



“EVALUACIÓN DE UN SIMBIÓTICO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE NIÑOS CON OBESIDAD EN UN SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO (ARIS)”

LN. Melissa Rivera Escoto

Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica

Directora:

Dra. Marisela González Ávila

Co Dirección:

Dra. Montserrat Álvarez Zavala

Asesores:

Dr. Eduardo Orozco Chávez (ISSSTE).
Dr. Jorge Bravo Madrigal (CIATEJ).
Dra. Ana Laura Márquez Aguirre (CIATEJ).

Zapopan, Jal.

Diciembre 2019

INDÍCE

AGRADECIMIENTOS	8
FINANCIAMIENTO	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES	13
<i>MICROBIOTA INTESTINAL</i>	14
<i>PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS</i>	15
<i>MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD INFANTIL</i>	16
<i>ACIDOS GRASOS DE CADENA (AGCC) Y OBESIDAD INFANTIL.</i>	17
<i>SIMULADORES DE DIGESTIÓN EX VIVO</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
JUSTIFICACIÓN	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
METODOLOGÍA	23
<i>TIPO DE ESTUDIO</i>	23
<i>CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS</i>	23
Criterios de inclusión.	23
Criterios de exclusión.	23
<i>GRUPOS DE ESTUDIO</i>	23
<i>TAMAÑO DE MUESTRA</i>	24
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	24
<i>ASPECTOS ÉTICOS</i>	25
<i>CONTACTO DE LA POBLACIÓN (SOLICITUD DE MUESTRAS)</i>	25
<i>EVALUACIÓN NUTRICIONAL</i>	25
<i>EVALUACIÓN EN EL SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO "ARIS".</i>	26

<i>CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL</i>	28
<i>CUANTIFICACIÓN DE AGCC (Ácidos grasos de cadena corta)</i>	31
ANEXOS	55
1. <i>Consentimiento Informado</i>	55
2. <i>Historia Clínica</i>	58
3. <i>Frecuencia de Alimentos.</i>	59
4. <i>Protocolo recolección muestra de heces.</i>	63
5. <i>Características de las dietas.</i>	64
6. <i>Curvas de estandarización qPCR's.</i>	65
7. <i>Carta aprobación comité de ética.</i>	68
BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Densidad microbiana en el cuerpo humano. (Vyas & Ranganathan, 2012).	14
Figura 2. Efectos y mecanismos de acción de los simbióticos. (Markowiak & Slizewska, 2017)	16
Figura 3. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de niños mexicanos con peso normal, sobrepeso y obesidad. (García-Mena, 2015).	18
Figura 4. Esquema gráfico ARIS.	19
Figura 5. Medidas antropométricas (Circunferencia de cintura, cadera, circunferencia media de brazo e IMC de niños obesos y con peso normal).	33
Figura 6. Diferencias significativas en la circunferencia de cadera(a), cintura(b), IMC (c) y porcentaje de masa grasa (d) entre ambas poblaciones. ($p < 0.001$).	34
Figura 7. Distribución de consumo de macronutrientes de ambas poblaciones.	35
Figura 8. Consumo de colesterol (mg/día) de las poblaciones en estudio. NP: Peso normal. OB: Obesos.	35
Figura 9. Correlación del IMC (Kg/m ²) con el % de masa grasa y la circunferencia de cintura (cm).	36
Figura 10. UFC/g de heces de niños con peso normal (NP) y con obesidad (OB) de <i>Lactobacillus</i> spp y <i>Bifidobacterium</i> spp.	37
Figura 11. Copias gen 16s/g de heces (a) de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).	39

Figura 12. Copias genes phylums Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias y Proteobacterias/g de heces (a) de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).	41
Figura 13. Porcentaje de phyla en heces de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).	42
Figura 14. Cuantificación de AGCC (mM/g de heces) en ambas poblaciones (Peso Normal, NP., Obesos, OB).	43
Figura 15. Porcentaje de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).	44
Figura 16. UFC/ml en colon ascendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador del tracto digestivo ARIS. (NP: Simulador adaptado a condiciones de niños normopeso, OB: Simulador adaptado a condiciones de niños con obesidad).	45
Figura 17. UFC/ml en colon transverso durante la evaluación del simbiótico en el simulador del tracto digestivo ARIS. a.: NP: Simulador adaptado a condiciones normopeso, b.: OB: Simulador adaptado a condiciones de obesos.	47
Figura 18. UFC/mL en colon descendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador del tracto digestivo ARIS. (NP: Simulador adaptado a condiciones Normopeso., OB: Simulador adaptado a condiciones de obesos).	48
Figura 19. Comparación de los porcentajes de AGCC en heces de niños con obesidad con la cantidad de AGCC producidos durante la evaluación del simbiótico en ARIS con microbiota intestinal de niños con obesidad.	50
Figura 20. Comparación de la proporción de AGCC en heces de niños con obesidad con la cantidad de AGCC producidos durante la	

evaluación del simbiótico en ARIS con microbiota intestinal de niños con obesidad.

52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones establecidas en ARIS para la evaluación.	27
Tabla 2. Diseño de experimento (evaluaciones en ARIS).	28
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos para qPCR.	29
Tabla 4. Condiciones qPCR.	30
Tabla 5. Cepas de referencia para la cuantificación por qPCR de cada gen.	30
Tabla 6. Datos sociodemográficos y antropométricos de las poblaciones en estudio.	32
Tabla 7. Análisis dietético de niños normopeso y con obesidad.	34
Tabla 8. Correlación de los componentes de la dieta con UFC's/g de heces de <i>Bifidobacterium</i> spp y <i>Lactobacillus</i> spp.	38
Tabla 9. Cuantificación de ADN de las muestras de heces de niños normopeso (NP) y obesos (OB).	38
Tabla 10. Diferencias significativas en UFC/mL (<i>Lactobacillus</i> spp y <i>Bifidobacterium</i> spp) en el colon ascendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.	46
Tabla 11. Diferencias significativas en UFC/mL (<i>Lactobacillus</i> spp y <i>Bifidobacterium</i> spp) en el colon transversal durante la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.	47
Tabla 12. Diferencias significativas en UFC/mL (<i>Lactobacillus</i> spp y <i>Bifidobacterium</i> spp) en el colon descendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.	49

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, con Él todo es posible.

