TRABAJOS ORIGINALES

Rev ACAD 2017; 33(1): 13-20

ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL ASOCIADA AL DESARROLLO DE OBESIDAD EN PACIENTES

ALTERATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF OBESITY IN PATIENTS

E. Nistal[1,5], L.E. Sáenz de Miera[2], M. Ballesteros-Pomar[3], S. Sánchez-Campos[1,4], B. Álvarez-Cuenllas[5], M. Aparicio-Cabezudo[5], M. Jiménez-Palacios[5], J.L. Olcoz[5], M.T. Arias-Loste[6], J. Crespo-García[6], F. Jorquera-Plaza[4,5]

[1]Instituto de Biomedicina (IBIOMED) Universidad de León. [2]Área de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León. [3]Servicio de Endocrinología y Nutrición. Complejo Asistencial Universitario de León. [4]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III. [5]Servicio de Aparato Digestivo. Complejo Asistencial Universitario de León. [6]Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Universidad de Cantabria. Santander.

RESUMEN

Introducción: la microbiota intestinal se considera uno de los nuevos factores clave que participan en la obesidad y en los trastornos metabólicos asociados. Los avances llevados a cabo en los últimos años respecto al papel que desempeña la microbiota intestinal plantean la posible utilidad de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en la modificación del microbioma intestinal.

Objetivo: comparar las comunidades de bacterias presentes en muestras fecales de 20 individuos sanos delgados y 53 pacientes obesos.

Métodos: amplificación de la región V3-V4 del ARNr 16S, seguido de un análisis de pirosecuenciación.

Resultados: el análisis estadístico determinó que el número de secuencias del filo *Proteobacteria* es superior en pacientes obesos que en los individuos control. También se mostraron diferencias significativas en el filo *Firmicutes* dentro del grupo de los pacientes obesos, asociadas a la existencia de enfermedad de hígado graso no alcohólico. En total se identificaron 617 géneros de bacterias observándose diferencias significativas en la proporción de varios géneros entre los pacientes obesos y los individuos control. La comparación de las comunidades de bacterias a nivel de género mediante un análisis de coordenadas principales indica que las comunidades de bacterias de los individuos control se agrupan de forma separada de las comunidades de bacterias de pacientes obesos. Además, en los pacientes obesos se observó una riqueza bacteriana mayor que en los individuos control.

Conclusión: estos resultados demuestran el papel de la disbiosis intestinal en el desarrollo de obesidad, así como la importancia de la modificación de la microbiota como posible alternativa terapéutica.

Palabras clave: obesidad, microbiota intestinal, pirosecuenciación, disbiosis.

TRABAJO ENVIADO: 10/01/2017
ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN: 20/01/2017
CORRESPONDENCIA:
Esther Nistal
Complejo Asistencial Universitario de León
Altos de Nava s/n. 24071 León.
esthernistal@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: the intestinal microbiota is considered one of the new key factors involved in obesity and associated metabolic disorders. The advances made in recent years regarding the role of the intestinal microbiota raise the potential utility of new therapeutic approaches based on the modification of the microbiome.

Objetive: to compare the bacterial communities present in fecal samples from 20 healthy lean individuals and 53 obese patients.

Methods: amplification of the 16S rRNA V3-V4 region, followed by a pyrosequencing analysis.

Results: statistical analysis determined that the number of sequences of the phylum *Proteobacteria* was higher in obese patients than in control individuals. Significant differences were also shown in the phylum *Firmicutes* within the group of obese patients, associated with the existence of non-alcoholic fatty liver disease. A total of 617 bacterial genera were identified, with significant differences in the proportion of several genera between obese patients and control subjects. Comparison of bacterial communities at the genus level by a principal coordinate analysis indicated that the bacterial communities of the control individuals were grouped separately from the bacterial communities of the obese patients. In addition, in obese patients a higher bacterial richness was observed than in control individuals.

Conclusions: these results demonstrate the role of intestinal dysbiosis in the development of obesity, as well as the importance of modifying the microbiota as a possible therapeutic alternative.

