 2013 un estudio en Shanghái, China, por Fei y Zhao se encontró en un 35% de aislados a la especie Enterobacter cloacae, genero perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, estos aislados fueron realizados en voluntarios adultos con obesidad mórbida (Peso 174.8 Kg, Índice de Masa Corporal 58.8 Kg/m) quienes presentaban Diabetes, Hipertensión y otros deterioros metabólicos serios. Tras una intervención de 23 semanas, con modificación con medicina tradicional china y la incorporación de prebióticos se observó tras la 9° semana que la población de Enterobacter cloacae en el intestino de los voluntario estaba disminuida en un 1.8%, y se volvió indetectable al término de la intervención de 23 semanas, momento en el que los pacientes presentaban una disminución en el IMC. (Fei y Zhao 2013)

Los géneros de la familia Enterobacteriaceae forman parte de la microbiota del intestino, constituyen un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Habitualmente colonizan las diferentes mucosas, especialmente las del tracto gastrointestinal y urinario. Son microorganismos con forma de bastón, de 1 – 3 µm de largo y 0.5 µm de diámetro.

ENTEROBACTERIAS

Las principales características de las enterobacterias es que son anaerobios facultativos, reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones), no licuan el alginato, fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella, son oxidasa-negativos, producen catalasa, no ven favorecido su crecimiento por la presencia de NaCl, y la mayoría son móviles (con flagelos peritricos) (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010). Algunos de ellas como Escherichia coli, Salmonella typhymurium y Shigella flexneri prefieren un crecimiento en ambientes a un pH neutral, también llamadas neutralófilos (Bearson et al 1996).

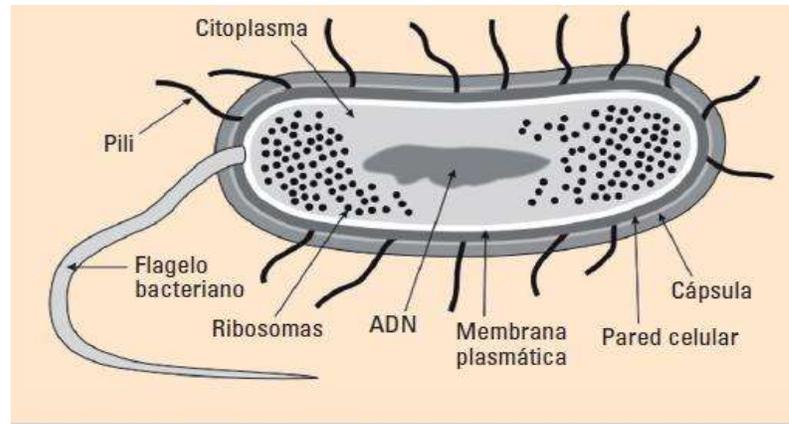


Fig. 1. Estructura del género *Enterobacteriaceae*.

En sus hábitats naturales la familia Enterobacteriaceae está bajo constante ataque de un amplio orden de generadores de estrés ambientales. Una de las condiciones hostiles más frecuentes encontradas es el estrés ácido. Los neutralófilos, como los antes mencionados, deben soportar pH's extremadamente bajos mientras viajan a través del sistema gastrointestinal, así como la presencia también de ácidos grasos volátiles presentes en el intestino y en las heces. Es así que deben tener la habilidad de percibir y responder a cambios potencialmente letales de pH; crucial para la supervivencia de la familia Enterobacteriaceae. (Bearson et al 1996)

Puerta-Garcia y Mateos-Rodriguez en el 2010 enlistaron las enterobacterias de mayor prevalencia desde el punto de vista clínico, los géneros *Escherichia*, *Klebsiella* y *Salmonella* son los de mayor prevalencia seguidos de *Shigella*, *Enterobacter*, *Yersinia* y *Serratia* y en menor proporción *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*.

<u>Enterobacterias importantes desde el punto de vista clínico</u>	
Género	Especie
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca, K. granulomatis</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. entérica</i>
<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri, S. sonnei, S. boydii, S. dysenteriae</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes, E. cloacae, E. sakazakii</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, Y. pestis</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris, P. mirabilis</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii, C. amalonaticus, C. koseri (o C. diversus)</i>
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
<i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri, P. stuartii</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>P. shigelloides</i>
<i>Edwarsiella</i>	<i>E. tarda</i>
<i>Erwingella</i>	<i>E. americana</i>

Tabla 1: Enterobacterias más importantes desde el punto de vista clínico. (Modificado de Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010)

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica compleja compuesta por diferentes tipos de antígenos de superficie.

- Antígeno O o somático, es parte de un lipopolisacárido que se encuentra en la pared celular. Este lipopolisacárido tiene tres fracciones:
 - Región uno: oligosacárido que contiene al Antígeno O.
 - Región dos: polisacárido central constante para un género determinado.
 - Región tres: dado por el lípido A, que constituye la endotoxina.

- Antígeno K o capsular, que está presente sólo en algunas bacterias capsuladas como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.
- Antígeno Vi es un polisacárido que rodea a la bacteria sin llegar a ser una cápsula y es característico de algunas especies del género *Salmonella*.
- Antígeno H o flagelar es proteico, es específico de especie y está presente sólo en las especies móviles.
- Antígeno F o fimbrial: presente en las fimbrias. Son de naturaleza proteica.

Factores determinantes de patogenicidad:

Cada especie bacteriana cuenta con una batería de moléculas que le permiten causar la patología particular. Algunas de ellas son:

- La cápsula tiene propiedades de adhesina y es antifagocitaria.
- Las fimbrias permiten la adherencia a la célula huésped e impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo.
- Algunas especies producen exoenzimas como ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa, las cuales actúan permitiendo la sobrevivencia de la bacteria dentro del órgano afectado.
- Debido a que el hierro es indispensable para ciertas funciones de las bacterias, estos microorganismos producen aerobactinas que permiten la captación de hierro desde el medio.
- Todas las enterobacterias poseen el lipopolisacárido (LPS) de pared, el cual tiene acción de endotoxina, la cual se libera al destruirse la bacteria.
- Exotoxinas: no todas las especies las producen. Sólo son producidas por las patógenas obligadas y poseen efectos específicos.

PRUEBAS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

MEDIOS DE CULTIVO

Pueden ser selectivos o diferenciales que permitan favorecer el crecimiento o poner en evidencia características bioquímicas específicas de las enterobacterias.

Los más utilizados son:

Agar McConkey

Es un medio diferencial utilizado en la detección, aislamiento y enumeración de bacterias coliformes y patógenas intestinales, en aguas, productos lácteos y muestras biológicas, su acción diferencia radica en que las bacterias hábiles de fermentar lactosa provocan un descenso en el pH, junto con una absorción del colorante, surgiendo en la colonia un color rojo. Las colonias de bacterias no fermentadoras quedan incoloras.

Agar *Salmonella Shigella*

El agar *Salmonella Shigella* es una modificación del agar citrato desoxicolato. Se le considera un medio moderadamente selectivo según el nivel de inhibición de los microorganismos Gram positivos y *Enterobacteriaceae* diferentes de *Salmonella* y *Shigella*, que inhibe por contenido de sales biliares, verde brillante y citratos. La diferenciación de los microorganismos entéricos se logra mediante la incorporación de lactosa en el medio. Los organismos que fermentan la lactosa producen ácido que, en presencia del indicador rojo neutro, propicia la formación de colonias de color rojo. Los organismos no fermentadores de la lactosa forman colonias incoloras. El tiosulfato sódico y el citrato férrico permiten la detección de producción de ácido sulfhídrico, como lo demuestran las colonias con centros de color negro. Este medio se utiliza para el aislamiento primario de *Salmonella* a partir de muestras fecales humanas.

Eosina y azul de metileno o EMB

Es un medio utilizado para aislamiento de bacilos entéricos Gram (-) principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*. Permite la diferenciación de colonias fermentadoras de lactosa y/o sacarosa. Las peptonas presentes en este medio proveen fuente de Nitrógeno, la Eosina y el azul de metileno son colorantes que se combinan para formar un precipitado a pH ácido y estos colorantes actúan como inhibidores e indicadores. Las bacterias fermentadoras de lactosa o sacarosa acidifican el medio y la eosina vira dando lugar a la aparición de colonias

oscuras, de color rosado a verde brillante. Las bacterias que no fermentan la lactosa originan colonias claras o transparentes.

Verde Brillante

Medio altamente selectivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella* (excepto de *S. typhi*), la alta selectividad del medio permite inóculos moderados y pesados. En este medio, las peptonas y el extracto de levadura proporcionan la fuente de Nitrógeno, vitaminas y minerales. La lactosa y sacarosa son los carbohidratos fermentables. El rojo de fenol es el indicador con un viraje de color a amarillo con cambio de pH. Este medio es inhibidor de microorganismos Gram (+). (Koneman 1999).

Sulfito de Bismuto

Se utiliza para el aislamiento selectivo de *Salmonella typhi*, y otras Salmonelas. El verde brillante y el sulfito de bismuto inhiben la flora acompañante. Las colonias de *Salmonella* H₂S positivas presentan ennegrecimiento del medio después de 18 hrs debido al sulfuro de hierro presente, la reducción de iones de bismuto a bismuto metálico produce un brillo metálico sobre las colonias de *Salmonella* luego de 48 hrs. Las colonias aparecen como blanco-amarillentas con centro negro, lustre metálico rodeado de un precipitado negro. Se utiliza para otros bacilos entéricos como los del género *Shigella*.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Las pruebas bioquímicas se basan en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas (catalasas, coagulasas, decarboxilasas, deaminasas, ureasas, peroxidasas, etc) involucradas en el metabolismo bacteriano, pueden ser evidenciadas en medios de cultivo especiales que contienen los substratos (DNA, hidratos de carbono, aminoácidos, etc) sobre los cuales ellas actúan, junto con un sistema indicador que va a poner de manifiesto la degradación del substrato o la presencia de un metabolito específico (ácido

fórmico, ácido láctico, ácido succínico, indol, etc). Las pruebas bioquímicas también evalúan: la capacidad de reducir ciertos iones (ferroso a férrico), la presencia o ausencia de flagelos (prueba de movilidad), la producción o no de hemolisinas, el requerimiento o no de algunos factores especiales (proteínas séricas), la producción o no de algunas toxinas con capacidad virulenta. Los más comúnmente utilizados son:

Agar Hierro-Lisina o LIA

Es utilizada para identificación ya que permite aislar y diferenciar microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina, se puede detectar además la producción de H₂S, la fermentación de la glucosa y la producción o no de gases (dióxido de carbono CO₂). Tiene como indicador de pH al púrpura de bromocresol, el cual en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color púrpura, por contener una pequeña cantidad de glucosa (1 g/L) al ser fermentada al fondo del tubo es amarillo y la superficie alcalina. La lectura se efectúa a las 24 horas de incubación a 37°C, se lee en forma de cociente observando la acidez o alcalinidad del medio tanto en la parte aerobia, numerador y la parte anaerobia como denominador (X/Y). La acidez se denomina con la letra A (amarillo), la alcalinidad con la letra K (púrpura). Las reacciones típicas de este medio son: La fermentación de la glucosa sin utilización de lisina (K/A), la descarboxilación de lisina (K/K), desaminación de la lisina (R/A) rojo/amarillo, producción de gas: ruptura del medios, producción de H₂S: ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

Muchas bacterias poseen descarboxilasas que atacan el aminoácido lisina, con liberación de aminas de reacción alcalina y con producción de CO₂. Para que actúen las descarboxilasas se requiere un pH ácido que se obtiene por la fermentación de la glucosa que tiene el medio. La desaminación de la lisina es un proceso oxidativo que se manifiesta por la aparición de color rojo en el tendido. Tiene como fuente de azufre el tiosulfato de sodio, necesario para que las bacterias puedan producir H₂S y como indicador citrato férrico de amonio el cual

reacciona con el H₂S produciendo un precipitado negro insoluble de sulfato ferroso. Para que se produzca H₂S se requiere de un medio ácido por lo que dicha producción generalmente está limitada al fondo del medio, razón por la cual un fondo negro debe leerse como A (ácido), aunque el color amarillo usual este tapado por el color negro.

Xilosa, Lisina, Desoxicolato o XLD

Es utilizado en el aislamiento e identificación de patógenos Gram (-) especialmente en géneros *Shigella*, *Providencia* y *Salmonella*. Son diferenciados no solo de los no fermentadores de la lactosa sino de varios no fermentadores de la sacarosa, este medio presenta ventaja de facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes. Contiene extracto de levadura que provee una fuente de Nitrógeno, Carbono vitaminas y cofactores. La xilosa, lactosa y sacarosa son los carbohidratos fermentables, el tiosulfato de sodio y citrato férrico son adicionados para ver la producción de H₂S. El rojo de fenol actúa como indicador y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Triple Azúcar, Hierro o TSI

Utilizada para identificación. Este agar contiene tres azúcares: glucosa (1g/L), lactosa (10 g/L) y sacarosa (10 g/L), como indicador de pH tiene rojo de fenol el cual vira al color amarillo en presencia de acidez y al rojo en presencia de alcalinidad. Tiene como fuente de azufre al tiosulfato de sodio para que las bacterias puedan producir ácido sulfhídrico produciendo un precipitado negro e insoluble de sulfato ferroso, se requiere de un medio ácido por lo que dicha producción generalmente está limitada al fondo del medio, razón por la cual un fondo negro debe leerse como ácido aunque el color amarillo usual esté tapado por el color negro. Esta prueba permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de la glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio, también permite observar la producción de H₂S, es una prueba específica para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* con objetivo de diferenciar entre bacterias fermentadoras de glucosa, lactosa y/o sacarosa, bacterias aerobias y

productoras de H₂S y las bacterias que no utilizan estos carbohidratos produciendo aminas que alcalinizan el fondo y la superficie del medio.

La lectura se efectúa a las 24 horas de incubación a 37°C, se lee en forma de cociente observando la acidez o alcalinidad del medio tanto en la parte aerobia, numerador y la parte anaerobia como denominador (X/Y). La acidez se denomina con la letra A y tiene una coloración amarilla en el medio, la alcalinidad con la letra K y coloración roja, al fermentar solo la glucosa la reacción es K/A, la fermentación de los tres azúcares: glucosa, lactosa y/o sacarosa A/A, Las bacterias no fermentadoras K/K, algunas otras bacterias no fermentadoras solamente atacan la peptona aeróbicamente dando un TSI: K/N, es decir que no hay cambio en el fondo del tubo. Al haber ruptura en el medio es indicador de la producción de gas y el ennegrecimiento de la producción de ácido sulfhídrico (H₂S).

Citrato de Simmons

Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El medio utilizado contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono también es capaz de utilizar las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se reducen en amoníaco (NH) con la consiguiente alcalinidad del medio. Contiene Citrato de Sodio (fuente de Carbono), Fosfato de Amonio (fuente de Nitrógeno) y Azul de bromo timol como indicador de pH el cual en presencia de alcalinidad vira al color azul indicando que la prueba es positiva. Cuando no hay cambio de color la prueba es negativa, sin embargo si en esta última si hay un crecimiento, la prueba es dudosa.

Movilidad, Indol y Ornitina o MIO

Esta prueba permite identificar a las bacterias de acuerdo a si son móviles o inmóviles, a la reacción del Indol y a la descarboxilación de la Ornitina. El Indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que

poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con la producción de Indol, ácido pirúvico y amoniaco. El Indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Erlich o de Kovacs indicando una prueba positiva, debido a que el Indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Si el color es amarillo indica prueba negativa. La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de especie, se realiza en medios semisólidos como el MIO, debiéndose leer antes que la prueba de Indol porque al agregar el reactivo de Kovacs ésta se puede enmascarar. La prueba de movilidad se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación.