Gracias mamá, fuiste y eres mi mano derecha.

Gracias Mateo, tu admiración fortalece mi compromiso. Te amo.

Gracias familia.

Gracias Dra. Marisela González, Dra. Monserrat Álvarez por compartir su conocimiento, gracias Dr. Jorge Bravo y Dra. Ana Laura Márquez por sus aportaciones y observaciones para concluir este proyecto.

Gracias Dr. Orozco por la confianza, por creer en mi y fomentar el crecimiento profesional y personal en mi.

Gracias a mis amigos, Armando y Rudy por creer en mi, por la disposición al crecimiento y aprendizaje continuo en equipo, gracias por el apoyo moral y emocional.

Gracias Mayra y Maira, sin duda hemos crecido juntas durante el desarrollo de este proyecto.

Gracias, Melissa.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de este proyecto de investigación fue desarrollado con el financiamiento de CONACYT con beca de manutención No. 488500 y No. de becario 634533.

El simbiótico evaluado fue proporcionado por la empresa Mieles Campos Azules S.A. de C.V. con el proyecto PEI No. 250727.

ABREVIATURAS

Ác.: ácido.

AGCC: Ácidos Grasos de Cadena Corta.

ARIS: Automatic and Robotic Intestinal System.

CMB: Circunferencia Media de Brazo.

DE: Desviación estándar.

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

ENSANUT: Encuesta de Salud y Nutrición.

GALT: Sistema Linfoide Ligado al Intestino.

IMC: Índice de Masa Corporal.

Kcal: Kilocalorias.

Kg: Kilogramos.

mg: miligramos.

mL: mililitros.

NP: normopeso.

OB: obesos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PENP: Población Escolar Peso Normal.

PEOB: Población Escolar con Obesidad.

SHIME: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem.

SP: sobrepeso.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La obesidad infantil y sus consecuencias son un problema de salud a nivel mundial. Hoy sabemos que además de factores genéticos y ambientales, el desbalance (disbiosis) en la microbiota intestinal (MI) también está implicado en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad.

El uso de probióticos, prebióticos y simbióticos son estrategias que se han comenzado a estudiar como moduladores de la MI en personas con obesidad, sin embargo, por cuestiones de costos, tiempo e incluso éticas los estudios clínicos son limitados. El desarrollo de sistemas que reproducen los procesos de digestión y fermentación de la MI son métodos de utilidad que se han implementado para evaluar este tipo de productos. En este estudio se evaluó el efecto de un simbiótico que contenía fructanos de agave y lactobacilos sobre la microbiota intestinal de niños con obesidad en un simulador de tracto digestivo “ARIS” como probable modulador de la MI para ser coadyuvante en el tratamiento de la obesidad infantil.

METODOLOGÍA: Se evaluaron nutricionalmente de acuerdo a los criterios de la OMS 35 niños de entre 5 y 12 años de edad y se aplicaron encuestas dietéticas. Se recolectaron muestras de heces de los niños diagnosticados con peso normal (NP) y con obesidad (OB). Se evaluó un simbiótico que contenía fructanos de agave y lactobacilos en el simulador de tracto digestivo “ARIS” adaptado a las condiciones de niños NP y OB. Se tomaron muestras durante la evaluación en el día cero, con una administración y con administración continua del simbiótico. Se utilizaron medios de cultivo selectivos para la cuantificación de *Lactobacillus spp* (MRS Agar de BD Difco™) y *Bifidobacterium spp* (BSM Agar de Sigma Aldrich), y se cuantificó la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por HPLC. **RESULTADOS:** 12 niños NP, 12 niños OB y 11 niños con sobrepeso (SP). El peso, la circunferencia de cintura, cadera y circunferencia media de brazo (CMB) fueron mayores en los niños con OB. Existe una correlación positiva del IMC con el % de grasa y la circunferencia de cintura. La suplementación con un simbiótico no modula la MI, ni la producción de AGCC de niños con obesidad. **CONCLUSIÓN:** El simbiótico evaluado NO modula la microbiota intestinal de niños con obesidad ni la producción de AGCC en un simulador de tracto digestivo “ARIS”.

INTRODUCCIÓN

La obesidad infantil es un problema de salud a nivel mundial cuya prevalencia va en aumento, en el 2016 aproximadamente 41 millones de niños de entre 6 y 11 años tenían sobrepeso u obesidad. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016 reportó que 3 de cada 10 niños ya tenían sobrepeso u obesidad, el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas como diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares aumenta cuando esta condición esta presente.

Además de factores genéticos y ambientales, la composición de la microbiota intestinal (MI) está involucrada en el desarrollo de la obesidad.

Se denomina microbiota intestinal al conjunto de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal. Esta se considera un órgano metabólicamente activo que influye de manera directa en el bienestar del hospedero en procesos digestivos y metabólicos.

Se ha reportado que la población con obesidad presenta una alteración en la composición de la microbiota que se caracteriza por una mayor cantidad de Firmicutes y Bacteroidetes, mismos que se ven relacionados con el tipo de dieta.

El uso de probióticos, prebióticos y simbióticos son estrategias que se han comenzado a estudiar como moduladores de la MI en personas con obesidad, sin embargo, por cuestiones de costos, tiempo e incluso éticas este tipo de estudios son limitados. El desarrollo de sistemas *ex vivo* que reproducen los procesos de digestión e incluso los procesos de fermentación de la microbiota intestinal son métodos de utilidad para evaluar estos productos.