Keywords: obesity, intestinal microbiota, pyrosequencing, disbiosis.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es actualmente uno de los principales problemas de salud pública, debido a su creciente prevalencia, y se asocia a otras enfermedades como la resistencia a la insulina, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o el síndrome metabólico[1]. El desarrollo de la obesidad está determinado por una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales, culturales, sociales y el gasto energético, el cual está altamente influenciado por el nivel de actividad física de cada individuo[2-5]. Recientemente, la microbiota intestinal ha pasado a ser considerada como uno de los nuevos factores clave que participan en la obesidad y en los trastornos metabólicos asociados. De hecho, se ha demostrado que ratones carentes de microbiota intestinal son resistentes a desarrollar obesidad, esteatosis y resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa[6,7]. Por otro parte, también se ha confirmado la capacidad de la microbiota intestinal de asimilar nutrientes, así como su participación en la regulación de genes encaminados a favorecer el almacenamiento lipídico en el tejido adiposo y en el hígado[8], lo que podría explicar en parte dicho efecto sobre el peso y su relación con el desarrollo de síndrome metabólico y de hígado graso no alcohólico[9,10]. Además, se han mostrado cambios en la composición de la microbiota intestinal tanto en animales como en pacientes humanos obesos en comparación con individuos delgados[11]. La mayoría de los estudios han reflejado un descenso relativo en la abundancia de filo *Bacteroidetes* frente un incremento en el filo *Firmicutes* asociado a la población obesa, así como un descenso en la diversidad bacteriana en dichos pacientes[12,13]. Sin embargo, estos hallazgos están sujetos a una gran controversia por lo que no se pueden generalizar[14,15].

Los tratamientos tradicionales basados en dietas hipocalóricas y el aumento de la actividad física han tenido cierto éxito en el control de la obesidad. Sin embargo, por lo general estas estrategias dan lugar a reducciones de peso limitadas y temporales, lo que justifica el planteamiento de nuevos enfoques terapéuticos como podría ser la modulación de la microbiota intestinal. Estas estrategias incluyen la administración de prebióticos que estimulan el crecimiento y/o la actividad metabólica de las bacterias beneficiosas o el aporte de probióticos en forma de alimentos funcionales y/o suplementos[16-18]. Asimismo, recientemente se ha propuesto la utilidad del trasplante de microbiota intestinal como mecanismo terapéutico[19]. Por todo ello, el objetivo del presente estudio fue comprobar la relación existente entre una determinada riqueza y diversidad de la microbiota intestinal y la presencia de un fenotipo metabólico concreto, comparando dicha microbiota en individuos sanos frente a obesos y a su vez dentro de estos últimos, considerando las diferencias asociadas al desarrollo de síndrome metabólico y su manifestación hepática, la enfermedad de hígado graso no alcohólico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras fecales

Se recogieron muestras fecales de pacientes obesos adultos (rango de edad entre 20 y 60 años) procedentes de los Servicios de Aparato Digestivo del Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE) y del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. 73 sujetos fueron incluidos en este estudio, distribuidos en 53 pacientes obesos (30 pacientes obesos de León y 23 pacientes obesos de Santander) y 20 individuos sanos control (10 individuos sanos de León y 10 controles de Santander). Todos los pacientes fueron caracterizados en detalle desde un punto de vista demográfico (edad, sexo y raza), con un número equivalente de hombres y mujeres dentro de la muestra total. También se les analizó desde un punto de vista antropométrico (índice de masa corporal y perímetro de cintura y cadera) y bioquímico plasmático (glucosa, creatinina, insulina, colesterol total, LDL y HDL, triglicéridos y enzimas hepáticas). Asimismo, se comprobó la resistencia a la insulina utilizando el modelo homeostático (HOMA-RI). En todos los sujetos del estudio se determinó de modo semi cuantitativo la existencia de esteatosis mediante la realización de una ecografía abdominal y se valoró la presencia de fibrosis con la realización de elastometría de transición (Fibroscan) y en algunos casos seleccionados, en función de los requerimientos clínicos, se practicó una biopsia hepática, que confirmó la presencia de esteatosis y/o fibrosis. Todos los pacientes fueron seronegativos para el virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C y virus de la inmunodeficiencia humana.

En el caso de los individuos control, las muestras fecales fueron obtenidas a partir de individuos voluntarios sanos sin sobrepeso que no presentaban enfermedades

Rev ACAD 2017; 33(1): 13-20

diagnosticadas, ni síntomas de enfermedades digestivas conocidas en el momento de la toma de las muestras. La recepción de las muestras fecales se llevó a cabo en ambos complejos hospitalarios por parte del personal del Servicio de Aparato Digestivo. Los pacientes llevaron las muestras a temperatura ambiente en un recipiente estéril que se le proporcionó en el mismo hospital días previos a la recogida. Una vez recogidas, las muestras fecales fueron homogeneizadas, alicuotadas y congeladas (-80ºC) en un tiempo no superior a 3 horas tras la defecación. Ninguno de los individuos incluidos en el estudio fue tratado con antibióticos durante al menos un mes antes de la toma de las muestras. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio a la toma de muestras. Así mismo, se solicitó la aprobación de los protocolos de estudio por parte de la Comisión de Ética de ambos hospitales.