Rojo de metilo-Voges Proskawer o RM-VP

Estas dos pruebas permiten la diferenciación dentro de las enterobacterias del grupo *E. coli* y *E. aerogenes*. Las enterobacterias son aerobios facultativos que utilizan glucosa en dos fases: primero la metabolizan aeróbicamente y luego anaeróbicamente (fermentación) que puede ser de dos tipos: fermentación ácido-mixta, con producción de metabolitos como ácido láctico, fórmico y succínico, los cuales van a hacer descender el pH inicial del medio de 6.9 a 4.2, lo cual se visualiza al agregar el indicador de pH rojo de metilo, el cual a pH ácido vira a un color rojo; y la vía de fermentación butilén-glucólica, con productos finales son compuestos neutros como el butanodiol, el etanol, el acetil-metil carbinol (acetoína), el 2-3-butilen-glicol y el diacetilo. La producción de acetoína como intermediario que puede ser detectada añadiendo al medio 10 gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 40% (reactivo A de VP) y 5 gotas de alfa-naftol al 5% (reactivo B de VP) que reaccionara con este compuesto produciendo un color rojo característico. Para RM se añaden unas gotas de solución indicadora de rojo de metilo el viraje, si es positivo, también es de coloración roja. Las tres sustancias neutras con el resultado de que pH del medio no baja sensiblemente y por lo tanto la bacteria es RM negativa y VP positiva.

La bioquímica de la fermentación de la glucosa hace muy poco probable encontrar cultivos MR y VP positivos. Lo que sí es más probable es encontrar las dos pruebas negativas en el caso de bacterias no fermentadoras.

Fenilalanina o PhD-Malonato

Esta prueba determina la capacidad de un organismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por su actividad enzimática de fenilalanina desaminasa, con la consiguiente acidez resultante. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies del género *Proteus* y del grupo *Providencia* por lo que se usa para separar ambos géneros de otras enterobacterias, se cultiva el microorganismo en agar fenilalanina sembrando con abundante inóculo de 12 a 16 horas. Seguidamente se añaden 0.2 ml de una solución de cloruro férrico al 10% de manera que inunde todo el crecimiento. La presencia de ácido fenilpirúvico (prueba positiva) se manifiesta por la aparición de un color característico verde oscuro o verde azulado, considerándose prueba positiva, si continua de color amarillo castaño la prueba es negativa.

Urea

Determina la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco (NH_3) por la ureasa. Esta actividad enzimática es característica de las especies de *Proteus*. Se cultiva el microorganismo en agar urea Christensen. Este medio se completa después de esterilizar en autoclave con 50 ml de urea para una concentración final del 10%. Esta será degradada por aquellos microorganismos productores de ureasa. El sustrato de urea es una diamina del ácido carbónico, denominada carbamida. Todas las amidas (RCO-NH_2) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica ureasa, esta es una enzima microbiana importante, relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican en adaptativas o constituidas. Una enzima adaptativa inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente su sustrato específico. La ureasa es

una enzima constitutiva ya que la sintetizan ciertas bacterias sin tener en cuenta si hay o no el sustrato urea. La producción de amoniaco hará virar el color del indicador de amarillo a rojo, ya que su indicador de pH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva. Si el color es amarillo indica una prueba negativa.

Prueba de la oxidasa

Se basa en la producción bacteriana de la enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de algunos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor de hidrógeno final, produciendo agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana y su sistema enzimático. El sistema citocromo sólo se encuentra por lo general en los MO aerobios, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno molecular (O_2) como aceptor de hidrógeno molecular (H_2) final para reducir el O_2 en peróxido de hidrógeno, el ultimo enlace de la cadena de respiración aeróbica. Los diversos colorantes para la prueba de oxidasa son aceptores de electrones artificiales. La aparición de un color violeta a negro indica positividad.

M.O.	TSI	GAS	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOV	LIS	ORN	GN
<i>Escherichia coli</i>	A/A	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+/-	+
<i>Shigella sonnei</i>	Alc/A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Salmonella sp</i>	Alc/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	A/A	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A/A	+	-	-	+	-	+	-	+/-	+	-	+	-
<i>Serratia maecescens</i>	Alc/A	+	-	-/+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alc/A	-	-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+	+

Tabla 2: Características bioquímicas de enterobacterias. TSI: Agar Hierro triple azúcar, H₂S: Sulfuro de Hidrógeno, RM/VP: Rojo de metilo/Voges-Proskauer, IND: Indol, PAD: Fenilalanina, URE: Urea, MOV: Movilidad, Lis: Lisina, ORN: Ornitina, GN: Gelatina nutritiva. A: ácido Alc: Alcalino, (+): positivo (-): Negativo (Modificado Koneman 1999)

A continuación se presentan algunos de los géneros, y dentro de ellos algunas especies, que con mayor frecuencia se aíslan a partir de muestras clínicas humanas:

DESCRIPCION DE LOS GENEROS MÁS IMPORTANTES

Según Puerta-Garcia y Mateos-Rodriguez en el 2010

Escherichia coli:

Bacilo corto Gram negativo, anaerobio facultativo, tiene ambos tipos de metabolismo: respiratorio y fermentativo. Tiene un diámetro de 1.1 – 1.5 µm. Su temperatura de crecimiento óptima es de 37°C, oxidasa negativa, catalasa positiva, rojo de metilo positiva, Voges-Proskauer (acetoína) negativa y usualmente citrato negativa. Negativa para producción de sulfuro de Hidrogeno, hidrólisis de urea, y lipasa. Las especies de *Escherichia* reducen nitratos a nitritos.

Su genoma contiene 4-639-221 pares de bases de DNA circular de doble cadena, el 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para RNAs estables y 0.7% consiste en DNA repetido que no tiene función conocida. (Lawrence y Ochman, 1998.) Su genoma es dinámico y sus elementos

extracromosomales (plásmidos) son aún más. Esta bacteria puede sobrevivir sin ningún plásmido o tener buen porcentaje de su genoma total en plásmidos.

Las infecciones más frecuentes debidas a *Escherichia coli* son las urinarias, que se produce por el paso del microorganismo a la zona periuretral, también es una de las etiologías más frecuentes de las infecciones de la vía biliar, ocasionando episodios de colecistitis, colangitis o incluso abscesos hepáticos múltiples por colonización ascendente. La existencia de litiasis en el árbol biliar o las manipulaciones previas del mismo, por endoscopia o cirugía, son los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de las infecciones a dicho nivel. Puede producir abscesos en cualquier localización. Son frecuentes a nivel del tejido celular subcutáneo secundarios a la infección de las heridas operatorias, a isquemia arterial de las extremidades inferiores o a lesiones repetidas por inyecciones subcutáneas. Así mismo ocasiona de forma excepcional un gran número de infecciones como artritis sépticas, endoftalmitis, tiroiditis supurativa, abscesos cerebrales, endocarditis, osteomielitis, prostatitis, sinusitis y tromboflebitis séptica. (Navarro ZCG. 2010). *Escherichia coli* se considera biota normal en el hombre, sin embargo se han descrito seis grupos de productores de diarreas. Estos grupos son:

Escherichia coli Enterotoxigénica (ETEC),

Escherichia coli Enterohemorrágica (EHEC),

Escherichia coli Enteroinvasiva (EIEC)

Escherichia coli Enteropatógena (EPEC)

Escherichia coli Enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli de Adherencia Difusa (DAEC). (Rodríguez et al. 2002)

Salmonella enterica:

Las especies de *Salmonella* pueden ser causantes de diversas infecciones, *Salmonella typhimurium* es un patógeno intracelular facultativo que causa salmonelosis en humanos y animales, y es este el agente causal de fiebre tifoidea. (Judy S. et al 1993). Tienen antígeno somático O que son lipopolisacáridos y

flagelares (H) que son proteínas. *Salmonella typhi* también tiene un antígeno capsular o antígeno virulento (Vi). Existen más de 2.000 serotipos diferentes que se agrupan en seis grupos:

Grupo A: *S. paratyphi A*;

Grupo B: *S. typhimurium* y *S. bredeney*;

Grupo C1: *S. choleraesuis*, *S. montevideo* y *S. oranienburg*;

Grupo C2: *S. neuport*;

Grupo D: *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. dublin* y *S. gallinarum*;

Grupo E1: *S. butantan*, *S. anatum* y *S. give*.

La salmonelosis puede observarse bajo cinco diferentes síndromes clínicos, que se presentan de forma exclusiva o superpuesta, y que corresponden a los siguientes: portador asintomático, gastroenteritis aguda, bacteriemia, infecciones focales (meningitis, osteomielitis o abscesos) y fiebre tifoidea. Se trata de un género no formador de esporas, anaerobio facultativo y móvil. Son oxidasa negativa y prácticamente todas lactosa y sacarosa negativas.

Shigella sp:

Shigella es un grupo de bacterias Gram Negativas, patógenos intracelulares facultativos. Esta subagrupada en cuatro especies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. Es responsable de la disentería bacilar. Se trata de un cuadro muy similar al producido por las cepas enterohemorrágicas o enteroinvasivas de *E. coli*. Su genoma contiene 4-828-820 pares de bases de DNA circular de doble cadena. El genoma completo de *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei* ha dispuesto evidencia de soporte adicional; estas tienen ~3 Mb de DNA genómico en común con todos los genomas publicados de *E.coli* y *Shigella*. *Shigella* ha evolucionado de diferentes cepas de *E.coli* y ha llegado a ser un patógeno humano altamente específico. (Yang et al 2005).

Diversos estudios indican que *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* son los aislados más predominantes en países industrializados (Niyogui 2005).

Klebsiella sp:

El género *Klebsiella* está formado por un grupo de bacterias con dos especies que producen enfermedades en el hombre *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* las cuales colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son responsables de infecciones de las vías urinarias, respiratorias y síndrome de sepsis. La mayoría de estas infecciones son nosocomiales y generalmente se observan en pacientes debilitados por enfermedades crónicas y/o inmunocomprometidos. Los factores de virulencia de *Klebsiella sp* son la cápsula, presente en todas sus especies, que es capaz de evitar la fagocitosis y la migración de los leucocitos al área de la infección y la endotoxina propia de las bacterias Gram negativas y se diferencian por ser inmóviles. Puede ocasionar hasta un 10% de las infecciones urinarias, es el segundo agente causante de bacteriemia nosocomial dentro de los bacilos Gram negativos después de *Echerichia coli*. Los focos de origen más comunes son el tracto urinario, las vías respiratorias inferiores, el tracto biliar, las infecciones de las heridas operatorias y los catéteres intravasculares.

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista que causa severa morbi-mortalidad; ha sido clasificado en la categoría de identificación de riesgo tipo “B” por la FAO (por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization) y la organización mundial de la salud OMS. (FAO/WHO, 2004). En comparación con otras enterobacterias en categoría “B” *K. pneumoniae* es el patógeno más importante por su severidad en morbilidad y mortalidad. Los métodos convencionales utilizados para su identificación son laboriosos y con un tiempo de identificación elevado ya que requieren el aislamiento en cultivo puro y la identificación por pruebas bioquímicas, generalmente tardan de 5-7 días en obtener los resultados definitivos. Recientemente la técnica de qPCR provee una rápida detección de microorganismos en diferentes muestras. Para la

identificación de *K. pneumoniae* existen oligonucleótidos que permiten una identificación específica, estos van dirigidos hacia el gen *phoE*. (Sun et al 2009)

Yersinia sp:

Para el hombre los microorganismos patógenos son *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*. Se trata de zoonosis que habitualmente afectan a roedores, cerdos y aves, siendo el ser humano un huésped accidental de la infección. *Y. pestis* se desarrolla de forma aerobia en la mayoría de los medios de cultivo y no fermenta la lactosa. Es el agente etiológico de la peste, *Y. enterocolitica* es una causa relativamente infrecuente de diarrea. La infección por *Y. pseudotuberculosis* es la más rara de las yersiniosis. La manifestación más frecuente es la adenitis mesentérica. También se han descrito casos de eritema nodoso, que en ocasiones se han presentado de forma epidémica. Los pacientes con septicemia por *Y. enterocolitica* deben recibir antibioterapia, aunque la mortalidad es elevada a pesar del tratamiento (50%).

Enterobacter sp:

En este género incluyen 5 especies causantes de infecciones en humanos, denominadas *En. aerogenes*, *E. cloacae*, *Enterobacter agglomerans* (anteriormente denominada *Erwinia agglomerans*), *Enterobacter gergoviae* y *E. sakazakii*. Se encuentran de forma primaria como colonizantes en pacientes hospitalizados, en especial si previamente han estado tratados con antibióticos. Otros factores de riesgo para su adquisición son los procedimientos invasivos diagnósticos o terapéuticos y la utilización de catéteres. Por lo tanto, se consideran patógenos oportunistas que raramente causan infecciones primarias en el hombre. Las infecciones más comunes son las infecciones de heridas quirúrgicas, las del tracto respiratorio, las urinarias y las bacteriemias relacionadas con los catéteres intravenosos.

Serratia sp:

Serratia es un género bacteriano ubicuo en el ambiente; se encuentra en agua, suelos y en asociaciones con plantas y animales, comúnmente como patógeno (Joyner et al 2013). Existen un gran número de especies en este género,

aunque la gran mayoría de las infecciones en el hombre están causadas por *Serratia marcescens*. *Serratia*, a diferencia de la mayor parte de las Enterobacterias que colonizan el tracto gastrointestinal, es un comensal de los tractos respiratorios y urinario de pacientes adultos hospitalizados mientras que en neonatos coloniza de forma habitual el tracto digestivo, se comporta como un microorganismo oportunista que produce infecciones de adquisición intrahospitalaria. Se han explorado múltiples regiones genéticas como blanco específico idóneo para la determinación de *S. marcescens*, incluido *gyrB*, el gen 16S rRNA, y el gen *luxS*. El gen *luxS* está asociado al quorum sensing, y ha sido seleccionado dado su alto potencial y alta especificidad para *S. marcescens* de acuerdo a las secuencias remitidas dentro del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). El gen *luxS* en *S. marcescens* diverge de otros *luxS* bacterianos pero es una región altamente conservada entre las cepas de *S. marcescens*. (Joyner et al 2013).

ENTEROBACTERIAS Y SU RELACION CON ZONULINA

Uno de los mecanismos de las enterobacterias en la obesidad es el de inducir la respuesta inflamatoria medida por citocinas, que entre otros efectos produce pérdida del apetito y tiene además un efecto deletéreo sobre el catabolismo de las proteínas. Asmar y colaboradores en el 2002 mediante pruebas realizadas en tejido de intestino delgado de varios mamíferos incluidos ratas y monos, demostraron que cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* patogénica y no patogénica inducían cambios en la resistencia eléctrica transepitelial e inducían un incremento significativo en la secreción de zonulina comparados con tejido no infectado iniciando desde las primeras 2 horas después de la exposición a dichas bacterias y continuando los incrementos hasta las 48 horas tras la infección. Proporcionando con esto la evidencia de que el intestino delgado participa de manera activa, como una participación primaria en la interacción en la relación enterobacterias-hospedero respondiendo a la presencia

de los microorganismos mediante la secreción en el lumen intestinal de Zonulina. (Asmar et al 2002)

Se ha generado evidencia de bacterias entéricas no patogénicas en intestino delgado producen un incremento en la secreción de Zonulina en tejido intestinal aislado de humano y de roedor. (Fasano 2011) esta secreción es independiente de la virulencia del microorganismo analizado, y está dada solo por la exposición bacteriana en la mucosa del lumen intestinal, seguida del incremento de la permeabilidad intestinal coincidente con el desacoplamiento de la Zonula Occludens del complejo de las uniones intracelulares estrechas. Además de la exposición bacteriana se tiene registro de una liberación de Zonulina por medio de la glicoproteína Gliadina, ligada al receptor de Quimocina CXCR3, expresada en el lumen intestinal. (Fasano 2012). La Zonulina es una proteína (47-kDa) descubierta en el año 2000, como toxina (Zonula Occludens toxin. "Zot") del *Vibrio cholerae*. Zot posee múltiples dominios que permiten una doble función, como proteína morfo genética del fago, péptido para el *Vibrio cholerae* CTX ϕ y como enterotoxina que modula las uniones estrechas intercelulares.