En este estudio se evaluó el efecto de un simbiótico sobre la microbiota intestinal de niños con obesidad en el simulador de tracto digestivo “ARIS” como probable modulador de la MI como coadyuvante en el tratamiento de la obesidad infantil.

MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

La prevalencia de obesidad infantil a nivel mundial va en aumento, en el 2014 casi 41 millones de niños tenía sobrepeso y obesidad en todo el mundo. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016, reportó que en la población infantil de entre 5 y 11 años, 17.9 % tenían sobrepeso y 18.6 % obesidad. (Sanz Y & Santacruz J, 2009; Baothman, Zamzami, Taher, Abubaker, & Abu-Farha, 2016; Secretaria de Salud, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica como sobrepeso y obesidad a los niños en edad escolar (5 a 12 años) de acuerdo a las tablas de Índice de Masa Corporal (IMC) para la edad de la siguiente manera: (OMS, 2016).

- Sobrepeso: +1 DE (1 Desviación estándar sobre la media).
- Obesidad: + 3 DE (3 Desviaciones estándar sobre la media).

El sobrepeso y obesidad aumentan el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (Diabetes Mellitus tipo 2, hipertensión arterial, cáncer y síndrome metabólico), mortalidad prematura y reduce la calidad de vida. (Dávila-Torres, González-Izquierdo , & Barrera-Cruz, 2015) (Secretaria de Salud, 2016).

Diversos factores genéticos, ambientales y el estilo de vida están implicados en el desarrollo de este trastorno metabólico, lo que conduce a la acumulación excesiva de grasa. Respecto a la etiología de la obesidad infantil, el periodo prenatal en cuanto a la alimentación de la madre y la duración del periodo de lactancia también son factores involucrados en el riesgo para desarrollar sobrepeso u obesidad en etapas postnatales. (Magrone & Jirillo, 2015)

MICROBIOTA INTESTINAL

El conjunto de microorganismos que habita el tracto gastrointestinal (más de 100 trillones de bacterias) se define como microbiota intestinal. La mayor densidad reside en el intestino grueso (10^{11} - 10^{12} bacterias/gramo) (Figura 1). Se considera un órgano con actividad metabólica que influye de manera directa en el bienestar del hospedero en procesos digestivos, síntesis de proteínas, mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y modulación de la inflamación a través del sistema inmune. (Sanz, Collado, Haros, & Dalmau, 2004).

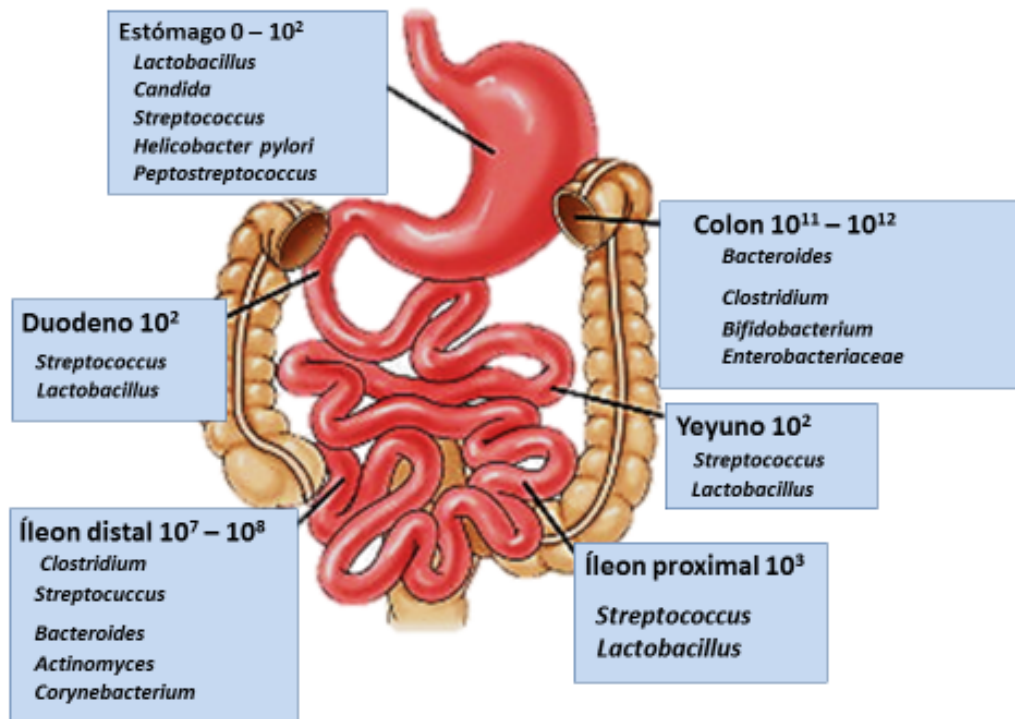


Figura 1. Densidad microbiana en el tracto digestivo. (Koboziev, Reinoso Webb, Furr L., & Grisham, 2014)

Este nicho ecológico está compuesto en su mayoría por bacterias; 90 % de esas bacterias son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias y Proteobacterias. La composición de la microbiota intestinal depende de varios factores como la dieta, estado fisiológico, uso de antibióticos y genética. (Baothman, Zamzami, Taher, Abubaker, & Abu-Farha, 2016; Tremaroli & Bäckhed, 2012). Los géneros

Lactobacillus y *Bifidobacterium*, que pertenecen a los filos Firmicutes y Actinobacterias, están relacionados con distintos beneficios a la salud.

La disbiosis, que es el desbalance en la microbiota intestinal se ha relacionado actualmente con distintas enfermedades como EII (Enfermedad inflamatoria intestinal), cáncer de colon, síndrome metabólico, esteatosis hepática no alcohólica y obesidad. (Sanz, Collado, Haros, & Dalmau, 2004; Moschen, Wieser, & Tilg, 2012).