Extracción de ADN de las muestras fecales

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo a partir de 200 mg de las diferentes muestras fecales empleando el kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo que aporta el kit, con alguna modificación. Se incluyó un paso previo de lisis mecánica empleando perlas de vidrio (0,7 mm) durante diez minutos y la temperatura de lisis se incrementó para así facilitar la extracción de ADN de células bacterianas difíciles de lisar. La concentración de ADN extraído de cada una de las muestras fue determinada empleando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y se almacenó a -20ºC hasta su amplificación.

Amplificación mediante PCR del 16S rDNA

A partir del ADN extraído de cada una de las muestras fecales, se llevó a cabo una reacción de PCR empleando cebadores universales correspondientes a las regiones V3-V4 del ARN ribosomal 16S. Como primer forward se empleó el cebador 5'tcgtcggcagcgtcagatgtgt ataagagacagCCTACGGGNGGCWGCAG3' y como primer reverso, el cebador: 5'gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacag GACTACHVGGGTATCTAATCC3'[20]. Dichos cebadores llevan acoplados al extremo 5' un adaptador específico (indicado en letras minúsculas) para la posterior secuenciación con el sistema MiSeq de Illumina. Las condiciones de PCR empleadas fueron 3 min a 95ºC, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 55ºC y 30 segundos a 72ºC, y una extensión final a 72ºC durante 5 minutos. Cada mezcla de reacción (25 µl) contenía 50 ng de ADN genómico, 0,5 µl del primer forward (0,2 µM), 0,5 µl de primer reverso (0,2 µM) y 12,5 µl de 2x KAPA HifiHotStart Ready Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Por cada individuo se llevaron a cabo 3 reacciones de PCR que se mezclaron y posteriormente se purificaron empleando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

Pirosecuenciación con MiSeq System de Illumina

La mezcla de productos de PCR purificados se envió al servicio de pirosecuenciación de la Universidad de Cantabria donde se empleó el secuenciador MiSeq (Illumina). En la secuenciación se añadieron índices a las muestras para poder analizarlas de forma simultánea, y asignar cada lectura a la muestra de la que procedía.

Análisis bioinformático y estadístico

Para el análisis de los datos se empleó la aplicación 16S Metagenomics Basespace en el portal online de Illumina (https://basespace.illumina.com/home/index). Esta aplicación proporciona un flujo de trabajo específico para las secuencias del ARN ribosomal 16S de la subunidad pequeña de los ribosomas. Incluye el filtrado de las secuencias por su calidad, asignación de las lecturas a cada muestra a partir de los índices, eliminación de cebadores, ensamblado de las secuencias a partir de las lecturas en los sentidos directo e inverso. La aplicación también permite la clasificación taxonómica de las secuencias utilizando la herramienta Classifier del RDP (Ribosomal Database Proyect, http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp) utilizando como referencia la base de datos de secuencias 16S del Greengenes (Mayo, 2013) y la asignación de las secuencias a OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales) con la herramienta Clustering (también del RDP) utilizando una identidad mínima del 97%.

Con el objeto de comparar las diferentes comunidades de bacterias estudiadas presentes en el colon de individuos con normopeso y pacientes obesos se hizo un análisis estadístico utilizando los paquetes estadísticos SPSS versión 22.0 para Windows y R, en este último caso utilizando el paquete Vegan, programado para el análisis específico de comunidades ecológicas (http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html). En todos los casos los valores de p inferiores a 0,05 en los test estadísticos se consideraron significativos. También se ha determinado la riqueza de las comunidades de bacterias estudiadas basándose en el número de filotipos u OTUs presentes mediante un análisis de rarefacción, empleando también el paquete Vegan.

RESULTADOS

Composición de las comunidades de bacterias a nivel de filo

Se obtuvo un total de 19.683.256 secuencias mediante un análisis de pirosecuenciación a partir de 73 muestras fecales con una media de 269.634 ± 145.866 secuencias por muestra. Cada librería contenía entre 41.604 y 999.815 lecturas. La mayoría de las secuencias identificadas a partir de las muestras fecales se clasificaron dentro de tres filos. Los filos *Firmicutes* (46%) y *Bacteroidetes* (45%) fueron los más representativos, seguidos por el filo *Proteobacteria*

(4%) que aparece en menor proporción. Estos tres filos representan más del 90% de las secuencias analizadas. La **figura 1A** muestra la composición relativa de bacterias a nivel de filo para ambos grupos, control y obeso. El análisis estadístico mostró diferencias significativas asociadas a la obesidad en el filo *Proteobacteria* ($p<0,05$; prueba U de Mann-Whitney) respecto a los individuos control **(Figura 1B)**. Asimismo, cabe destacar la existencia de diferencias significativas dentro del filo *Firmicutes* entre pacientes obesos con NAFLD y sin NAFLD ($p<0,05$) **(Figura 1B)**. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* entre pacientes obesos e individuos control.