ZONULINA

La zonulina es un modulador fisiológico de las uniones estrechas intercelulares (de tipo *Zonula Occludens*), que puede ser utilizado como biomarcador para el daño de la función de la barrera intestinal, así como también varias enfermedades autoinmunes, neurovegetativas y tumorales y tiene cierto potencial para ser blanco terapéutico para tratamiento de las mismas (Fasano 2012). Las uniones estrechas intercelulares requieren la presencia de sistemas regulatorios complejos que orquestan el estado de unión de la red multiproteica de las uniones estrechas. Es bien aceptado que estas uniones estrechas son estructuras dinámicas, sorprendentemente su regulación es poco estudiada. El descubrimiento de Zot ha dado un poco de luz en el intrincado mecanismo que envuelve la modulación de la vía paracelular, que consiste en la transferencia de

sustancias a través del epitelio pasando por los espacios intercelulares entre las células, en el intestino, permitiendo también identificar en intestinos de mamíferos la proteína análoga que participa en las uniones estrechas. (Wang et al 2000)

El mecanismo de acción de la Zonulina (figura 2) es por interacción proteína- proteína que mantienen las uniones estrechas intracelulares, la vía de señalización de la zonulina es por activación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante el receptor de la proteinasa 2 (PAR₂) (figura 3). La proteína activa la Fosforilasa C que hidroliza el Fosfatidil Inositol (PPI) para liberar el Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) Y Diacilglicerol (DAG). La protein cinasa C (PKC) α es activada por la vía DAG, liberando Ca²⁺ intracelular. La PKC asociada a membrana cataliza la fosforilación de las proteínas blanco, incluida la *Zonula Occludens 1* (ZO-1) y la miosina 1C, así como también la polimerización de G-Actina en F- Actina. La combinación de la fosforilación de las proteínas de las uniones estrechas intracelulares y la polimerización de la actina es lo que provoca el re-arreglo de los filamentos de actina y el subsecuente desplazamiento de las proteínas (incluida ZO-1). Como resultado se tiene una pérdida de las uniones intracelulares. Una vez que la señalización de la Zonulina se ha terminado, las uniones estrechas se reestablecen. (Fasano 2012)

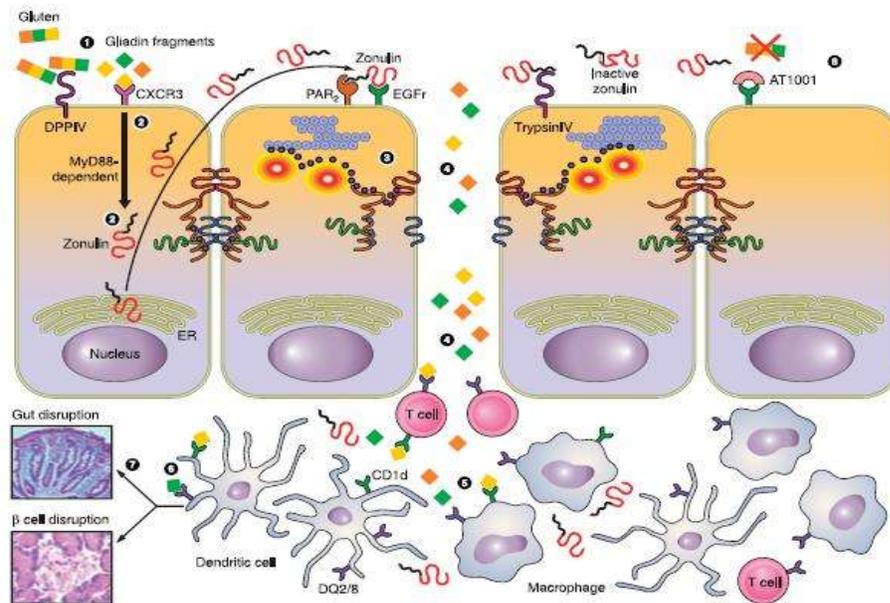


Figura 2: Mecanismo de liberación de zonulina por inducción de Gliadina. (Fasano 2008)

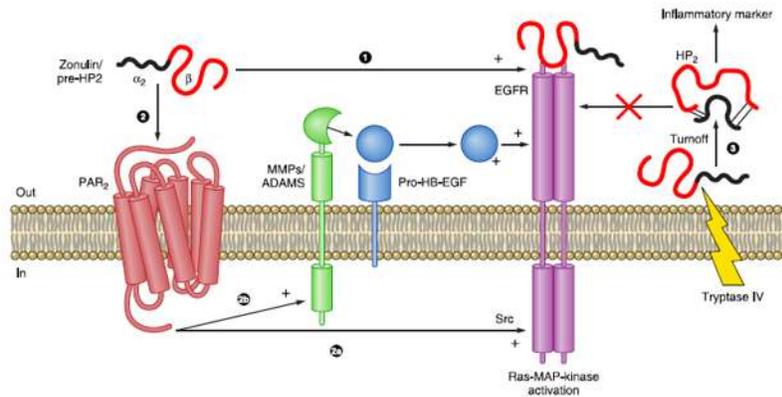


Figura 3: Mecanismo propuesto a través del cual Zonulina activa el EGFR. Zonulina puede activarlo por unión directa (1) y/o a través de una transactivación con PAR₂ (2). Este segundo mecanismo puede ser mediado por señalización de ambos Src (2a) o por liberación de MMPs y/o ADAMS para que en el giro activara Pro-HB-EGF. La transformación de zonulina en forma de dos cadenas, por ejemplo, vía escisión proteolítica por Triptasa IV intestinal, induce el cambio conformacional en la molécula que suprime la habilidad de unión con EGFR (3), pero en cambio permite diferentes funciones (por ejemplo unión con hemoglobina), y esto la convierte en un marcador de inflamación. (Fassano 2008).

A través de los análisis de Proteómica, recientemente se ha identificado a la Zonulina como Pre-Haptoglobina 2 (HP2), una molécula que hasta la fecha ha sido determinada como el precursor inactivo de HP2 una de las dos variantes genéticas (junto con HP1) de las Haptoglobinas humanas. Estas Haptoglobinas humanas son glicoproteínas heterodiméricas plasmáticas compuestas por dos cadenas polipeptídicas (α y β) que están asociadas covalentemente por enlaces disulfuro. (Fasano 2012.)

Se ha tenido evidencia de que el intestino delgado puede tener un papel activo en las interacciones hospedero-enterobacterias, dándose una secreción de Zonulina, únicamente cuando el microorganismo se encuentra adherido al lumen intestinal y no a la capa serosa del intestino, en respuesta a la presencia de microorganismos no productores de toxina Zot. Estos resultados muestran que el intestino de mamíferos reacciona ante la exposición de enterobacterias tanto patogénicas como no patogénicas, activando la vía de Zonulina, esto puede ser interpretado como un mecanismo de defensa del hospedero en reacción hacia la

presencia anormal de microorganismos y/o componentes de pared celular en la superficie proximal del intestino delgado. (Asmar et al 2002).

En adultos se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el nivel plasmático de zonulina con la edad, niveles séricos de glucosa, masa corporal, IMC y porcentaje de grasa corporal, así como también con un conteo de bacterias totales, y niveles séricos de Haptoglobina. También se demostró que la zonulina plasmática es proporcional a la ingesta energética diaria e inversamente proporcional al porcentaje proteínico de la ingesta dietética (Żak-Goląb et al 2013).

Zonulina es una proteína que es secretada en el lumen intestinal y es transportada hacia y desde el torrente sanguíneo. Es un modulador fisiológico de las uniones estrechas intercelulares (de tipo Zonula Occludens), que puede ser utilizado como biomarcador para el daño de la función de la barrera intestinal, así como también varias enfermedades autoinmunes, neurovegetativas y tumorales y tiene cierto potencial para ser blanco terapéutico para tratamiento de las mismas (Fasano 2012).

JUSTIFICACION

La obesidad es un problema nutricional de clase mundial, hay evidencia de un incremento en la prevalencia e incidencia de la obesidad, tanto en niños como en adolescentes. De acuerdo a la Organización Mundial de La Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad afectan a 250 millones de personas. México ocupa el primer lugar de obesidad infantil en el mundo. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, la prevalencia de obesidad en niños menores de 5 años de edad es de 34.4 % y de 32.0% en niños de 5 - 11 años de edad. Utilizando el criterio de la OMS (Un percentil de IMC para la edad igual o superior a 95 determina obesidad).

Otro de los aspectos importantes a tomar en cuenta en la valoración del estudio de la obesidad es el gran riesgo que representa, no solo en salud física, sino en salud mental; Existe una asociación bidireccional entre la obesidad y la depresión, las personas obesas tienen un 55% más de riesgo de presentar depresión a través del tiempo, mientras que las personas que padecen depresión tienen 58% más de riesgo de volverse obesos. Los desórdenes alimenticios y el dolor físico son consecuencia de la obesidad, y también se ha sabido que incrementan el riesgo de padecer depresión. La obesidad puede ser vista como un estado inflamatorio, se ha demostrado que la ganancia de peso activa vías de inflamación y la inflamación a su vez ha sido asociada con la depresión; como la inflamación juega un rol en ambas patologías, la inflamación puede ser el mediador de esta asociación. (Lupino et al 2010); Estos riesgos son aún más catastróficos cuando se presentan en edades tempranas, en una sociedad moderna que se mueve en gran proximidad social unos con otros los mecanismos de control social son necesarios. La vergüenza puede ser uno de estos mecanismos con mayor impacto. Desafortunadamente resultados sugieren que estos mecanismos pueden ser activados por señales de apariencia física como la obesidad, donde se pueden convertir en un rasgo de estigmatización poniendo adolescentes y niños en un riesgo psicosocial. (Sjöberg et al 2005).

El costo directo estimado para el gobierno del país según la secretaria de salud, que representa la atención médica de las enfermedades atribuibles al

sobrepeso y la obesidad (enfermedades cardiovasculares, cerebro-vasculares, hipertensión, algunos cánceres, atención de diabetes mellitus tipo 2) se incrementó en un 61% en el periodo 2000-2008, al pasar de 26,283 millones de pesos a por lo menos 42,246 millones de pesos. Para el 2017 se estima que dicho gasto alcance los 77,919 millones. Esto en el 2008 representó el 33.2% del gasto público federal en servicios de salud a la persona. El costo indirecto por la pérdida de productividad por muerte prematura atribuible al sobrepeso y la obesidad ha aumentado de 9,146 millones de pesos en el 2000 a 25,099 millones de pesos en el 2008. (Secretaría de salud, 2010)

Como podemos ver es de suma importancia abordar desde otra perspectiva a la obesidad, así como estudiar nuevos factores para su desarrollo como la microbiota intestinal con la finalidad de identificar las bacterias o patrones de ellas que pueden estar influyendo en dicha patología. Es importante reconocer que los pocos estudios que existen la actualidad no pueden ser representativos para la población mexicana, pues la microbiota varía respecto al genoma del portador, la alimentación y factores medio ambientales. Estos estudios no permitirán tener una perspectiva más amplia de los factores que influyen en la obesidad y por ende crear programas más completos en la lucha contra dicha pandemia.

Prevenir la obesidad en los niños puede ayudar a mejorar la calidad de vida evitando posteriores enfermedades y disfunciones propias asociadas a la obesidad tanto en edades tempranas como en la edad adulta (Pereyra et al 2009). Una prioridad para limitar el elevado porcentaje de niños con sobrepeso u obesidad es identificar en qué medida algunos factores de riesgo, tales como la diferencia en microbiota intestinal, desencadenan dicha patología, pues durante la infancia y a lo largo de la vida, la composición microbiana también cambia, esto de acuerdo con la edad y la dieta, y tiene efectos que favorecen la producción de zonulina, favoreciendo el desarrollo de la obesidad infantil. (Vázquez-Nava, et al. 2013).

HIPOTÉISIS

“Existe una correlación entre los niveles de zonulina sérica y los niveles de enterobacterias en niños obesos y eutróficos sin ninguna patología aparente”

OBJETIVO GENERAL

Identificar la posible correlación entre los niveles de enterobacterias con la concentración sérica de zonulina y la distribución en percentiles de niños eutróficos y obesos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Búsqueda de oligonucleótidos adecuados para la identificación y cuantificación de enterobacterias mediante Q-PCR
- 2.- Cuantificación de las enterobacterias en muestras fecales por medio de Q-PCR.
- 3.- Cuantificación de zonulina sérica en niños clínicamente sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

PARTICIPANTES

En este se incluyeron 72 niños de 5 a 12 años de edad, derechohabientes del hospital regional num.1 de Charo, cuyas muestras sanguíneas y fecales fueron tomadas en el periodo de Enero-Agosto del 2013, este protocolo de investigación tiene la autorización del comité local de investigación y ética en investigación y salud 1602 H. regional no.1 Michoacán (R-2012-1602-43). Las muestras séricas y fecales fueron almacenadas a -80°C . Veintiocho de estos niños son sanos eutróficos (15 femenino y 12 masculino) y cuarenta y siete son niños con obesidad (18 femenino y 27 masculino), los puntos de corte para la determinación del percentil fueron determinados a partir de las tablas de la CDC de percentil de IMC para la edad, asignando así un percentil entre de 5 a 85 para niños sanos con peso normal, en el intervalo de 85 a 95 para sobrepeso y un percentil por encima de 95 para niños con obesidad (Cole et al, 2000), los niños con obesidad no presentan ninguna patología agregada. Se realizaron pruebas antropométricas (Edad, Peso, Talla), presión, sistólica y diastólica, de la toma de muestra sanguínea para pruebas bioquímicas, se realizaron las siguientes pruebas: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, aspartatoanimo trasferasa, alanina aminotransferasa, gamma glutariltranspeptidasa, potasio, calcio, sodio, fosforo, cloro, proteínas totales, albumina, globulina, relación A/G, deshidrogenasa láctica y bilirrubinas,. Se realizó también grupo sanguíneo, conteo total de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen globular medio, concentración media de hemoglobina, conteo total de plaquetas, conteo total de leucocitos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos, realizado en el hospital regional no.1 por personal capacitado del área de análisis

AISLAMIENTO DE DNA

A partir de la materia fecal se aprobaron diferentes métodos de aislamiento de material genético los métodos fueron:

- Kit comercial de la marca INVITROGEN
- Kit comercial de la marca QIAGEN
- Método Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico
- BIOLINE, numero de catálogo BIO.52037, Humber Road Londres.