Los nutrientes que no son digeridos en la parte superior del tracto gastrointestinal son el principal alimento de las bacterias de la microbiota intestinal, los polisacáridos y oligosacáridos son el principal sustrato que utilizan para generar energía metabólica. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el ácido propiónico, butírico y acético son los principales productos de fermentación, poseen funciones fisiológicas como sustrato energético, inmunomoduladores, vasodilatadores y promotores de la motilidad y cicatrización intestinal. (Tremaroli & Bäckhed, 2012; Moschen, Wieser, & Tilg, 2012).

PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS

Se define como probióticos al conjunto de microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas aportan un beneficio a la salud del hospedero. Cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más utilizadas en alimentos funcionales y en suplementos alimenticios como probióticos. Algunos de los mecanismos que se relacionan con los beneficios de los probióticos son el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, mayor adherencia a la mucosa y epitelio, competitividad contra microorganismos patógenos, modulación de la microbiota intestinal y la regulación del sistema linfático ligado al intestino (GALT). Los prebióticos son sustratos que son utilizados de forma selectiva por microorganismos del hospedero y que aportan un beneficio a la salud. La combinación sinérgica de probióticos y prebióticos se describe como simbiótico. (Sanders, 2008) (Saéz-Lara, Robles-Sanchez, Ruíz-Ojeda, Plaza-Díaz, & Gil, 2016). (Gibson, 2017). La inmunomodulación es una de las funciones con las que se relaciona el uso de

probióticos y simbióticos, considerando que la obesidad se caracteriza por un estado de inflamación crónica subclínica y la relación que existe con la microbiota, el uso de prebióticos, probióticos y simbióticos se han comenzado a investigar como estrategias para la prevención y/o tratamiento de la obesidad. (Barengolts, 2016). En la Figura 2 se muestran los efectos y mecanismos de acción de los simbióticos.

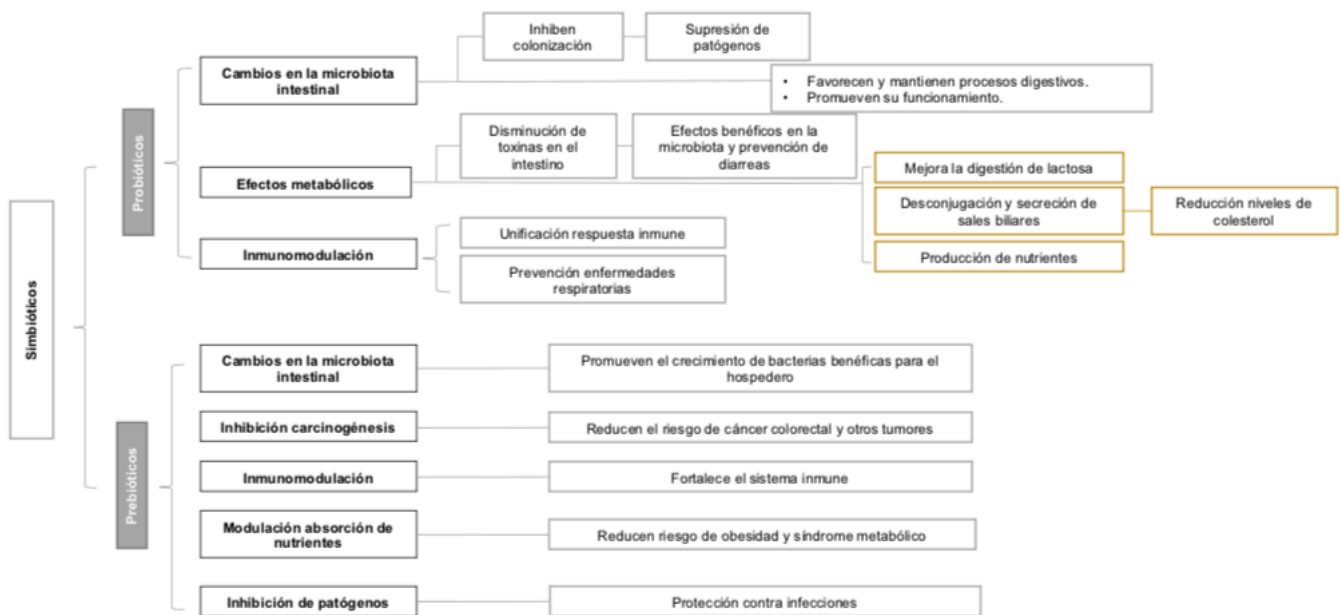


Figura 2. Efectos y mecanismos de acción de los simbióticos. (Markowiak & Slizewska, 2017)

MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD INFANTIL

La microbiota intestinal actualmente se considera un factor implicado en la etiología de la obesidad debido a su influencia en las funciones metabólicas e inmunológicas del hospedero. (Sanz Y & Santacruz J, 2009).

La población con obesidad infantil como adulta presentan una alteración en la composición de su microbiota intestinal (disbiosis) que se caracteriza por una mayor cantidad de Firmicutes y una menor cantidad de Bacteroidetes, mismos que se han relacionado con el tipo de dieta de algunas poblaciones. (Tremaroli & Bäckhed, 2012; Estrada Velasco , y otros, 2015; Sanders, 2008).

En 2012 Karlsson y colaboradores reportaron que existe mayor abundancia de *Enterobacterias* y menor cantidad de *Desulfovibrio* y *Akkermanasia muciniphila* en heces de niños obesos en comparación con heces de niños de peso normal. (Karlsson, y otros, 2012).

ACIDOS GRASOS DE CADENA (AGCC) Y OBESIDAD INFANTIL.