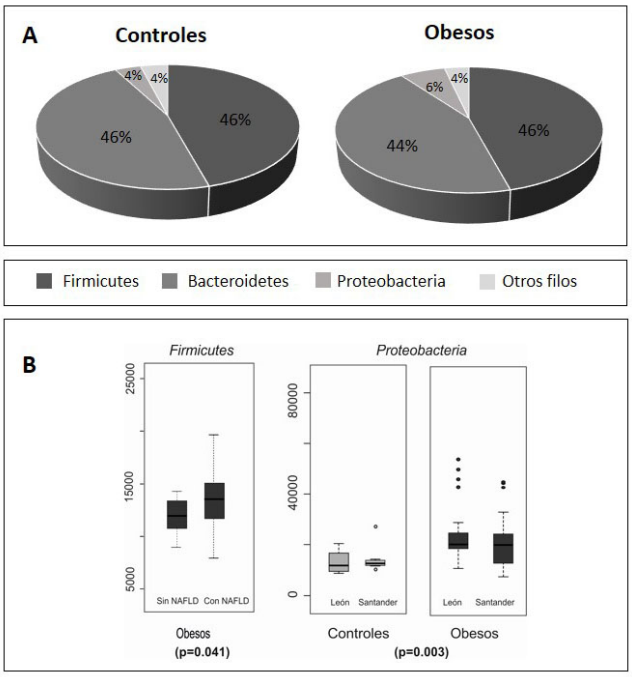

Figura 1. A) Diagrama sectorial mostrando la distribución de los filos bacterianos en muestras fecales de individuos control y pacientes obesos. En cada sector se indica el porcentaje correspondiente de cada uno de los filos. B). Box plot reflejando las principales diferencias significativas a nivel de filo mediante el Test U de Mann-Whitney ($p<0,05$).

Composición de las comunidades de bacterias a nivel de género

El análisis filogenético de las secuencias determinó la presencia de 617 géneros de bacterias conocidas a partir de muestras fecales de pacientes obesos e individuos control. En la **figura 2** aparecen representados los géneros que presentaban más de 1.000 secuencias, mientras que la detección del resto de los géneros tuvo lugar en menor proporción. La mayoría de las secuencias pertenecieron a los géneros: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Clostridium* y *Oscillospira* **(Figura 2)**.