Los protocolos de los kit de extracción fueron realizados de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

TECNICA DE FENOL: CLOROFORMO

- 1.- Pesar 0.100 g de materia fecal
- 2.- Lavar con 500 μ L de TE, dar vortex y centrifugar 2 minutos a 6600 rpm.
- 3.- Tirar sobrenadante y repetir hasta un total de tres lavados.
- 4.- Agregar 800 μ L de Buffer de Lisis más 200 μ L de SDS y 50 μ L de Proteinasa K.
- 5.-Incubar a 65°C a Baño María durante toda la noche.
- 6.-Añadir 250 μ L de Acetato de Potasio frio, dar vortex e Incubar 20 min. A -4°C dando vortex cada cinco min y centrifugar 10 min a 12,000 rpm y recuperar sobrenadante
- 9.- Agregar 1200 μ L de Fenol:Cloroformo:Isoamilico (25:24:1) frio, Mezclar por inversión y Centrifugar 10 min a 15,000 rpm y recuperar sobrenadante.
- 10.- Repetir el paso 8 hasta completar 3 tiempos.
11. Añadir 1200 μ L de isopropanol al 100% frio, mezcle por inversión, incubar a -20°C 1 h.
- 12.- Centrifugar a 12,000 g durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante
- 13.- Agregar 200 μ L de etanol absoluto frio y 5 μ L de NaCl 1 M, dar vortex.
- 14.- Centrifugar 10 min a 14,000 rpm. Decantar y secar por 30 minutos.
16. Agregar 50 μ L de TE. Incube a 37°C por 5 min. Dar vortex.
- 17.- Agregar 25 μ L de RNAsa y 20 μ L de Buffer de RNAsa. Dar vortex y spin
- 17.-Incubar 90 min a 37°C en baño María.

Se probaron cuatro técnicas de extracción para determinar la eficiencia de cada una. Se probaron en materia fecal de tres organismos diferentes: CERDO, VACA Y MUESTRA FECAL HUMANA

PCR PARA IDENTIFICACION BACTERIANA

Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (Q-PCR por sus siglas en ingles), basada en la múltiple reproducción de fragmentos de DNA para la identificación de las enterobacterias presentes en las muestras. Se estandarizó la concentración de oligonucleótidos para cada una de las identificaciones bacterianas mediante PCR de gradiente de concentración. Se realizó la recta patrón por duplicado para cada uno de los oligonucleótidos con diluciones sucesivas factor 10 con una concentración máxima de 3×10^9 con cepas control y/o de aislados clínicos.

El protocolo de la q-PCR es el siguiente:

1.- Preparar las reacciones en hielo. Para un volumen de 20 μ L totales.

Se hicieron determinaciones por duplicado con un volumen total de reacción de 20 μ L con EXPRESS SYBR® Green ER™ qPCR. Las condiciones de reacción son las siguientes:

2.- Preparar una muestra blanco.

3.- introduzca en cada uno de los pocillos la cantidad de molde de ADN como de mezcla maestra correspondiente.

4.- Selle la placa y mezcle gentilmente, asegúrese de que todos los componentes se encuentran en el fondo de la placa. Centrifugue si es necesario.

5.- Coloque la placa en el instrumento de lectura previamente programado (Applied Biosystems: StepOne plus™) Obtenga los datos y analice los resultados.

Se realizaron un total de 40 ciclos en modo fast, las condiciones de temperatura en cada ciclo son las siguientes:

- 95°C por 00:20 s
- 95°C por 00:03 s
- 60°C por 00:30 s para bacterias totales y enterobacterias
- 56°C para las reacciones de *Klebsiella pneumoniae*.

Durante la amplificación por q-PCR se genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de la amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4) plateau o estacionaria (Figura 4).

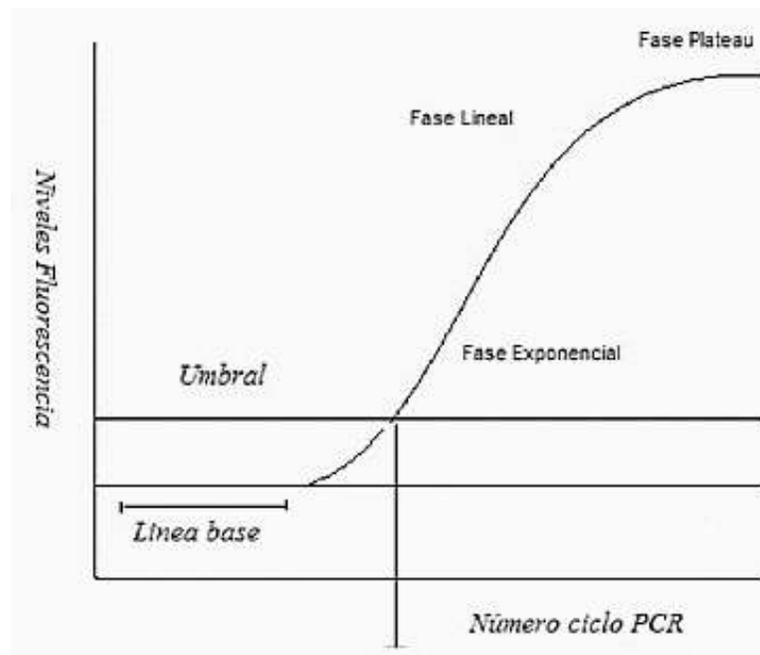


Figura 4: Fases de cinética de reacción de PCR en tiempo real.

Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal, sin embargo, esta fase sirve para delimitar la línea base. En la fase exponencial, los reactivos se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es 2^n , es decir, a partir de cada molécula de ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto

obtenida es constante aunque se incrementen el número de ciclos. (Wong y Medrano 2005)

Para la evaluación de la cantidad del ADN de interés en cada una de las muestras, se toma en cuenta la eficiencia de la amplificación. En el caso más sencillo, la eficiencia de la amplificación es 100%, es decir, el Ct se asigna solo durante la fase exponencial de la amplificación donde ésta es 100% eficiente. Si se asume esta eficiencia, la proporción entre la cantidad inicial de copias del ADN blanco entre dos muestras diferentes se calcula como:

$$[No]_A/[No]_B=2^{(-\Delta Ct)}$$

Donde:

$[No]_A$ = Número inicial de moléculas del ADN en la muestra A

$[No]_B$ = Número inicial de moléculas del ADN en la muestra B

ΔCt = Diferencia entre $Ct_B - Ct_A$

Si el Ct de la muestra A es tres veces mayor que el de la muestra B, es decir, B requiere de tres ciclos más para alcanzar el mismo umbral de fluorescencia que A, eso significa que hay 8 ($2 \times 2 \times 2$) veces más ADN en la muestra A que en la B. Ésta fórmula solo se puede utilizar en la fase exponencial cuando la eficiencia es 100%. Sin embargo, en la mayoría de los casos experimentales, la eficiencia no es 100%, por lo que es necesario incluir la eficiencia de la reacción en la fórmula:

$$[No]_A/[No]_B=(1+E)^{(\Delta Ct)}$$

Donde E es la eficiencia de la reacción. (Wong y Medrano 2005)

RECTAS PATRON

Se preparó medio de cultivo BHI líquido para inoculación de las especies conservadas. Se inocularon 3 tubos con 50 μ L, 5 μ L, y 0.5 μ L del cultivo líquido más un tubo sin inoculación, tubo control, se incubaron a 37°C en agitación por 12 horas. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 y 1:1000 de cada uno de ellos y se colocaron 20 μ L en la cámara de Newbauer y se leyó en un microscopio de

contraste de fases modelo DMLB marca Leica, se contabilizó por triplicado el número total de células y se realizó un promedio de las mismas, con ello obtuvimos el número de células por mililitro de cultivo por medio de la fórmula matemática:

$$\text{Concentración (células/mL)} = \frac{\text{Número de Células} \times 10\,000}{\text{Número de cuadros} \times \text{la dilución}}$$

Una vez obtenido el número de células por mililitro de cultivo, se realiza el cálculo para obtener el número de mililitros necesarios para tener 10^9 células con la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$. Ya obtenidos los mililitros se multiplica por tres ya que se realiza extracción por triplicado de esta muestra, se centrifuga a 8000 rpm por 10 minutos, se resuspende en agua desionizada estéril y se divide en tres tubos eppendorf, y se realiza extracción de DNA por el método de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico, y se cuantifica la cantidad de DNA presente en la extracción por medio del equipo Nanodrop 2000c.

ELISA PARA ZONULINA

Para la cuantificación de la Zonulina sérica, se realizó un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima, ELISA por sus siglas en inglés, Los datos del reactivo utilizado en este estudio fue: Quantikine® ELISA, R&D systems 614 Mckinley Place NE. Minneapolis MN, 55413 USA. La técnica se desarrolló de acuerdo a las especificaciones del kit. Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos: competitivos y no competitivos.

ELISA COMPETITIVO: en este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno, habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrara a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra.

ELISA NO COMPETITIVO: consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formara el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionara con el respectivo sustrato desarrollando color. Dentro de los no competitivos tenemos, los directos que detectan antígenos y los indirectos que detectan anticuerpos. En la presente investigación utilizaremos un ELISA competitivo.

La reacción inmunológica tiene lugar en la fase sólida, ésta puede ser de plástico, vidrio o nitrocelulosa. Actualmente los más usados son los de plástico, dentro de estos los de poliestireno gammairradiados y los de cloruro de polivinilo porque tienen mayor capacidad para formar enlaces estables que los de poliestireno no tratados. El antígeno diluido en buffer es adherido a la fase sólida por enlaces electrostáticos entre los sitios activos del plástico y regiones de la proteína responsables de esta interacción. El buffer puede ser carbonato a pH 9.6 o buffer de fosfato salino (PBS 1X) a pH7.4. La estabilidad de los enlaces electrostáticos, el tiempo de incubación y la temperatura son factores importantes a tener en cuenta para evitar pérdidas de las proteínas y que pueden afectar a la sensibilidad del ensayo. La reacción del antígeno con el anticuerpo se debe realizar en condiciones similares a los fisiológicos pH 7.4, temperatura de 37°C y concentración salina equivalente a 0.15M de NaCl. Estas condiciones se pueden variar dentro de un rango razonable sin afectar la reacción. El tiempo puede variar entre 1 y 3 horas. Moléculas no específicas en solución pueden adherirse a la fase sólida afectando el resultado final del ensayo, para disminuir el riesgo se suele agregar al medio de reacción un exceso (0.1 – 1 %) de una proteína inerte para que compita eficientemente por los sitios de unión inespecíficos en la fase sólida. Esta proteína puede ser seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina u otros. También es necesario añadir al medio tween 20 para evitar uniones inespecíficas de macromolécula. Por este motivo es agregado en los tampones de dilución y de lavado.

El conjugado enzimático se prepara por unión covalente de una enzima con el anticuerpo; esta enzima puede ser peroxidasa de rábano (Horseradish

peroxidase, AP) o beta-galactosidasa. Los criterios a tomar en cuenta en la selección de la enzima apropiada son su toxicidad, estabilidad, disponibilidad, viabilidad de conjugarla eficazmente con el anticuerpo elegido, sensibilidad y precio. La elección del sustrato va de acuerdo con el tipo de enzima presente en el conjugado. El sistema de AP hidroliza al p-nitrofenil fosfato o p-nitrofenol generando un producto soluble de color amarillo. El sistema HRP reduce al sustrato peróxido de hidrógeno produciendo oxígeno que oxida a otros compuestos cromógenos tales como:

- Tetrametilbenzidina (TBM), cuya oxidación genera un producto de color azul oscuro.
- Diamina de o-phenileno (OPD) que es oxidado a un producto coloreado que varía del naranja al pardo oscuro.
- Ácido azino-(3-etil)-benzo-sulfónico (ABTS), cuya oxidación genera un producto que va del verde al azul.
- La intensidad del color desarrollado es de acuerdo a la cantidad de enzima presente en la reacción. Se lee en un espectrofotómetro a 450 nm. (Malpica et al)

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados por medio del paquete estadístico SPSS v.22 y se consideró la significancia estadística cuando $p \leq 0.05$. Se realizó un análisis de T de Student para conocer las características del tipo de enterobacterias en los dos grupos de estudio, así mismo para la diferencia en la concentración sérica de zonulina. Se realizó una correlación de Pearson entre las concentraciones bacterianas y la concentración de zonulina, así mismo se analizó la correlación de zonulina con todos los parámetros bioquímicos y hematológicos.

RESULTADOS

CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS DE LA MUESTRA INFANTIL

Se demostró mediante pruebas de t de Student que no existía diferencia de edad y género entre ambos grupos. En la siguiente tabla se muestran los resultados de dichos análisis.

Característica		Media	Desviación Estándar	<i>p</i>
Genero	Eutróficos	F=15		0.510
		M=12		
	Con Obesidad	F=18		
		M=27		
Edad	Eutróficos	9.63 años	2.08	0.749
	Con Obesidad	8.51 años	2.04	

Tabla 3: Comparación de edad y género entre los dos grupos (Eutróficos y con Obesidad).

La media de edad para niños eutróficos es de 9.63 mientras que para niños con obesidad es de 8.51, su *p* es mayor a 0.05 por lo tanto no presenta diferencia estadísticamente significativa. Para la edad se asignó un valor arbitrario de 1 para sexo masculino y un valor de 2 para femenino y con ello se puede observar que tampoco hay diferencia significativa en la cantidad de hombres y mujeres presentes en el grupo de estudio.

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para cada Analito por el personal capacitado del hospital regional num.1 de Charo, la comparación de medias se realizó con la prueba de T de Student y con U de Mann-Whitney para distribuciones normales y no paramétricas respectivamente. Los resultados de los parámetros bioquímicos de ambos grupos se muestran a continuación:

Analito	Clasificación OMS	Media	Desviación Estándar	<i>p</i>
Glucosa	Eutróficos	72.00 mg/dL	6.54	.016*
	Con Obesidad	86.17 mg/dL	33.17	
Insulina	Eutróficos	4.03 µU/mL	1.63	0.007*
	Con Obesidad	6.15 µU/mL	4.51	
Urea	Eutróficos	19.26 mg/dL	5.45	0.175
	Con Obesidad	25.77 mg/dL	7.81	
BUN	Eutróficos	9.00 mg/dL	2.52	0.176
	Con Obesidad	12.04 mg/dL	3.64	
Creatinina	Eutróficos	0.48 mg/dL	0.14	0.041*
	Con Obesidad	0.70 mg/dL	0.24	
Ácido Úrico	Eutróficos	3.80 mg/dL	1.09	0.377
	Con Obesidad	5.52 mg/dL	1.45	

Tabla 4: Química sanguínea de nuestro grupo de estudio. *Significancia estadística $p \leq 0.05$

Los resultados del análisis de química sanguínea muestra que los valores de glucosa, insulina y creatinina se encuentran en concentraciones más elevadas en los niños con obesidad respecto a los niños eutróficos sanos con una diferencia estadísticamente significativa. Los resultados de glucosa e insulina concuerdan con los reportados, ambos en adultos, por Moreno Navarrete y colaboradores en el 2012 en España y con Żak-Golař en el 2013 en Polonia, en Durango, México también se encontraron estas diferencias en glucosa, pero en niños preadolescentes (Salazar et al 2005), estos últimos también encontraron diferencias en la concentración de ácido úrico siendo este mayor en pacientes con obesidad. Dentro de la población analizada en este trabajo no se encontraron diferencias en la concentración de ácido úrico, pero sí de concentración de creatinina, y hasta la fecha no existen reportes de diferencias significativas de creatinina en niños con obesidad respecto a los eutróficos. La creatinina es el producto del metabolismo de la creatina del músculo. Su producción es proporcional a la masa muscular, lo que explica las diferencias en su concentración sérica en función de la edad, sexo, el grupo racial y el estado nutricional, tiene una alta variabilidad biológica interindividual. (Fraga et al 2014).