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, acetato y propionato son el principal producto de la fermentación bacteriana de los carbohidratos que no fueron digeridos por las enzimas de la parte alta del tubo digestivo. Estos AGCC pueden ser absorbidos y metabolizados por el hospedero teniendo impacto en distintas funciones fisiológicas como: transporte, metabolismo, crecimiento y diferenciación celular, metabolismo de lípidos e hidratos de carbono a nivel hepático, así como también son sustrato energético muscular, renal, cardíaco y cerebral, el 60-70 % del requerimiento energético de los colonocitos proviene de los AGCC e intervienen en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal (MacFarlane & MacFarlane, 2012).

Se ha reportado que los AGCC pueden ser utilizados para la síntesis de *novo* de lípidos y glucosa, por lo tanto, al ser producto de la fermentación bacteriana, si existe disbiosis en el hospedero, se verá reflejado en la producción, metabolismo y acumulación de grasa en el mismo. (Murugesan, y otros, 2017) (Emanuel E. Canfora, 2015).

En el 2010, un estudio reportó concentraciones elevadas de AGCC en heces, así como una mayor concentración de *Firmicutes* en adultos obesos comparados con adultos de peso normal. (Andreas Schwartz, 2010).

A pesar de existir pocos estudios de este tipo, Mena y colaboradores en 2015 realizaron un estudio con niños mexicanos obesos, con sobrepeso y de peso normal donde obtuvieron como resultados que los niños obesos y con sobrepeso tienen hipertrigliceridemia y concentraciones alteradas de acetato, propionato y butirato (Figura 3) en heces comparados con el grupo de peso normal, no obstante no se encontró una disbiosis clara entre los tres grupos. (García-Mena, 2015).

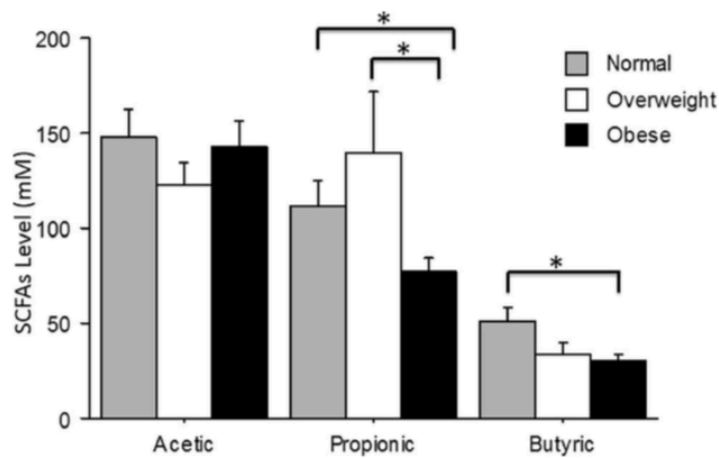


Figura 3. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de niños mexicanos con peso normal, sobrepeso y obesidad. (García-Mena, 2015).

SIMULADORES DE DIGESTIÓN *EX VIVO*

El estándar de oro para evaluar el efecto probiótico, prebiótico y simbiótico son los estudios de intervención nutricional en humanos, sin embargo, los altos costos, la cantidad de tiempo, las consideraciones éticas y la dificultad para las obtenciones de muestras gastrointestinales, han convertido los modelos *in vitro* en una alternativa para este tipo de estudio. (Barroso, Cueva, Peláez, Martínez-Cuesta, & Requena, 2014; Skalkam, Wiese, Nielsen, & Van Zanten, 2016)

En años recientes se han desarrollado modelos dinámicos que simulan condiciones del tracto gastrointestinal con el objetivo de facilitar el estudio del impacto de componentes de la dieta. Desde modelos basados en fermentadores independientes con condiciones controladas a modelos dinámicos que solo se enfocan en el tracto digestivo alto (estómago y duodeno) como el DGM (Modelo Gástrico Dinámico), o como el TIM-1 adaptado a estómago e intestino delgado (Martínez *et al.*, 2012).

El Simulador del ecosistema intestinal humano, SHIME, por sus siglas en inglés, mimetiza las condiciones del estómago, duodeno, yeyuno e íleon y tres secciones del colon.

El ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System, Figura 4) es un sistema que simula cinco secciones del tubo digestivo: estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transverso y colon descendente. Se considera un modelo *ex vivo* porque en las tres secciones del colon reside microbiota intestinal humana que es obtenida de la población a estudiar. Las condiciones del ARIS que se adaptan y mimetizan la fisiología de la población son: pH, tiempo de retención en cada sección, condiciones enzimáticas, peristalsis intestinal y temperatura. (Hernández-Moedano, Moreno-Ramos, Herrera-Rodríguez, & González-Ávila, 2014).