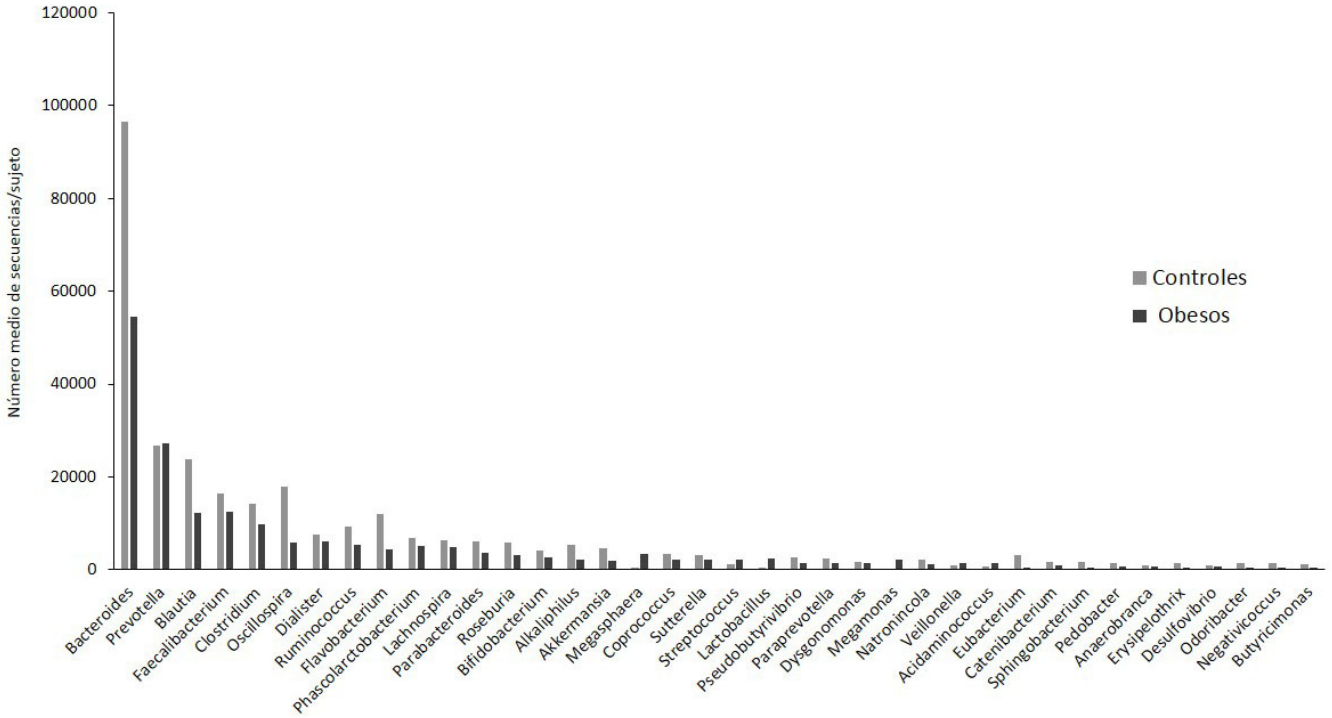

Figura 2. Número medio de secuencias de los géneros bacterianos conocidos encontrados en las muestras fecales de individuos control y pacientes obesos. Los géneros representados en la gráfica mostraron más de 1.000 lecturas.

Rev ACAD 2017; 33(1): 13-20

El número de secuencias de *Blautia*, *Oscillospira*, *Flavobacterium*, *Alkaliphillus* y *Eubacterium* fue menor en pacientes obesos que en individuos control. El Test U de Mann-Whitney indicó que estas diferencias fueron significativas (p<0,05) en función del diagnóstico de obesidad. Por el contrario, el número de secuencias de *Prevotella*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Meganomas* y *Acidaminococcus* reveló un incremento significativo en pacientes obesos (p<0,05) **(Figura 3)**.

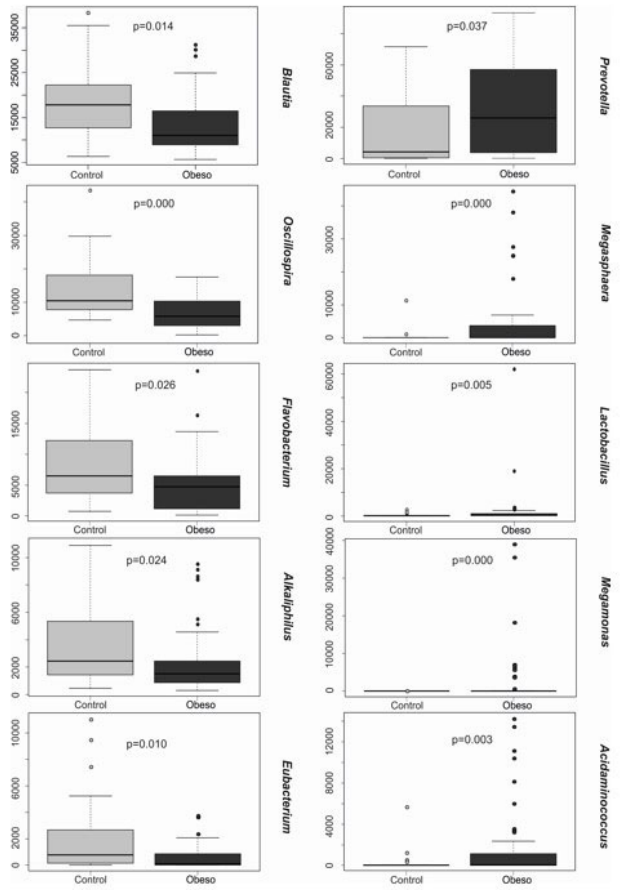

Figura 3. *Box plot* representando las principales diferencias a nivel de género entre los individuos control y los pacientes obesos en función del diagnóstico empleando el Test U de Mann-Whitney (p<0,05).

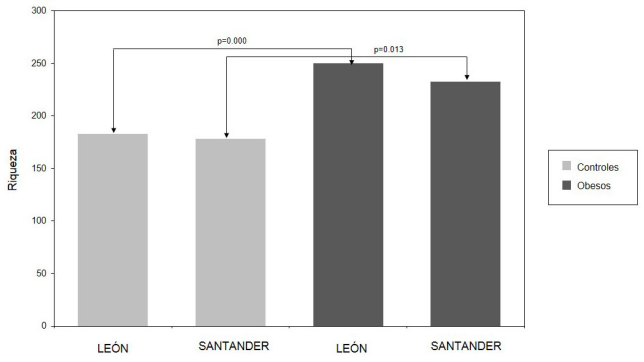

Figura 4. Comparación de la riqueza bacteriana entre individuos control y pacientes obesos en ambas localizaciones geográficas. Las flechas entre las columnas representan las diferencias significativas que existen entre las comunidades bacterianas determinadas mediante el Test U de Mann-Whitney (p<0,05).