Analito	Clasificación OMS	Media	Desviación Estándar	<i>p</i>
Triglicéridos	Eutróficos	96.76 mg/dL	39.12	.000*
	Con Obesidad	223.06 mg/dL	130.64	
Colesterol total	Eutróficos	142.38 mg/dL	24.24	.018*
	Con Obesidad	186.95 mg/dL	36.28	
Colesterol VLDL	Eutróficos	19.78 mg/dL	7.99	.001*
	Con Obesidad	45.83 mg/dL	25.74	
Colesterol LDL	Eutróficos	75.85 mg/dL	19.22	.038*
	Con Obesidad	92.97 mg/dL	33.11	
Colesterol HDL	Eutróficos	50.46 mg/dL	11.60	0.491
	Con Obesidad	46.04 mg/dL	13.68	

Tabla 5: Perfil lipídico de nuestro grupo de estudio. *Significancia estadística $p \leq 0.05$

Los resultados del análisis del perfil lipídico muestra que los valores de colesterol total, triglicéridos, colesterol VLDL y colesterol LDL se encuentran en concentraciones más elevadas en los niños con obesidad respecto a los niños eutróficos sanos con una diferencia estadísticamente significativa. No siendo así para el colesterol HDL, que en ambos grupos se encuentra en concentraciones séricas similares. Los resultados varían con los reportados, ambos en adultos, por Moreno Navarrete y colaboradores en el 2012 en España, donde no encontraron diferencias en concentración de triglicéridos ni colesterol HDL, y con Żak-Goląb en el 2013 en Polonia no encontraron diferencias significativas en la concentración de colesterol total ni colesterol LDL. En Monterrey, Nuevo León, México se encontraron significativamente más elevados los 5 parámetros del perfil lipídico, mediciones realizadas en adolescentes (Marcos-Daccarett et al 2005). Las dislipidemias están sujetas a las modificaciones alimenticias, culturales y sociales de cada región, son factores modificables para prevenir alteraciones metabólicas.

Analito	Clasificación OMS	Media	Desviación Estándar	<i>p</i>
Bilirrubina directa	Eutróficos	0.73 mg/dL	0.23	0.551
	Con Obesidad	0.86 mg/dL	0.20	
Bilirrubina indirecta	Eutróficos	0.21 mg/dL	0.29	0.489
	Con Obesidad	0.32 mg/dL	0.26	
Bilirrubina total	Eutróficos	0.95 mg/dL	0.38	0.219
	Con Obesidad	3.47 mg/dL	14.91	
AST	Eutróficos	35.53 U/L	22.00	0.964
	Con Obesidad	34.40 U/L	20.00	
ALT	Eutróficos	29.57 U/L	7.03	0.000*
	Con Obesidad	37.84 U/L	17.74	
Fosfatasa Alcalina	Eutróficos	218.55 U/L	93.40	0.981
	Con Obesidad	145.90 U/L	89.55	
GGT	Eutróficos	16.42 U/L	3.73	0.001*
	Con Obesidad	33.73 U/L	20.26	
DHL	Eutróficos	562.84 U/L	131.66	0.118
	Con Obesidad	502.88 U/L	104.36	

Tabla 6: Pruebas de funcionamiento hepático de los grupos de estudio. *Significancia estadística $p \leq 0.05$

Los resultados del análisis del perfil de funcionamiento hepático muestran que únicamente los valores de Alanina Aminotransferasa y gamma glutamiltransferasa se encuentran más elevados en niños con obesidad.

Analito	Clasificación OMS	Media	Desviación Estándar	<i>p</i>
Sodio	Eutróficos	140.88 mmol/L	3.05	0.946
	Con Obesidad	140.13 mmol/L	2.95	
Potasio	Eutróficos	4.56 mmol/L	0.88	0.060
	Con Obesidad	4.84 mmol/L	1.14	
Calcio	Eutróficos	9.53 mg/dL	0.39	0.040*
	Con Obesidad	9.40 mg/dL	0.56	
Cloro	Eutróficos	102.24 mmol/L	2.94	0.038
	Con Obesidad	99.88 mmol/L	2.24	
Magnesio	Eutróficos	1.95 mg/dL	0.20	0.241
	Con Obesidad	2.14 mg/dL	0.25	
Fosforo	Eutróficos	5.10 mg/dL	0.72	0.216
	Con Obesidad	4.15 mg/dL	0.87	

Tabla 7: Electrolitos séricos de los grupos de estudio. *Significancia estadística $p \leq 0.05$

Los resultados del análisis de electrolitos séricos muestra solamente una diferencia significativa en la concentración de Calcio significativamente más elevada en niños eutróficos.

ANALISIS HEMATOLOGICOS

Analito	Clasificación OMS	Media	Desviación Estándar	<i>p</i>
Leucocitos	Eutróficos	6.96 miles	2.49	0.267
	Con Obesidad	7.27 miles	1.63	
Linfocitos	Eutróficos	41.24 %	9.19	0.415
	Con Obesidad	35.03 %	7.43	
Monocitos	Eutróficos	8.25 %	1.39	0.852
	Con Obesidad	8.25 %	1.66	
Neutrófilos	Eutróficos	46.69 %	9.77	0.665
	Con Obesidad	53.16 %	8.50	
Eosinófilos	Eutróficos	3.05 %	2.37	0.255
	Con Obesidad	2.99 %	1.78	
Basófilos	Eutróficos	0.75 %	0.57	0.003*
	Con Obesidad	0.46 %	0.34	
Eritrocitos	Eutróficos	5.07 millon/ μ L	0.31	0.116
	Con Obesidad	5.100 millon/ μ L	0.43	
Hemoglobina	Eutróficos	14.46 g/dL	0.97	0.008*
	Con Obesidad	15.17 g/dL	1.51	
Hematocrito	Eutróficos	43.08 %	2.37	0.044*
	Con Obesidad	45.21 %	3.66	
VGM	Eutróficos	85.09 fL	4.43	0.228
	Con Obesidad	88.91 fL	5.07	
HCM	Eutróficos	28.57 pg/cel	1.75	0.109
	Con Obesidad	29.59 pg/cel	2.52	
CHCM	Eutróficos	33.55 %	0.92	0.075
	Con Obesidad	33.70 %	1.56	
Plaquetas	Eutróficos	303.74 miles/ μ L	85.35	0.828
	Con Obesidad	276.24 miles/ μ L	75.29	

Tabla 8: Parámetros hematológicos del grupo de estudio. *Significancia estadística $p \leq 0.05$

Los valores de la biometría hemática muestran diferencias significativas en los valores de hemoglobina y hematocrito siendo ambos mayores en niños con obesidad.

EXTRACCION DE DNA

Tras la electroforesis de todas las muestras probadas (Vaca, Cerdo y Humano) se pudo observar que la técnica mediante la cual era obtenida la banda de mayor intensidad y concentración relativa en gel de agarosa al 0.8% es con la técnica de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico. Por ello se estableció esta como la técnica de elección.

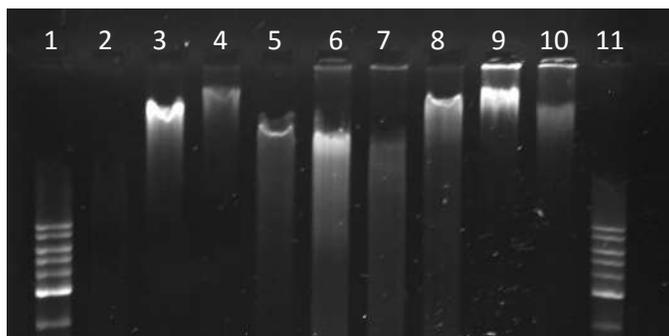


Figura 5. Gel de agarosa 0.8%, 1. Marcador de Peso Molecular, 2. Materia fecal humana técnica QUIAGEN, 3. Muestra fecal de cerdo técnica QUIAGEN, 4.- Muestra fecal de Vaca técnica QUIAGEN, 5.- Muestra fecal Humana técnica DNAzol, 6. Muestra fecal de cerdo técnica DNAzol, 7. Muestra fecal de vaca técnica DNAzol, 8. Muestra fecal Humana técnica Fenol: Cloroformo, 9. Muestra fecal de cerdo técnica Fenol: Cloroformo, 10. Muestra fecal de vaca técnica Fenol: Cloroformo, 11. Marcador de Peso Molecular.

Previo a la utilización de las extracciones el material genético se cuantificó por medio de espectrofotómetro Nanodrop 2000, colocando una cantidad de 2 μ L y esperando la lectura; se comprobó que en su mayoría se había degradado el material genético o era ya insuficiente para el total de ensayos. Por lo que se tomó la decisión de hacer una búsqueda de otro kit comercial que tuviera características diferentes y permitiera un óptimo asilamiento y que tuviera diferencias entre las marcas comerciales utilizadas anteriormente.

Se realizó una electroforesis y una cuantificación en Nanodrop 2000 se comprobó la pureza de las extracciones, mediante la lectura en el Nanodrop 2000, todos ellos con un valor cercano al 1.8.

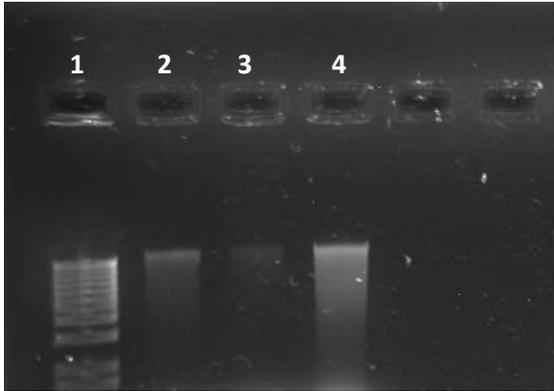


Figura 6. Electroforesis de extracción de materia fecal con kit marca BIOLINE. Gel de agarosa 0.8%, 1. Marcador de Peso Molecular, 2. Materia fecal Vaca 3. Muestra fecal de cerdo 4.- Muestra fecal de humana.

BUSQUEDA DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS

Se realizó una búsqueda de la secuencia en formato FASTA del gen 16S rRNA de cada uno de los géneros bacterianos en cuestión, dentro de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se observó un porcentaje de identidad del 100% entre la mayoría de los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y entre otros géneros bacterianos, y/o otros grupos taxonómicos como hongos y arqueas (Stephen F. Altschul et al 1997) que podía ser diferenciado únicamente por secuenciación. Por lo que se procedió a la búsqueda bibliográfica de oligonucleótidos específicos validados que permitieran una identificación de las especies. Todos ellos fueron analizados con la herramienta bioinformática oligoanalyzer 3.0 en IDT Scitools.

Se buscaron características específicas de cada oligonucleótido, algunas de estas características fueron que el tamaño de amplificación fuera de menos de 200 nucleótidos, que las temperaturas de alineamiento fueran similares y que se haya demostrado que no amplificaran DNA de otros géneros o especies, sobre todo dentro la familia *Enterobacteriaceae*. Finalmente se eligieron aquellos que hubieran sido probados y analizados; la lista de los mismos está a continuación:

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño	Tm (°c)	Fuente
Bacterias totales	F GCAGGCCTAACACATGCAAGTC R TGCTGCCTCCCGTAGGAGT	315	60	Marchesi 1998 Amman et al 1995
<i>Enterobacterias</i>	F ATGGCTGTCGTCAGCTCGT R CCTACTTCTTTTGCAACCCACTC	385	60	Leser et al 2002 Sghir et al 2000
<i>Salmonella spp.</i> Gen <i>ttrC-ttrA</i>	F CTCACCAGGAGATTACAACATGG R AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC PROBE HEX-CACCGACGGCGAGACCGACTT-T-BHQ1	95	60	Van Lint et al 2014
<i>E. coli</i>	F CATGCCGCGTGTATGAAGAA R CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	180	60	Huijsdens et al 2002
<i>K. pneumoniae</i>	F TGCCAGACCGATAACTTTA R CTGTTTCTTCGCTTCACGG	142	55	Sun et al 2009
<i>Shigella spp/ EIEC</i> Gen <i>ipaH</i>	F CCTTTCCGCGTTCCTTGA R CGGAATCCGGAGGTATTGC PROBE ROX-CGCCTTTCCGATACCGTCTCTGCA-BHQ2	64	60	Van Lint et al 2014
<i>Serratia marcescens</i> <i>LuxS</i>	F TGCCTGGAAAGCGGCGATGG R CGCCAGCTCGTCGTTGTGGT PROBE-6FAM-GTGGTACCTACCACATGCACTCGCTGGAA-BHQ1a	155 70.3	66.6 66.6	Joyner et al 2013
<i>Yersinia enterocolitica</i> Gen <i>ali</i>	F TCGTTTGCTTATACCCATCAGG R CCCAGTAATCCATAAAGGCTAACA PROBE TYE705-CAATGGGGCCATCTTCCGCA-iowa black	140	60	Van Lint et al 2014

Tabla 9: Relación de la secuencia de los oligonucleótidos específicos para enterobacterias.

Se realizaron las PCR *in silico* a estos oligonucleótidos utilizando una herramienta informática en <http://insilico.ehu.es>; los primeros dos por amplificar para todo el dominio bacteria y el segundo para toda la familia Enterobacteriaceae, se probaron en diferentes bacterias todas dando el mismo tamaño de amplificación, hubo también resultados de amplificación con los demás oligonucleótidos probados.

ESTANDARIZACION DE OLIGONUCLEOTIDOS Y RECTAS PATRON

Se obtuvieron cultivos bacterianos de referencia y/o aislados de muestras clínicas para realizar curvas patrón con los oligonucleótidos de elección. Estas cepas fueron:

- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhi*
- *Klebsiela pneumoniae*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Shigella flexneri*
- *Shigella sonnei*
- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter cloacae*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Salmonella sp.*

Se utilizó un método de conservación de cepas que consistió en realizar un siembra en medio de cultivo BHI sólido (BD Bioxon Agar Infusión Cerebro Corazón, Becton Dickinson de México S.A de C.V.), se incubó 24 horas a 37°C, una vez aisladas las colonias bacterianas se tomó un inóculo para resiembra en medio BHI líquido, se incubaron 24 horas a 37°C, se tomó 850 µL del cultivo líquido más 150 µL de Glicerol estéril, se homogeneizó por inversión y se almacenaron a -80°C.

ESTANDARIZACION DE LAS RECTAS PATRON

Se realizaron mediante la técnica de PCR las curvas patrón correspondientes para estandarizar las concentraciones de oligonucleótidos de bacterias totales, enterobacterias, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y descartar amplificaciones inespecíficas. Se utilizaron las extracciones de material genético extraído de cultivos puros de las cepas control.