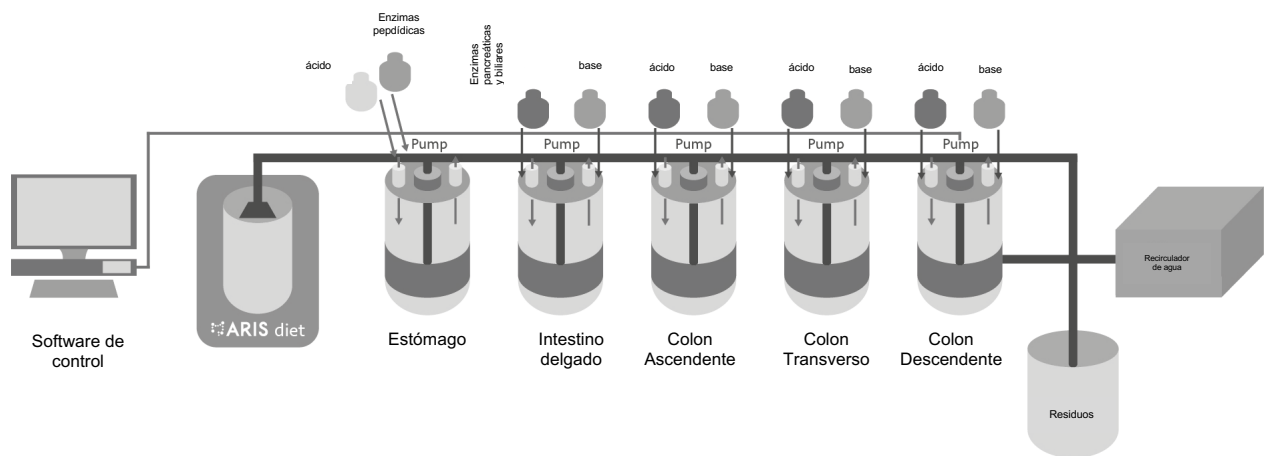


Figura 4. Esquema gráfico ARIS.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es un problema de salud que afecta a la población mundial. En el 2016 más de 1.9 billones de adultos tenían sobrepeso u obesidad. La población infantil y adolescente está siendo afectada por esta condición con rapidez, y en los últimos 30 años la incidencia se ha cuadruplicado en esta población. En México, el 18 % de los niños entre 5 y 11 años tienen obesidad.

Las estrategias y tratamientos que se utilizan actualmente para prevenir y tratar la obesidad parecen no tener un impacto a largo plazo, las cifras han ido y siguen en aumento.

Al ser una enfermedad de etiología multifactorial (factores ambientales, genéticos, psicológicos, composición de la microbiota intestinal, niveles de estrés) la elección de un tratamiento preventivo o correctivo efectivo es crucial para el beneficio del paciente dadas las consecuencias negativas que la obesidad tiene sobre la salud.

La microbiota intestinal es un factor involucrado en el metabolismo humano, sin embargo, no se considera a la hora de diseñar un tratamiento para control de peso. Los probióticos, prebióticos y simbióticos se han comenzado a estudiar como moduladores de la microbiota intestinal en personas con obesidad, a pesar de ello, los estudios en humanos se ven limitados por problemas de ética y los altos costos. El desarrollo de sistemas *in vivo* y simuladores *ex vivo* que reproducen los procesos de digestión humana e incluso los procesos de fermentación de la microbiota intestinal son métodos de utilidad para evaluar estos productos sin poner en riesgo la salud de una persona.

Por motivos como los antes mencionados se propone evaluar el efecto de un simbiótico sobre la microbiota intestinal de población infantil con obesidad en un simulador de tracto digestivo.

JUSTIFICACIÓN

La población infantil con sobrepeso tiene mayor riesgo de desarrollar obesidad en la edad adulta y en muchos casos ya presentan al menos un factor de riesgo adicional cardiovascular como hipercolesterolemia y cifras elevadas de tensión arterial relacionadas con casos de diabetes mellitus tipo 2 en población infantil.

Siendo un problema de salud pública que sigue aumentando es importante desarrollar estrategias efectivas que ayuden a la prevención o tratamiento de esta enfermedad.

La suplementación con un simbiótico que contiene fructanos de agave y lactobacilos como modulador de la microbiota intestinal se propone como coadyuvante en la prevención de la obesidad dada la relación que existe entre la microbiota intestinal y el metabolismo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La suplementación con un simbiótico que contiene fructanos de agave y lactobacilos modifica la microbiota intestinal de escolares obesos en un simulador de tracto digestivo?

HIPÓTESIS

La suplementación con un simbiótico que contiene fructanos de agave y lactobacilos modifica la microbiota intestinal de escolares obesos en un simulador de tracto digestivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un simbiótico que contiene fructanos de agave y lactobacilos sobre la microbiota intestinal de escolares obesos en un simulador de tracto digestivo "ARIS".

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir y comparar el estado nutricional de escolares con obesidad y peso normal.
2. Caracterizar microbiota intestinal de escolares con obesidad y peso normal utilizando cuatro filos bacterianos.
3. Cuantificar los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de niños con obesidad y peso normal.
4. Analizar la microbiota intestinal de escolares con obesidad y peso normal usando cuatro filos bacterianos en distintos tiempos de administración de un simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.
5. Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato, propionato y acetato en distintos tiempos de administración de un simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Criterios de inclusión.

- Niños y niñas de 5 a 12 años.
- IMC: Obesidad +3 DE (Desviación estándar) y Peso normal de -2 a +1 DE en base al puntaje z de IMC para la edad con las referencias de la OMS.
- Niñas que no han menstruado.
- Sin diagnóstico de enfermedad inflamatorias intestinal.
- Sin diagnóstico de enfermedad metabólica.
- Sin consumo de antibiótico 1 mes previo a la toma de muestra.
- Sin consumo de probióticos y prebióticos 1 mes previo a la toma de muestra.
- Firma del padre o tutor de la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión.

- Niños y niñas que no cumplan los criterios de IMC para obesidad y peso normal según la OMS.
- Diagnóstico de enfermedad inflamatoria intestinal.
- Diagnóstico de enfermedad metabólica.
- Uso de antibióticos 1 mes previo a la toma de muestra.
- Que no acepte participar.

GRUPOS DE ESTUDIO

- Población de 5 a 12 años con peso normal.
- Población de 5 a 12 años con obesidad.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra basado en la fórmula para probar hipótesis en estudios que comparan dos medias de grupos independientes (Chow, Wang, & Shao, 2007), y se utilizaron los datos de la unidades de abundancia relativa del *phylum* Firmicutes (UAR) de pacientes pediátricos obesos y controles pediátricos con peso normal. (Estrada-Velasco et al, 2015).

$$n = 2 \left(\sigma \frac{z_{1-\alpha/(2\tau)} + z_{1-\beta}}{\mu_A - \mu_B} \right)^2$$

Donde:

$Z_{1-\alpha} = 1.96$, considerando un nivel de significancia de 0.05

$Z_{1-\beta} = 0.842$, con una potencia del 80 %.