Riqueza de las comunidades de bacterias

Se estudió la riqueza bacteriana en los pacientes obesos y en los individuos control de ambas localizaciones geográficas. El análisis de riqueza bacteriana en la provincia de León mostró la presencia de 182,82 ± 22,87 OTUs en los individuos control y 249,86 ± 27,41 OTUs en pacientes obesos. Resultados similares se obtuvieron a partir de las muestras fecales de la provincia de Santander. En los individuos control la riqueza bacteriana (178,42 ± 31,22 OTUs) fue inferior a la detectada en los pacientes obesos (232,52 ± 53,76 OTUs). Respecto a los individuos control, las muestras fecales de Santander presentaron una riqueza bacteriana menor que la correspondiente a los individuos control procedentes de León. Resultados similares se observan en los pacientes obesos. El análisis estadístico mostró que existían diferencias significativas en la riqueza bacteriana entre los dos grupos, con normopeso y obesos, tanto en conjunto como considerando ambas localizaciones geográficas por separado (p<0,05) **(Figura 4)**.

Análisis comparativo de las comunidades de bacterias

Una vez estudiada cada comunidad de bacterias en cuanto a su composición, seguidamente se midió la diversidad Beta en las muestras fecales tanto de individuos control como de pacientes obesos con el fin de determinar si existían diferencias en la composición global de las comunidades de bacterias entre los dos grupos.

Se realizó un **A**nálisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en el índice de desemejanza Chao (este índice es cualitativo, considera la presencia de OTUs comunes o diferentes en las comunidades comparadas) con el objetivo de estudiar los factores que explican la variación entre las distintas comunidades de bacterias (procedentes de 20 individuos control y 53 pacientes obesos). La **figura 5** muestra que las comunidades de bacterias de los individuos control se agrupan de forma separada respecto a las comunidades de pacientes obesos en función del eje 1 que explica un 3,75% de la varianza total en el PCoA. Algunas comunidades de bacterias de los pacientes obesos se encuentras dispersas a lo largo de este eje. El resto de los ejes explican una proporción de la varianza relativamente bajo y no aportó información acerca de la variación de las comunidades.

DISCUSIÓN

Durante décadas, el estudio de la microbiota bacteriana que forma parte del ecosistema intestinal se ha realizado a través de técnicas clásicas obteniendo cultivos puros. Sin embargo, muchas de las bacterias no se cultivan fácilmente en el laboratorio[21], por lo que es necesario recurrir al empleo de las técnicas moleculares para obtener una idea más detallada de la composición de la microbiota intestinal. El avance más reciente en el desarrollo de estas técnicas es la "metagenómica" que permite el análisis

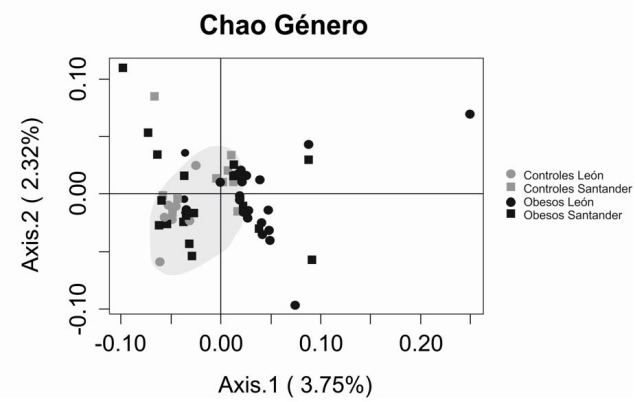

Figura 5. Comparación entre los 20 individuos control y los 53 pacientes obesos de ambas localizaciones geográficas mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en el índice de desemejanza Chao. El porcentaje de varianza explicado por cada eje aparece indicado en paréntesis. El área sombreada muestra el agrupamiento de las comunidades de bacterias de los individuos control.

rápido de comunidades microbianas presentes en un determinado nicho ecológico, obteniendo un rendimiento mayor de lo que anteriormente era posible[22]. Durante los últimos años, varios proyectos han intentado mediante estas técnicas descifrar la estructura y funcionalidad de la microbiota intestinal humana, así como su relación con determinadas enfermedades gastrointestinales[23-27]. Esto ha permitido considerar a la microbiota intestinal como un nuevo factor implicado en la regulación del peso corporal y las enfermedades asociadas a la obesidad[28].