Las concentraciones finales para cada reacción son las siguientes:

Bacterias Totales

Forward (10 μ M)	1.4 μ L
Reverse (10 μ M)	1.4 μ L
SYBER Green	10 μ L
Agua DEPC	5.2 μ L
ADN (20 ng/ μ L)	2 μ L

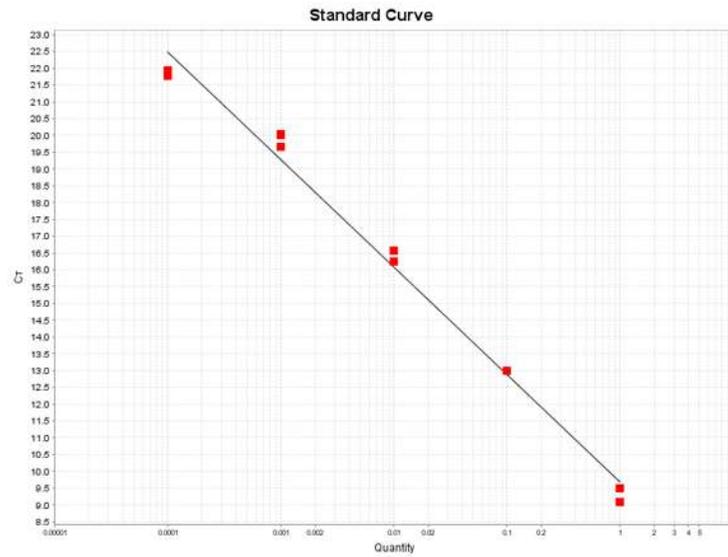
Enterobacterias

Forward (10 μ M)	1.4 μ L
Reverse (10 μ M)	1.4 μ L
SYBER Green	10 μ L
Agua DEPC	5.2 μ L
ADN (20 ng/ μ L)	2 μ L

Klebsiella pneumoniae

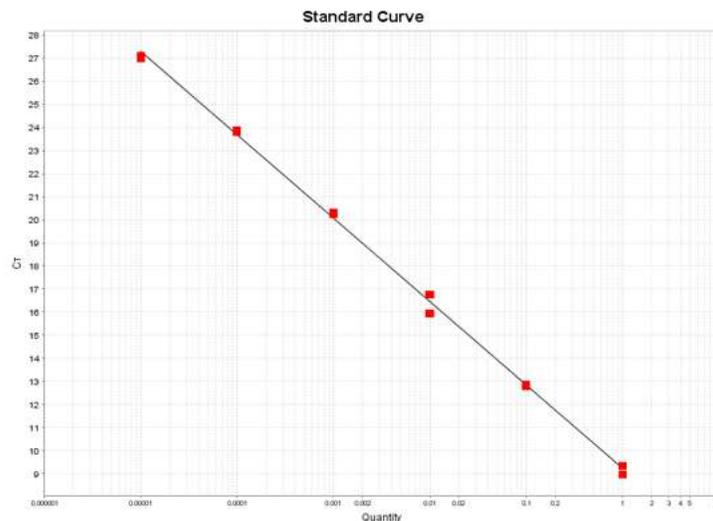
Forward (50 μ M)	0.5 μ L
Reverse (50 μ M)	0.5 μ L
SYBER Green	10 μ L
Agua DEPC	8 μ L
ADN (20 ng/ μ L)	1 μ L

RECTAS PATRON



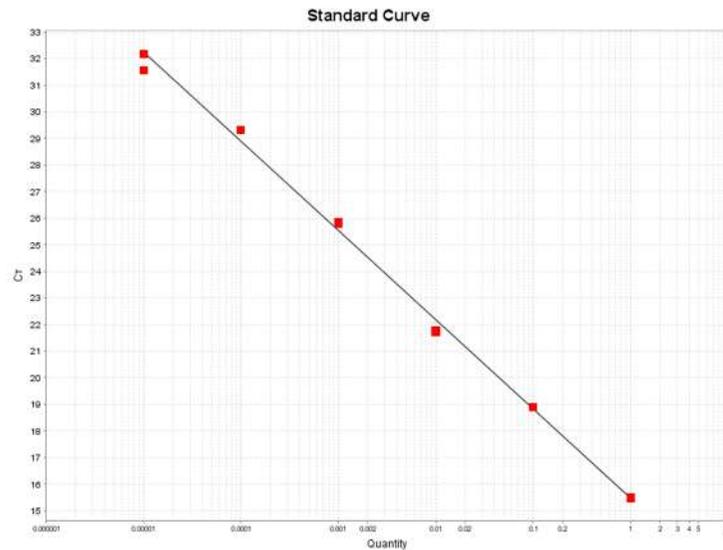
**Figura 7. Recta patrón con oligonucleótidos para Bacterias totales.
Con una pendiente= -3.61, R²=0.99 y una eficiencia de 89.18%**

En esta recta se observa una pendiente de -3.61, un coeficiente de correlación de 0.99 y una eficacia de 89.18%.



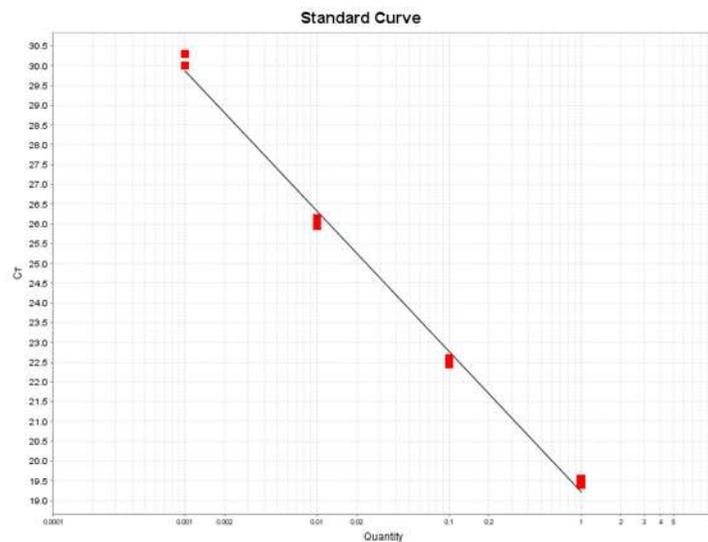
**Figura 8. Recta patrón con oligonucleótidos para Enterobacterias.
Con una pendiente= -3.19, R²=0.99 y una eficiencia de 105.59%**

En esta recta se observa una eficiencia una pendiente de -3.19, un coeficiente de correlación de 0.99 y una eficacia de 105.59%.



**Figura 9. Recta patrón con oligonucleótidos específicos para *Klebsiella pneumoniae*.
Con una pendiente= -3.35, R²=0.99 y una eficiencia de 98.86%**

En esta recta se observa una eficiencia una pendiente de -3.35, un coeficiente de correlación de 0.99 y una eficacia de 98.86%.



**Figura 10. Recta patrón con oligonucleótidos específicos para *Escherichia coli*.
Con una pendiente= -3.55, R²=0.99 y una eficiencia de 91.12%**

En esta recta se observa una eficiencia una pendiente de -3.55, un coeficiente de correlación de 0.99 y una eficacia de 91.12%.

Posteriormente se corrieron dos geles de agarosa al 1% para verificar la especificidad de la amplificación y la ausencia de más de un amplificado.

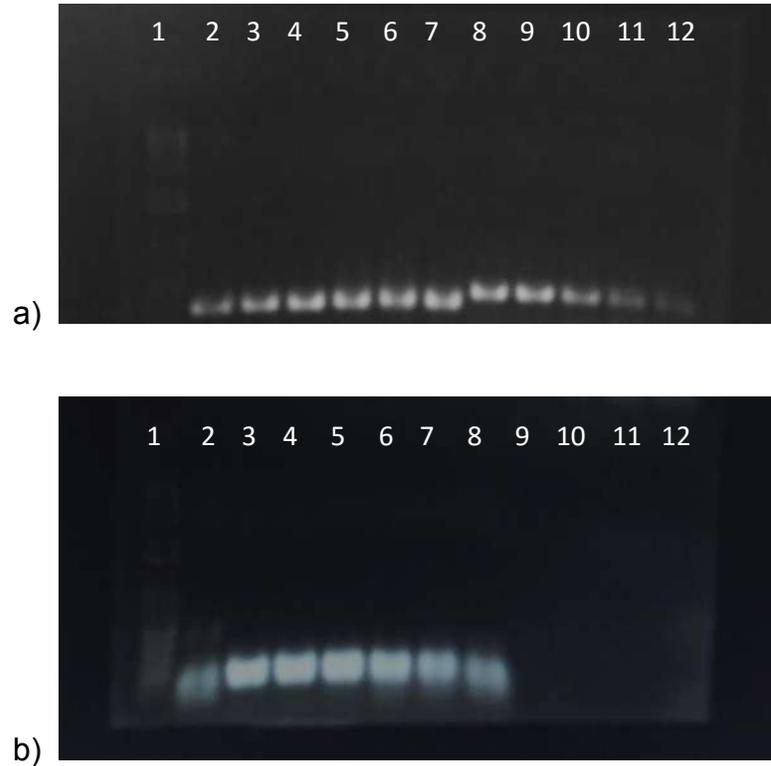


Figura 11. Geles de agarosa 1%, a) 1. Marcador de Peso Molecular, 2 – 7: Curva de calibración para amplificación de bacterias totales. 8 – 12: Curva de calibración para amplificación de Enterobacterias, b) 1. Marcador de Peso Molecular. 3 – 9 Curva de calibración para amplificaciones específicas de *Klebsiella pneumoniae*.

CUANTIFICACION RELATIVA DE BACTERIAS

Se realizaron las cuantificaciones del material genético en cuestión, se analizaron las determinaciones de Bacterias totales, Enterobacterias, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

El valor de Ct (de Cycle threshold sus siglas en inglés) equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance el umbral en la señal de fluorescencia. La comparación de los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas de ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor sea la cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor es el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial de ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad de ADN en la muestra. (Wong y Medrano 2005)

Aplicando la fórmula: $[No]_A/[No]_B=2^{(-\Delta Ct)}$

A continuación se muestran las gráficas de los resultados de la cuantificación relativa con respecto a los niños eutróficos. En base a los datos se estandarizó a 1 los resultados del grupo control para hacer más fácil la visualización de los mismos.

CUANTIFICACION RELATIVA DE BACTERIAS

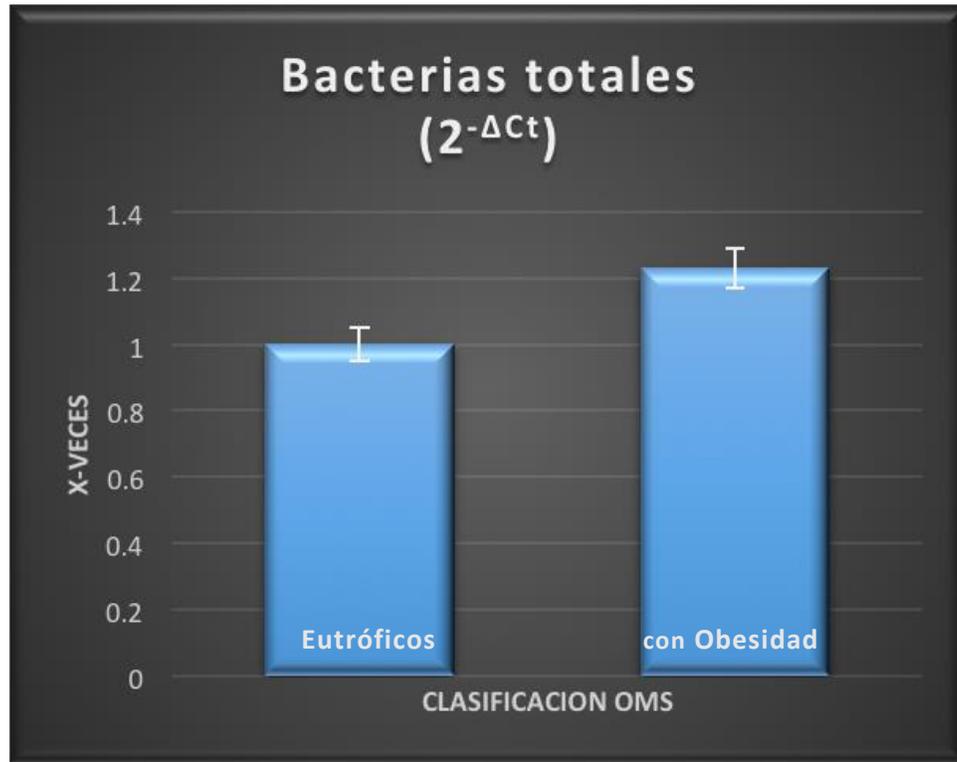


Figura 12. Comparación de la concentración de Bacterias totales en nuestros grupos.

Por cada unidad de Bacterias totales en niños eutróficos, se encontró un incremento de 0.23 unidades en niños con obesidad dentro de la población de estudio. Esta diferencia no es estadísticamente significativa. Esto quiere decir que ambos grupos presentan la misma concentración de bacterias totales.

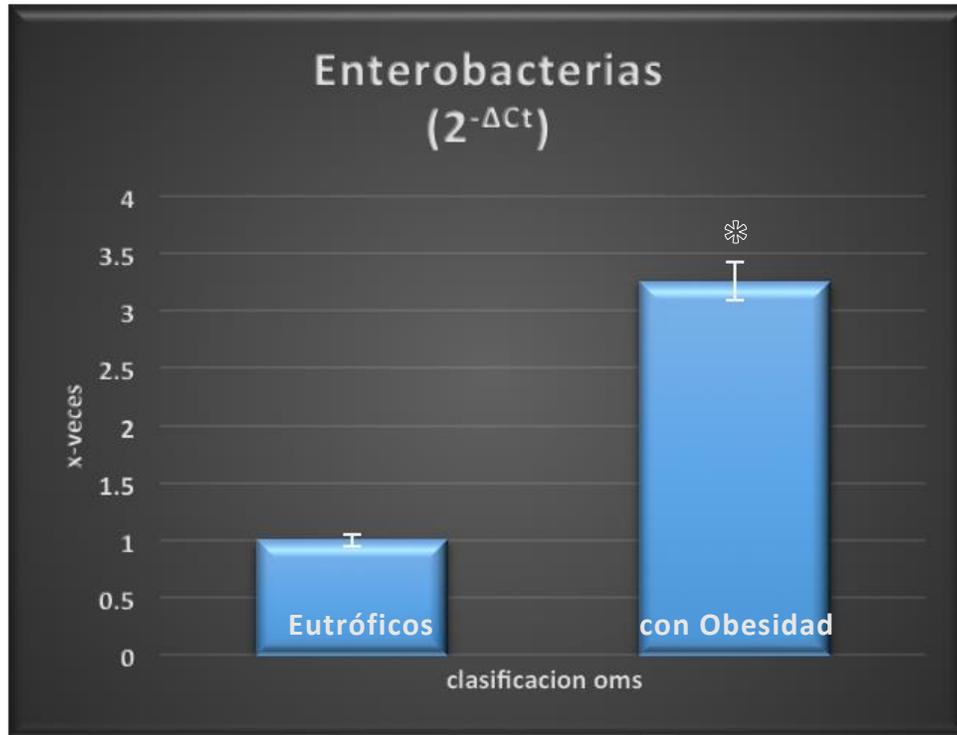


Figura 13. Comparación de la concentración de Enterobacterias en nuestros grupos.

En la comparación entre la cantidad de Enterobacterias presentes en cada grupo se observa que por cada unidad en niños eutróficos se encontró 2.25 unidades en niños con obesidad dentro de nuestra población. Esta diferencia es estadísticamente significativa con una $p=0.001$. Siendo mayor la presencia de enterobacterias en niños con obesidad.

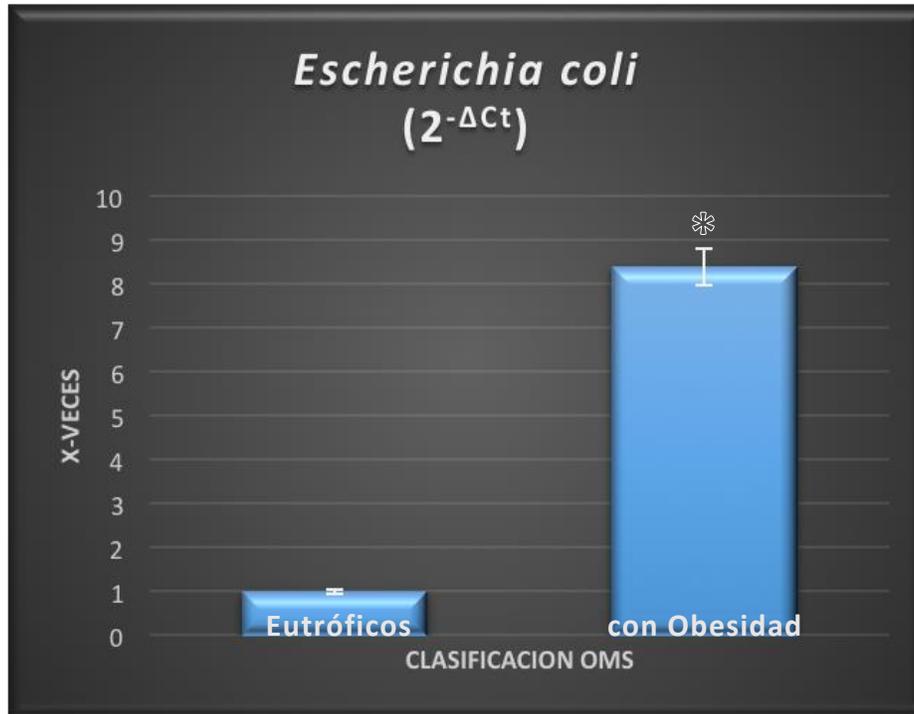


Figura 14. Comparación de la concentración de *Escherichia coli* en nuestros grupos.