$\mu_A = 1.01$, UAR Firmicutes controles pediátricos (peso normal).

$\mu_B = 1.64$, UAR Firmicutes pacientes pediátricos obesos.

Se estimó un tamaño de muestra de 12 individuos por grupo: controles con peso normal y pacientes obesos (n total= 24).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis descriptivo se realizó con el software GraphPad Prism versión 7.0 para Mac OSX. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad de los datos. Para la comparación entre los datos paramétricos se utilizó la prueba *t de student* y en el caso de los datos no paramétricos se aplicó la prueba de *Mann Whitney*. Los datos se presentaron como media y desviación estándar (media \pm DE). Se aplicó el análisis *r Spearman* para calcular correlaciones entre el IMC con circunferencia de cintura y porcentaje de masa grasa. Los datos de cuantificación de UFC's fueron expresados como media de \log^{10}/g de heces con rangos intercuartiles (IQR). Se consideraron como significativos los datos con una $P < 0.05$, con un intervalo de confianza de 95 %.

Para el análisis de datos de la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS se realizó una ANOVA multifactorial con un intervalo de confianza

de 95 % y un α de 0.0 y se consideraron significativos los resultados con valores de $p < 0.05$, para el procesamiento de datos se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.17.

ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki. El protocolo fue revisado y autorizado por el comité de ética de Investigación del Hospital Valentín Gómez Farías (ISSSTE) con registro No.ISSSTE/CEI/387/2019 (Anexo 7). Para la donación de la muestra de heces se entregó una carta de consentimiento informado (Anexo 1) posterior a una explicación que se dio a los padres o tutores de los participantes, ésta debió ser firmada para dar curso a la investigación.

CONTACTO DE LA POBLACIÓN (SOLICITUD DE MUESTRAS)

Se contactó a los participantes para una consulta de evaluación nutricional, se realizó una serie de preguntas para contestar una historia clínica (Anexo 2) y se tomaron las medidas antropométricas para la evaluación nutricional.

EVALUACIÓN NUTRICIONAL

Las medidas antropométricas fueron realizadas por personal estandarizado (Certificado ISAK 2 no. 3710) fueron: peso (kg), talla (cm) (medida con cinta métrica Lufkin), circunferencia de cintura (cm) (parte media entre la parte más alta de la cresta iliaca y la última costilla), circunferencia de cadera (cm) (parte más prominente de los glúteos), CMB (cm) (circunferencia media de brazo) (parte media del brazo entre el hueso acromial y el codo), panículo adiposo de biceps y triceps (mm) e índice de masa corporal (IMC)(Kg/m²). El porcentaje de masa grasa (%) y la masa muscular (kg) se calcularon con las fórmulas de *Slaughter et al.* (Slaughter MH, 1988) y *Poortmans et al.* (Poortmans J, 2005) respectivamente. La clasificación de los niños en peso normal y obesidad se realizó utilizando el puntaje Z de IMC para edad y sexo de acuerdo con las referencias de la OMS (Peso normal: -2 a 1 DE y Obesidad: > 2 DE).

(Anexo 2).

Para la evaluación dietética se realizó una encuesta de frecuencia de consumo de alimentos (Anexo 3) y se utilizó el software Nutricloud para el cálculo de kcalorías totales y consumo de macronutrientes (Lípidos, proteínas y carbohidratos) (Gabriela Macedo-Ojeda, 2013). De los datos obtenidos del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos se obtuvieron los siguientes datos: consumo medio de energía total (Kilocalorías/día), g de hidratos de carbono, g de proteína, g de lípidos, g de fibra, g de grasa saturada, g de grasa monoinsaturada, g de grasa poliinsaturada y mg de colesterol de cada participante.

RECOLECCIÓN Y MANTENIMIENTO PROCESAMIENTO DE LA MUESTRAS DE HECES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE UFC'S DE LACTOBACILLUS SPP Y BIFIDOBACTERIUM SPP.

Se solicitó a los padres de familia las muestras de heces (aproximadamente 5 g) de los niños de peso normal y obesos, estas fueron recolectadas en recipientes estériles con una solución buffer y se conservaron en frío (4 °C) por menos de 8 h. Fueron transportadas al laboratorio en hielera donde fueron alicuotadas y conservadas a -80 °C para su posterior procesamiento. Las muestras para cuantificación de UFC de *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp* se trabajaron inmediatamente al llegar al laboratorio.

Las muestras se homogenizaron con vórtex, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm/10 min/4 °C y se cultivaron mediante la técnica de sembrado en placa utilizando diluciones en serie del sobrenadante con medios selectivos y condiciones para *Lactobacillus spp* (Lactobacilli MRS Agar DIFCO™, condiciones aerobias, 24Hrs./37 °C) y *Bifidobacterium spp* (BSM Agar Sigma Aldrich, condiciones anaerobias con GasPak durante 48 h/37° C).

EVALUACIÓN EN EL SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO “ARIS”.

El simulador de tracto digestivo ARIS consta de 5 reactores, cada uno representa una sección del tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado, colon

ascendente, colon transverso y colon descendente). El ARIS se adaptó a las condiciones gastrointestinales fisiológicas de población escolar reportadas por Yu, Guo y colaboradores en el 2014, en la Tabla 1 están descritos los parámetros utilizados para valorar la funcionalidad del simbiótico. El estómago fue alimentado cada 24 horas con 50 ml de una dieta estándar diseñada de acuerdo con las características nutricionales de la dieta de las poblaciones en estudio (Anexo 5) y se adiciono el simbiótico (Anexo 6). Se ajustó el pH (2-2.5) con ácido clorhídrico (HCl) y se adicionaron enzimas peptídicas (0.33 g de Pepsina (HYCEL 1:10 000 no. Cat 155-25)).

Tabla 1. Condiciones establecidas en ARIS para la evaluación.