En este estudio, la composición y la diversidad de las comunidades de bacterias presentes en muestras fecales de individuos sanos con normopeso y pacientes obesos se han realizado mediante una de las técnicas más resolutiva de secuenciación de alto rendimiento, la pirosecuenciación. Los resultados han mostrado que la mayoría de las secuencias identificadas a partir de las muestras fecales tanto en individuos control como en pacientes obesos pertenecen principalmente a los filos *Firmicutes*, y *Bacteroidetes*, y en menor proporción al filo *Proteobacteria*. En varios trabajos se ha observado que los pacientes obesos presentan un incremento del filo *Firmicutes* y una reducción del filo *Bacteroidetes* con respecto a los individuos delgados[29-32]. Sin embargo, en nuestras muestras no se han encontrado diferencias significativas en la frecuencia relativa de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* entre pacientes obesos e individuos control, mientras que si se encontraron diferencias significativas asociadas al filo *Proteobacteria*. Los pacientes obesos presentan una frecuencia relativa mayor de este filo que los individuos control, permitiendo asociar este filo como un posible marcador asociado a la obesidad. Resultados similares con relación a este filo han sido obtenidos tanto en humanos como en ratones[33-35]. Esta discrepancia en los resultados a nivel de filo sugiere que el estudio de la composición de la microbiota intestinal podría estar asociado a varios factores como los criterios de selección de los pacientes, la dieta, la evolución de las técnicas moleculares, los diferentes métodos de extracción de ADN de las muestras, los métodos de amplificación y/o las tecnologías de secuenciación[36,37].

Estudios previos han mostrado cambios en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes obesos y no obesos y la existencia de determinados géneros o especies significativamente asociados con cada grupo[38,39]. En nuestro estudio, además de observar cambios a nivel de filo, también se han encontrado diferencias en la proporción de determinados géneros bacterianos dentro de la microbiota de pacientes obesos con respecto a los individuos control, además de una riqueza bacteriana observada mayor en los pacientes obesos. Géneros como *Blautia*, *Oscillospira*, *Flavobacterium*, *Alkaliphillus* y *Eubacterium* fueron detectados en menor proporción de manera significativa en los pacientes obesos con respecto a los individuos control. Mientras que, por el contrario, los géneros *Prevotella*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Meganomas* y *Acidaminococcus* aparecían significativamente incrementados en pacientes obesos. La elevación de la concentración de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* en pacientes obesos ya ha sido previamente descrita, lo que podría indicar un posible papel del género *Lactobacillus* sobre la ganancia de peso y la obesidad[40-42]. Otros géneros que también han mostrado resultados similares en distintos estudios y que podrían estar asociados a la patogénesis de la obesidad son *Prevotella* y *Megamonas*[39,43]. Estos resultados demostrarían que no hay única bacteria implicada en la patogénesis de la obesidad, sino la existencia de una disbiosis intestinal. Sin embargo, una de las principales cuestiones que se plantean es si los cambios en la microbiota intestinal preceden al desarrollo de obesidad o si por el contrario son una consecuencia de dicho fenotipo. En este estudio, las comunidades de bacterias de los individuos control se agrupan de forma separada de las comunidades de pacientes obesos, lo cual determina a la obesidad como un factor importante en la agrupación de las comunidades de bacterias, justificando así la relación entre la composición de la microbiota intestinal y la obesidad.

En conclusión, estos resultados muestran una disbiosis intestinal, fundamentalmente observada a nivel de género, implicada en el desarrollo de obesidad, justificando así la importancia de la modulación de la microbiota intestinal como posible alternativa terapéutica para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER (BFU2013-48141-R), de las Consejerías de Sanidad (LEU35U13) y de Educación de la Junta de Castilla y León y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (LE063U16) y de la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León (GRS 1428/A/16). CIBERehd está financiado por el Instituto de

*Salud Carlos III. Esther Nistal, Maite Arias-Loste y Begoña Álvarez recibieron la **Beca ACAD 2015** para la realización de dicho trabajo.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature 2006 Dec 14;444(7121):881-887.

2. Qi L, Cho YA. Gene-environment interaction and obesity. Nutr Rev 2008 Dec;66(12):684-694.

3. Yang TL, Guo Y, Li SM, Li SK, Tian Q, Liu YJ, et al. Ethnic differentiation of copy number variation on chromosome 16p12.3 for association with obesity phenotypes in European and Chinese populations. Int J Obes (Lond) 2013 Feb;37(2):188-190.