Se observa que por cada unidad de *Escherichia coli* en niños eutróficos encontramos 7.38 unidades en niños con obesidad dentro de nuestra población. Esta diferencia es estadísticamente significativa con una $p=0.018$. Siendo mayor la concentración en niños que tienen obesidad.

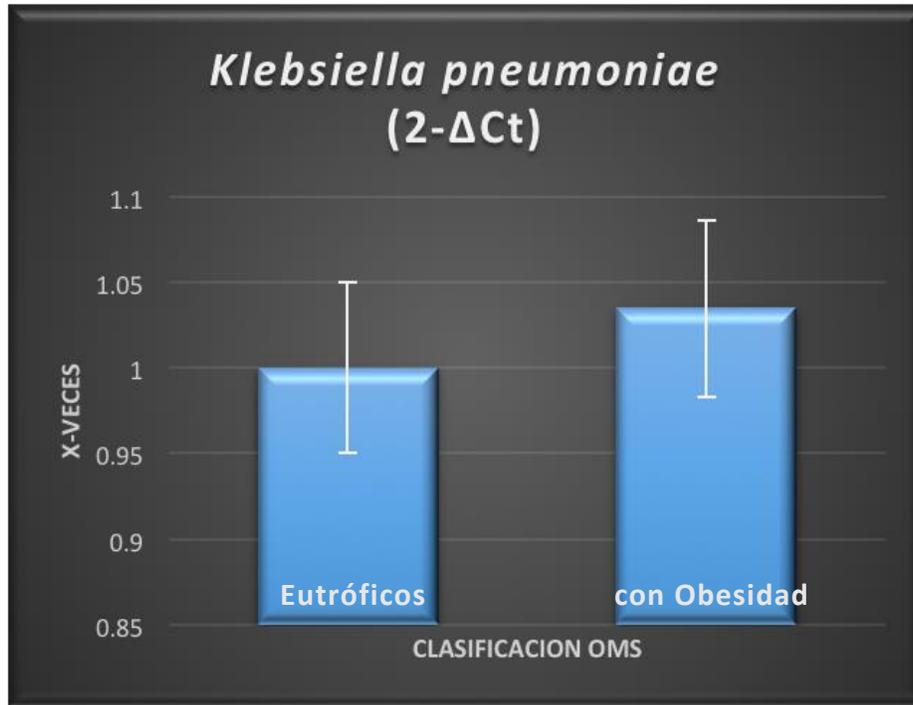


Figura 15. Comparación de la concentración de *Klebsiella pneumoniae* en nuestros grupos.

Se observa que por cada unidad de *Klebsiella pneumoniae* en niños eutróficos encontramos 0.03 unidades en niños con obesidad dentro de nuestra población. Esta diferencia no es estadísticamente significativa. Esto quiere decir que ambos grupos presentan la misma concentración de bacterias totales.

ANALISIS ESTADISTICO DE LA CUANTIFICACION RELATIVA DE BACTERIAS

A continuación se presenta la tabla de las medias y desviaciones estándar de la $2^{-\Delta Ct}$. Mediante una prueba de T de Student comparamos ambos grupos. Se observa diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de Enterobacterias y *Escherichia coli*, ambas se presentan en mayor nivel en niños obesos, no siendo así para los niveles de bacterias totales y *Klebsiella pneumoniae*.

Bacteria		Media de $2^{-\Delta Ct}$	<i>p</i>
Bacterias totales	Eutróficos	4.77597×10^{-06}	0.671
	Con Obesidad	5.87528×10^{-06}	
Enterobacterias	Eutróficos	2.93107×10^{-06}	0.001*
	Con Obesidad	9.54893×10^{-06}	
<i>Escherichia coli</i>	Eutróficos	8.09124×10^{-04}	0.018*
	Con Obesidad	6.786416×10^{-03}	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Eutróficos	9.39344×10^{-05}	0.549
	Con Obesidad	9.7199×10^{-05}	

Tabla 10: Cuantificación de bacterias totales, Enterobacterias, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en niños eutróficos y con obesidad.

CUANTIFICACION SÉRICA DE ZONULINA

Se realizó la cuantificación de Zonulina sérica por duplicado para las 72 muestras. Los resultados presentan una media= 597.80 ± 372.94 para niños eutróficos y una media= 1060.23 ± 573.62 para niños con obesidad, presentando una diferencia estadísticamente significativa, con una $p=0.023$, con una mayor concentración en niños con obesidad.

Para facilitar la lectura e interpretación de los valores numéricos se realizó una conversión de unidades esto dividiendo los nanogramos obtenidos (originalmente en ng/mL) entre 1000, como resultado tenemos los valores expresados en microgramos sobre mililitro ($\mu\text{/mL}$)

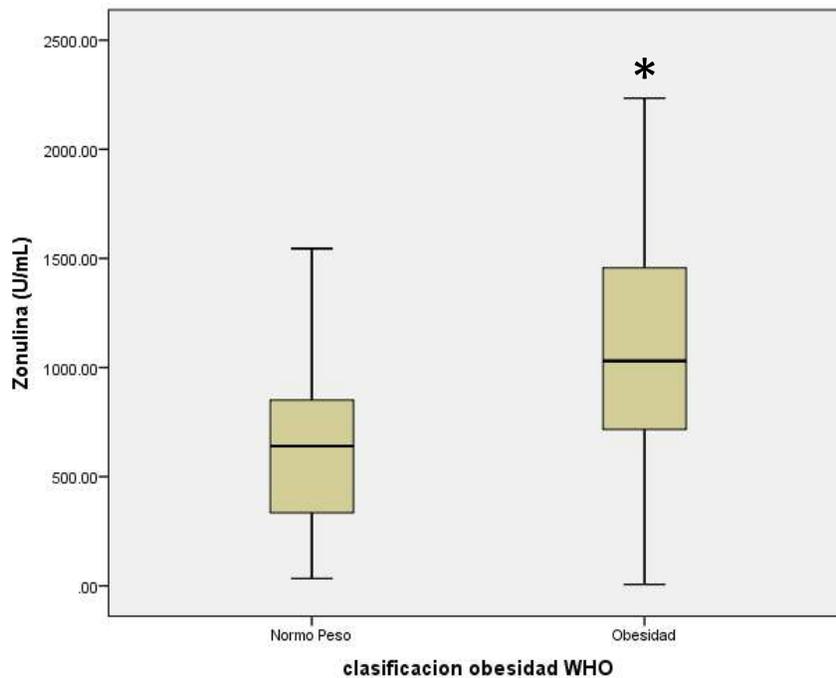


Figura 16. Diagrama de caja de la comparación de medias de las concentraciones de zonulina sérica con respecto a la clasificación de obesidad de la organización mundial de la salud. Con una $p= 0.023$.

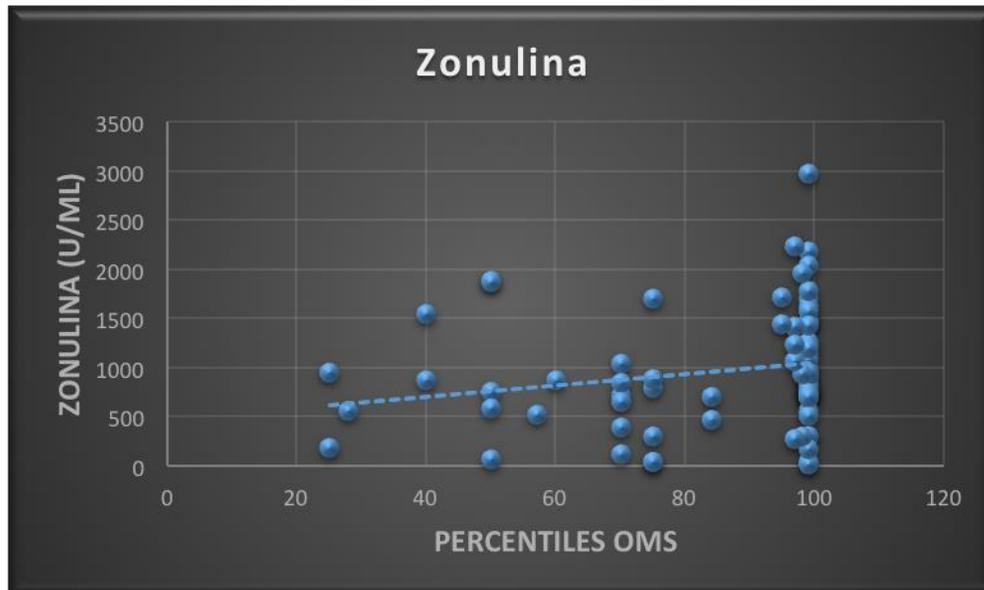


Figura 17. Grafica de concentración de zonulina sérica con respecto al percentil.

Con una $R^2=0.042$, y una $p= 0.015$.

En esta grafica de zonulina sérica respecto al percentil de la OMS se observa que la concentración de zonulina tiene una tendencia a aumentar conforme aumenta el percentil y se presenta una correlación positiva ente la concentración de zonulina y la clasificación de obesidad según la OMS.

CORRELACIONES

Se realizó una correlación de Pearson para cada una de las siguientes variables: las concentraciones zonulina sérica y los análisis bioquímicos, zonulina y conteos hematológicos, zonulina y niveles de bacterias en materia fecal; se encontraron correlaciones estadísticamente significativas. Las correlaciones positivas están dadas entre:

Zonulina y obesidad ($R^2=0.398$; $p=0.001$)

Zonulina y neutrófilos ($R^2=0.291$; $p=0.017$)

Zonulina y glucosa ($R^2=0.300$; $p=0.014$)

Zonulina y urea ($R^2=0.365$; $p=0.003$)

Zonulina con BUN ($R^2=0.398$; $p=0.003$)

Zonulina con creatinina ($R^2=0.310$; $p=0.011$)

Zonulina con colesterol total ($R^2=0.303$; $p=0.013$)

Zonulina con GGT ($R^2=.260$; $p=0.035$)

Se presentaron también correlaciones negativas, estas entre

Zonulina y linfocitos ($R^2=-0.343$; $p=0.004$)

Zonulina y fosforo ($R^2=-0.250$; $p=0.043$)

Zonulina con DHL ($R^2=-0.390$; $p=0.001$)

No se encontraron correlaciones entre zonulina y los niveles de bacterias en materia fecal.

Concuerdan con Moreno Navarrete 2012, en insulina y glucosa en ayuno en su correlación positiva con zonulina sérica en adultos. No existen reportes de su correlación con creatinina, GGT, o de las correlaciones negativas con linfocitos, fósforo y DHL.

Con el aumento de LPS provenientes de la microbiota que van desde el sistema gastrointestinal hasta el torrente sanguíneo, ocurren modificaciones a nivel hepático, tejido adiposo, hipotálamo y muscular, como el aumento del factor adipocítico inducido por el ayuno, aumento en la inflamación de dichos órganos y disminución de la sensibilidad a insulina (Tsukumo et al 2014) estas alteraciones pueden verse reflejadas en los niveles séricos de biomarcadores como por ejemplo GGT, DHL colesterol, insulina y glucosa. Son necesarias más investigaciones que permitan ver a nivel celular la interacción entre estos biomarcadores y las concentraciones séricas de zonulina.

DISCUSION

Se comprobó que tanto el grupo de niños eutróficos sanos como el de niños con obesidad sin ninguna otra patología agregada podían ser comparados entre si ya que presentaban la misma media de edad y no existía diferencia de género entre ellos.

Dentro de las características bioquímicas se encontraron algunos valores que no tenían diferencias, sin embargo algunos valores como glucosa, creatinina, insulina, colesterol total, colesterol VLDL, colesterol LDL, triglicéridos, gamma glutamil transferasa presentaron diferencias estadísticamente significativas, mostrando así el efecto deletéreo en el metabolismo así como el estado pro inflamatorio propio de la obesidad. (Blancas-Flores et al 2010). Estos son factores a tomar en cuenta para el diagnóstico de la obesidad y comorbilidades asociadas a ella, hasta el momento en México se cuenta con información que permite mediante indicadores antropométricos hacer la evaluación. Tal como lo publicado por Kaufer-Horwitz y Toussaint Georgina en 2008, sería conveniente incluir en estos datos los perfiles bioquímicos que aporten información del estado metabólico y oxidativo, lo que podría considerarse como un factor de riesgo alto, vinculado al desarrollo temprano de comorbilidades asociadas a la obesidad. (Rentería et al 2015)

En este trabajo la estandarización de la técnica de aislamiento de DNA de materia fecal pudo ser utilizada para la técnica q-PCR, a pesar de que presento diversos contratiempos, como lecturas 260/280 inferiores a 1.8 indicadores de contaminación por proteínas, compuestos fenólicos u otros tipos de contaminantes, el almacenamiento de la muestra, la degradación del material extraído, la interferencia de los productos de desecho y otros factores que están ausentes cuando se realiza un aislamiento a partir de cultivos puros, facilitando el aislamiento y su posterior uso en técnicas de q-PCR, sin embargo, a diferencia de este, la extracción directa de materia fecal presenta ventajas, ya que el tiempo de extracción es tres veces más corto, y si de identificación bacteriana para diagnostico se refiere, esto significa un tiempo de tratamiento de más oportuno. Es

importante mencionar también que al utilizar el kit de extracción de la marca BIOLINE se evitó la contaminación por compuestos fenólicos y que mediante geles de agarosa 0.8% se comprobó que no había presencia de proteínas, así que se atribuye a compuestos contaminantes que están presentes en la materia fecal *per se*.

Otro de nuestros objetivos era la búsqueda de oligonucleótidos específicos que pudieran dar solo un producto de amplificación en presencia de especies bacterianas de diferentes familias como las presentes dentro de una misma muestra fecal, y al ser todas las especies de nuestro interés de la misma familia es más factible hacer una búsqueda bibliográfica intensiva para encontrarlos, y mucho más práctico que diseñarlos. Todos cumplían con las características requeridas, sin embargo por cuestión de tiempo y presupuesto únicamente utilizamos tres pares de los siete encontrados. Aún queda la alternativa de que al poder formar un perfil más amplio sea posible una correlación más detallada de la microbiota presente en pacientes pediátricos con obesidad.

Para realizar las curvas patrón se utilizaron cepas control, estas fueron analizadas bioquímicamente para asegurar su género y especie, todas presentaron el patrón de características reportado. La calidad de estas curvas patrón pueden ser juzgadas a partir de la pendiente y del coeficiente de correlación (R^2). En teoría la pendiente no debe ser menor a -3.33 porque eso implicaría una eficiencia de PCR mayor a 1 ($>100\%$) e indicar que se producen más de dos amplificaciones por ciclo. (Deprez et al 2001). Tanto las cepas control como las curvas patrón cumplieron con los estándares de precisión y sensibilidad, es decir, no presentaban amplificaciones inespecíficas, esto comprobado en tanto con la curva como con el gel de agarosa al 1%. Con ello se pudo asegurar la confiabilidad necesaria para el procesamiento de las muestras de pacientes.