4. Bouchard C. Gene-environment interactions in the etiology of obesity: defining the fundamentals. Obesity (Silver Spring) 2008 Dec;16 Suppl 3:S5-S10.

5. Marti A, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. Proc Nutr Soc 2008 Feb;67(1):1-8.

6. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gerard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. FASEB J 2010 Dec;24(12):4948-4959.

7. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. Gut 2013 Dec;62(12):1787-1794.

8. Aron-Wisnewsky J, Gaborit B, Dutour A, Clement K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights. Clin Microbiol Infect 2013 Apr;19(4):338-348.

9. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 2006 Dec 21;444(7122):1022-1023.

10. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature 2012 Sep 13;489(7415):242-249.

11. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. Mol Aspects Med 2013 Feb;34(1):39-58.

12. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 2006 Dec 21;444(7122):1027-1031.

13. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature 2013 Aug 29;500(7464):541-546.

14. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. FEBS Lett 2014 Nov 17;588(22):4223-4233.

15. Finucane MM, Sharpton TJ, Laurent TJ, Pollard KS. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. PLoS One 2014 Jan 8;9(1):e84689.

16. Gerard P. Gut microbiota and obesity. Cell Mol Life Sci 2016 Jan;73(1):147-162.

17. Arora T, Singh S, Sharma RK. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. Nutrition 2013 Apr;29(4):591-596.

18. Moroti C, Souza Magri LF, de Rezende Costa M, Cavallini DC, Sivieri K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. Lipids Health Dis 2012 Feb 22;11:29-511X-11-29.

19. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. Gastroenterology 2012 Oct;143(4):913-6.e7.

20. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res 2013 Jan 7;41(1):e1.

21. Torsvik V, Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr Opin Microbiol 2002 Jun;5(3):240-245.

22. Inceoglu O, Al-Soud WA, Salles JF, Semenov AV, van Elsas JD. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. PLoS One 2011;6(8):e23321.

23. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002 Jan;122(1):44-54.

24. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 2010 Mar 4;464(7285):59-65.

25. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 2011 May 12;473(7346):174-180.

26. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. PLoS One 2011 Jan 27;6(1):e16393.

27. Sephani J, Radulovic K, Niess JH. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2011 Jun;59(3):161-177.

28. Sanz Y, Santacruz A, Gauffin P. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. Proc Nutr Soc 2010 Aug;69(3):434-441.

29. Abdallah Ismail N, Ragab SH, Abd Elbaky A, Shoeib AR, Alhosary Y, Fekry D. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. Arch Med Sci 2011 Jun;7(3):501-507.

30. Hartstra AV, Bouter KE, Backhed F, Nieuwdorp M. Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. Diabetes Care 2015 Jan;38(1):159-165.

31. Park JS, Seo JH, Youn HS. Gut microbiota and clinical disease: obesity and nonalcoholic Fatty liver disease. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr 2013 Mar;16(1):22-27.

32. Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. Gut Pathog 2013 Apr 30;5(1):10-4749-5-10.

33. Yasir M, Angelakis E, Bibi F, Azhar EI, Bachar D, Lagier JC, et al. Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. Nutr Diabetes 2015 Apr 27;5:e153.

34. Kong LC, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. Am J Clin Nutr 2013 Jul;98(1):16-24.

35. Porras D, Nistal E, Martinez-Florez S, Pisonero-Vaquero S, Olcoz JL, Jover R, et al. Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. Free Radic Biol Med 2016 Nov 25;102:188-202.

36. Scupham AJ, Jones JA, Wesley IV. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. J Appl Microbiol 2007 Feb;102(2):401-409.

37. Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ, et al. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. PLoS One 2013 Sep 11;8(9):e74787.

38. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. BMC Gastroenterol 2015 Aug 11;15:100-015-0330-2.

39. Chiu CM, Huang WC, Weng SL, Tseng HC, Liang C, Wang WC, et al. Systematic analysis of the association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics approaches. Biomed Res Int 2014;2014:906168.

40. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii. Int J Obes (Lond) 2012 Jun;36(6):817-825.

41. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients. PLoS One 2009 Sep 23;4(9):e7125.

42. Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. World J Gastrointest Pathophysiol 2015 Nov 15;6(4):110-119.

43. Hu HJ, Park SG, Jang HB, Choi MK, Park KH, Kang JH, et al. Obesity Alters the Microbial Community Profile in Korean Adolescents. PLoS One 2015 Jul 31;10(7):e0134333.