A lo largo de la vida ocurren cambios estructurales en la composición de la microbiota fecal demostrando mayores cambios en la estructura de las comunidades bacterianas asociado a enfermedad y envejecimiento. (Hopkins et al,

2001). Dentro de las investigaciones realizadas para tratar de encontrar relaciones entre la obesidad y el tipo de microbiota presente en materia fecal encontramos estudios mayoritariamente realizados en sujetos adultos, Radilla-Vázquez y colaboradores en la ciudad de Chilpancingo realizaron un estudio en jóvenes entre 18 y 25 años de edad, para determinar la endotoxemia metabólica y la biota intestinal, un estudio enfocado a medir las bacterias totales, y algunas otras familias como *Lactobacillus*, *Bacterioides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* y *Escherichia coli*, encontrando que los números de bacterias totales en muestras fecales eran más altos en pacientes con peso normal, con respecto a los obesos, y que estos últimos presentaban niveles más altos de *Clostridium leptum*, y *Lactobacillus* y niveles más bajos de *Prevotella* y *E. coli*, y que ambos grupos no tenían diferencias en niveles de *B. fragilis* y *Bifidobacterium* (Radilla-Vázquez et al 2016), Estos resultados son similares a los que se han encontrado dentro de este trabajo de investigación, donde al comparar grupos, en este trabajo los niños, tanto eutróficos como con obesidad, se presentaron un mayor nivel de *Escherichia coli* en pacientes que tienen obesidad, esto también concuerda con lo reportado por

El aislamiento de DNA proveniente de materia fecal puede ser una tarea desafiante, la presencia de diversas comunidades bacterianas así como la simbiosis con parásitos comensales, arqueas e incluso los mismos materiales de desecho en la materia fecal como pigmentos biliares, restos celulares y nucleasas son factores que impiden que un aislamiento de características ideales.

EL almacenamiento de las muestras afecta la detección de algunas especies bacterianas, un estudio realizado en Alemania en el 2015, se examinó el tiempo apropiado de almacenamiento de muestras, mediante la comparación de la expresión relativa bacteriana, se almacenaron muestras por 3, 7, 14 y 30 días en refrigeración. Todas las bacterias examinadas demostraron un cambio en la expresión al ser comparadas con el día 0, Bacteroidetes decrecieron significativamente al día 14, mientras que Firmicutes al día 3, *Lactobacillus* y Enterobacteriaceae decrecieron significativamente al día 30. (Gorzela, et al 2015)

El quinto objetivo fue la cuantificación de zonulina sérica, los resultados presentados concuerdan con otros estudios como Moreno-Navarrete 2012 y Żak-Gołąb en el 2013, en ambos estudios, los pacientes eran adultos obesos manejan concentraciones más elevadas de esta proteína, podemos entonces decir que para los pacientes pediátricos el caso es el mismo. Con la glucosa sucede lo contrario, se encontró una correlación positiva moderada, a mayor concentración de zonulina, mayor concentración de glucosa, esto concuerda con los estudios realizados en adultos, sin embargo se ha encontrado una correlación más fuerte en estos pacientes pediátricos que lo que se muestra en adultos (Żak-Gołąb 2013).

A pesar de que las diferencias en contenido de Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* fueron significativamente diferentes entre niños eutróficos y obesos y que también se detectaron diferencias en los niveles de zonulina, no se pudo demostrar una correlación entre el contenido bacteriano y el nivel sérico de zonulina en niños de 5 a 12 años con obesidad.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- No existe una correlación entre la concentración sérica de zonulina y el nivel de bacterias en muestras fecales de niños eutróficos y obesos.
- Existe una correlación positiva entre el percentil de índice de masa corporal para la edad y la concentración sérica de zonulina.
- Existen correlaciones entre la concentración sérica de zonulina y parámetros bioquímicos específicos que también indican daño metabólico y oxidativo en los pacientes con obesidad. Sería interesante realizar más estudios comparativos tanto transversales como longitudinales que permitieran revelar la influencia de uno sobre el otro.
- La evaluación de la abundancia relativa de más especies bacterianas, particularmente de la familia Enterobacteriaceae permitirá hacer predicciones respecto a la función de éstas en la obesidad infantil.

BIBLIOGRAFIA

- Asmar Rahzi El, Panigrahi Pinaki, Bamford Penelope, Berti Irene, Not Tarcisio, Coppa Giovanni V., Catassi Carlo, Fasano Alessio. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1607-1615.
- Bäckhed F., H. Ding, T. Wang et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(44): 15718–15723.
- Bearson S., Bearson B., Foster J. W. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 147; 173 – 180.
- Blancas-Flores Gerardo, Almanza-Pérez Julio C., López-Roa Rocio I., Alarcón-Aguilar Francisco J., García-Macedo Rebeca, Cruz Miguel. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2009; Vol. 66: 88-97
- Cole T.J., Bellizzi M.C., Flegal K. M., Dietz W. H. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey, 2000, Vol. 320; 1-6.
- Lekanne Deprez Ronald H., Fijnvandraat Arnoud C., Ruijter Jan M., Moorman Antoon F. M. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBER green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analy Biochem*. 2001; 307: 63-69
- FAO/WHO (2004). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. In meeting report. <http://www.adb.org/Documents/Produced-Under-TA/37599/OS-Food-Safety-EN.pdf>.
- Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity and cancer. *Physiol Rev*. 2011; Vol. 91:151-175
- Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann New York Acad Sci*. 2012; Vol. 1258(1): 25-33.
- Fasano A. Intestinal Permeability and its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012; Vol. 10(10): 1096 – 1100.

- Fei Na, Zhao Liping. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME Journal*. 2013; vol.7: 880-884.
- Flanagan J.J., Arjomandi A., Delanoy M.L., Du Paty E., Galea P., Laune D., Rieunier F., Walker R.P., Binder S.R. Development of monoclonal antibodies to pre- haptoglobin 2 and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. of Immun Meth.* 2014; Vol.406: 34-42
- Fraga R. G. M., Huertes D. B. Evaluacion básica de la función renal en pediatría. *Protoc diag ter pediatr.* 2014; Vol. 1: 21-35
- Gragera A., B., Enfermedades infecciosas. Infecciones por enterobacterias. Revisiones y actualizaciones. 2002; Vol. 09 (64): 3385 – 3397
- Gorzelak M. A., Gill S.K., Tasnim N., Ahmandi-Vand Z. Jay M., Gibson D. L. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool. *Plos one.* 2015; 10 (8)
- Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp.* 2007; Vol. 22(supl. 2): 14-9
- Hopkings M J, Sharp R, Macfarlane G T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community celular fatty acid profiles. *Gut jnl.* 2001; 48:198-205
- Huijsdens Xander W., Linskens Ronald K., Mark Mariette, Meiwissen Stephan G. M., Vandenbroucke-Grauls Cristina M. J. E., Savelkoul Paul H., M. Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *Jour Clinic Micro.* 2002; Vol. 40:12. 4423-4427
- Icaza-Chavez ME, Microbiota intestinal en la salud y en la enfermedad. *Rev de Gastro de Méx.* 2013. Vol. 78 (4): 240-248
- Joyner Jessica, Wanless David, Sinigiliano Christopher D., Lipp Erin K. Use of Quantitative Real-Time PCR for Direct Detection of *Serratia marcescens* in Marine and Other Aquatic Enviroments. *Applied and Enviromental Microbiology.* 2009; Vol.80: (5): 1679 – 1683
- Judy S, Karen L, Josephson, Suresh D. Pilai, Moretza Abbaszadegan, Charles P. Gerba, Specific Detection of salmonella spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Applied and Enviromental Microbiology.* 1993. Vol. 59:(5), 1437-1479

- Karlsson L.J. Caroline, Önerfält Jenny, Xu Jie, Molin Göran, Ahné Siv, Thorngren-Jerneck Kristina. The Microbiota of the Gut in Preschool Children with Normal and Excessive Body Weight. *Pediatric Obesity*. 2012; Vol. 20: 2257-2261.
- Kaufer-Horwits Martha, Toussaint Georgina. Indicadores antropométricos para evaluar sobrepeso y obesidad en pediatría. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2008; Vol. 65: 502-518
- Koneman Elmer W., Allen Stephen D., Jandan William M. Diagnóstico microbiológico. Panamericana. 5ª edición.1999
- Lawrwnce JG., Ochman H., Molecular archaeology of the Escherichia coli genome. *Proc Natl Acad Sci USA*.1998. Vol 4; 95 (16):9413-7
- Lupino Floriana S., de Wit Leonore M., Bouvy Paul F., Stijnen Theo, Cujipers Pim, Penninx Brenda W.J.H., Zitman Frans G. Overweight, Obesity, and Depression A sistematic review and Meta-analysis of Longitudinal Studies. *JAMA Psychiatry*. 2010. Vol. 67(3)
- Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganism. *Microbes Infect*. 2001; 3(12):1021-35.
- Malpica Cruz, Donat's Christopher. Estandarizacion de la prueba de ensayo inmunoenzimático para la deteccion de anticuerpos IgG en sueros humanos para el virus Phlebotomus fever. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2001.
- Mansy M. S. M., Fadl A. A., Ashour M. S. E., Khan M. I. Amplification of Proteus mirabilis chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. 1999; 13: 133-140.
- Marchesi Julian R., Sato Takuichi, Weightman Andrew J., Martin Tracey A., Fry Jonh C., Hiom Sarah J., Wade William G. Desing and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Enviromental Microbiology*. 1998; Vol. 64 (2) p. 795-799.
- Marcos-Deccarett N. J., Nuñez-Rocha G. M., Salinas-Martínez A. M., Santos-Ayarzagoitia M., Decanini-Arcaute H. Obesidad como factor de riesgo para transtornos metabólicos en adolescentes mexicanos, 2005. *Rev Salud Pública*. 2007. Vol. 9 (2): 180-193

- María Magdalena Farías N., Catalina Silva B., Jaime Rozowsky N. Microbiota Intestinal: Rol en la Obesidad. Rev Chil Nutr. 2011. Vol. 38: (2): 228-233
- Moreno-Navarrete JM., Sabater M., Ortega F., Ricart W., Fernández-Real JM. Circulatin Zonulin, a marker of intestinal permeability is increased in association with obesity-Associates insulin Resistance. PLoS ONE. 2012; Vol. 7(5).
- Pereyra Abel, Guedes Alexis D, Verreschi Ieda TN, Santos Raul D, Martinez Tania LR, La obesidad y su asociación con los demás factores de riesgo cardiovascular en escolares de Itapetinga, Brasil. Arq Bras Cardiol. 2009; Vol. 93 (3): 248-255
- Pérez-Morales Eugenia, Jimenez-Cruz Arturo, Alcántara-Jurado Luis, Armendáriz-Anguiano Ana, Bacardí-Gascón Montserrat. Association of obesity and Eating in the Absence of Hunger Among College Students in a Mexican-USA Border City. J. común healt. 2014; Vol. 39:432-436
- Puerta-García A., Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias, Medicine. 2010; Vol. 10 (51): 3426-31
- Radilla-Vázquez R.M., Parra-Rojas I., Martínez-Hernández N. E., Márquez-Sandoval Y. F., Illades-Aguilar B., Castro-Alarcón N., Gut microbiota and metabolic endotoxemia in Young obese mexican subjets. Obese facts. 2016; Vol. 9(1): 1-11.
- Rentería Ivan, Arenas-Berumen Ever, Arellano-García María E., Carrasco-Legleu Claudia E., De Leon-Fierro Lidia G., Arenas-Breumen Enrique A. Factores que inciden el daño oxidativo en niños con obesidad: estudio piloto. 2015; Vol. 31(4):1499-1503
- Rodríguez-Ángeles G. Principales características de diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Pública Mex. 2002; 44; 464-475
- Rodríguez J M., Sobrino O. J., Marcos A., Collado M. C., Pérez-Martínez G., Martínez-Cuesta M. C., Peláez C., Requena T. ¿Existe una relacion entre la microbiota intestinal, el consumo de probióticos y la modulación del peso corporal? Nutr Hosp. 2013; Vol. 28 suplemento 1.
- Salazar V. B., Rodriguez M. M., Guerrero R. F. Factores bioquímicos asociados a riesgo cardiovascular en niños y adolescentes. Rev Med IMSS. 2005; Vol. 43 (4): 299-303

- Secretaría de Salud (2010) Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria: estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. 2010. México DF: Sub-Secretaría de Prevención y Promoción de la Salud de la Secretaría de Salud. pp. 12–13.
- Sjöberg Richard L. Nilsson KentW. Leppert Jerzy. Obesity, Shame, and Depression in School-Aged Children: A Population-Based Study. *Pediatrics*. 2005. Vol. 116 No.3
- Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3389-3402.
- Sun Feilong, Wu Daocheng, Qiu Zhigang, Jim Min, Wang Xinwei, Li Junwen. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green for the specific detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula. *Elsevier*. 2009; 487-491.
- Tsen H.Y., Lin C.K., Chi W.R. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *Journal of Appl Micro*. 1998; 85: 554-560
- Van Lint P., De Witte E., De Henau H., De Muynck A., Verstraeten L., Van Herendael B., Weekx S. Evaluation of Real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. /EIEC, and *Yersinia enterocolitica* in fecal samples. *Internat Journal of Med Microbiol*. 2014. Vol. 301(7), 577-584.
- Vazquez N.F., Treviño GMN, Saldívar AH. Prevalencia de Sobrepeso y Obesidad en niños de educación primaria: su relación con variables sociodemográficas y de salud. *MSS*. 2013; Vol.3 N.3.
- Wang Wenle, Uzzau Sergio, Goldblum Simeon E., Fasano Alessio. Human Zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Journal of Cell Science* 2000; 113: 4435-4440.
- Wang Y. Hoening JD, Malin JK, Qamar S, Petrof OE, Sun J, Antonopoulos DA, Chang EB, Claud EC. 16SrRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without netrotizing enterocolitis. *The ISME Journal, chicago*. 2009; IL. Vol. 3: 944-954.
- Way Judy s., Josephson Karen L., Pillai Suresh D., Abbaszadegan Morteza, Gerba Charles P., Pepper Ian L. Specific Detection of *Salmonella* spp. By Multiplex Polimerase Chain Reaction, *Applied and Enviromental Microbiology*. 1993; 59(5): 1473-1479.

- Wong M. L. y J. F. Medrano. Real-time PCR for mRNA Quantitation. Bio Techniques. 2005. Vol. 39: 75-85
- Yang Fan, Yang Jian, Zhang Xiaobing, Chen Lihong, Jiang Yan, Yan Yonglian, Tang Xudong, Wang Jing, Xiong Zhaohui, Dong Jie, Xue Ying, Zhu Yafang, Xu Xingye, Sun Lilian, Chen Shuxia, Nie Huan, Peng Junping, Xu Jianguo, Wnag Yu, Yuan Zhenghong, Wen Yumei, Yao Zhijian, Shen Yan, Qiang Boqin, Hou Yunde, Yu Jun, Jin Qi. Genome dynamics and diversitu of Shigella species the etiologic agents of bacillary dysentery. Nucleic Acids Research. 2005. Vol. 33; (19): 6445-6458}
- Żak-Goląb A., KoceBack P., Aptekorz M., Zientara M., Juszczuk A. Martirosian G., Chudek J., Olszanecka-Glinuanowicz. Gut microbiota, micrionflammation, metabolic profile and zonulin concentration in obese and norma weigth subjets. International journal of endocrinology. 2013; Vol.2013.
-