Reactor	Segmento del tracto digestivo	Volumen (L)	Tiempo de retención (h)	pH
1	Estómago	0.8	2	2.-2.5
2	Intestino delgado	1	4	6.4-7.4
3	Colon ascendente	1	18	5.5-6
4	Colon transverso	2	36	5.5-6
5	Colon descendente	1.5	22	6-6.5

Una vez que el alimento pasó el tiempo correspondiente en el estómago se hizo el trasvase a intestino delgado, se ajustó el pH (6.4-7.4) con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y se adicionaron enzimas pancreáticas (50 mL (0.19 mg de pancreatina Creon® de 25 000 UI y 0.001 mg de Lipasa (Lipase from porcine páncreas Sigma -Aldrich no.Cat L3126)) y sales biliares (1 g de Ovgall Difco™ no. Cat 212820). Una vez concluido el tiempo correspondiente se trasvasó a colon ascendente el contenido del intestino delgado donde el quimo estuvo en contacto con la microbiota intestinal, el proceso continuó respetando el tiempo de retención de cada sección hasta terminar la evaluación durante 12 días.

Previo a comenzar la evaluación los reactores correspondientes al colon fueron esterilizados con una solución estabilizadora preparada a partir de la reportada por Molly et al. en 1993, y se inocularon con el pool de microbiota intestinal proveniente de las heces de la población en estudio. Se mantuvieron en anaerobiosis y se enriquecieron con un complejo multivitamínico (Viterra Plus PfizerTM) (1 ml/L) hasta iniciar con la alimentación.

Se utilizó como control la microbiota intestinal de población infantil de peso normal de acuerdo con los criterios de la OMS.

Se realizaron 4 evaluaciones en el simulador, en la Tabla 2 se describe el diseño de experimento.

Tabla 2. Diseño de experimento (evaluaciones en ARIS).

Adaptación del ARIS	Alimentación
Población escolar peso normal (PEPN).	Dieta estándar PEPN
	Dieta estándar PEPN + simbiótico
Población escolar con obesidad (PEOB)	Dieta estándar PEOB
	Dieta estándar PEOB + simbiótico

Se obtuvieron muestras de cada sección en cada evaluación en los días cero, día tres (correspondiente a una administración y una digestión completa del simbiótico) y día nueve (correspondiente a la administración continua del simbiótico) para posteriormente analizar la biodiversidad bacteriana y cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Las muestras tomadas durante las evaluaciones fueron refrigeradas a 4 °C hasta ser utilizadas para los análisis correspondientes. Las muestras se homogenizaron con vórtex, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm/10 min/4 °C y se cultivaron mediante la técnica de sembrado en placa utilizando diluciones en serie con medios selectivos y condiciones para *Lactobacillus* spp (Lactobacilli MRS Agar DIFCOTM,

condiciones aerobias, 24 h/37 °C) y *Bifidobacterium* spp (BSM Agar *Sigma Aldrich*, condiciones anaerobias con GasPak durante 48 h/37 °C).

La extracción de ADN se llevó cabo con el kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit for human (Qiagen, Alemania). La pureza y concentración del ADN se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo-Scientific. La identificación y cuantificación de los filos bacterianos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacterias y Proteobacterias se realizó por qPCR utilizando primers específicos para el gen 16S rRNA utilizado como referencia. (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos para qPCR.

Grupo	Primers	Referencia
<i>Universal</i> <i>(16S rRNA)</i>	Forward 5' - 3': AGTTTGATCCTGGCTCAG Reverse 3' - 5': GWATTACCGCGGCKGCTG	<i>González, et al</i> <i>2012.</i>
<i>Actinobacterias</i>	F: TACGGOCGCAAGGCTA R: TCRTCCCCACCTTCCTCCG	<i>Liang, et al 2016.</i>
<i>Proteobacterias</i>	F: TCGTCAGCTCGTGTYGTGA R: CGTAAGGGCCATGATG	(Tristano Bacchetti De Gregoris, 2011).
<i>Bacteroidetes</i>	F: GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT R: AGCTGACGACCATGCAG	(Wang, 2008).
<i>Firmicutes</i>	F: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA R: AGCTGACGACAACCATGAC	(Wang, 2008)

Las condiciones programadas en el termociclador (CFX96 de BIO-RAD®) para cada gen de interés se muestran en la Tabla 4. El volumen final de reacción de cada PCR fue de 10 µL, de los cuales 5 µL eran de la enzima (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de *BIO-RAD*), 2 µL de ADN (20 ng/µL), 1 µL del mix forward and reverse (0.25 ng/µL respectivamente) de los primers (Tabla 3) y 2 µL de agua libre de DNAsas.

Tabla 4. Condiciones qPCR.

Gen de interés	Temperatura Hot Start	Temperatura Desnaturalización	Temperatura de Alineamiento	Temperatura de Extensión	Melting point	No. ciclos
Gen 16s rRNA	95°C/3min	95°C/30seg	62°C/30seg	72°C/30seg	60-95°C	30
Firmicutes		95°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg	58-95°C	30
Bacteroidetes		95°C/30seg	63°C/30seg	72°C/30seg	61-95°C	35
Proteobacterias		95°C/30seg	56°C/30seg	72°C/30seg	54-95°C	35
Actinobacterias		95°C/30seg	57°C/30seg	72°C/30seg	55-95°C	35

Para la cuantificación de los phylums se realizaron curvas de estándares (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) de las cepas de referencia (Tabla 5.) correspondientes para cada phylum y se determinó la eficiencia de la qPCR, la pendiente y el valor de R^2 en cada una (Anexo 6.)

Tabla 5. Cepas de referencia para la cuantificación por qPCR de cada gen.

Gen qPCR	Cepa de referencia	bp (pares de bases)	Operones (media)
Gen 16s rRNA	<i>L. reuteri</i>	516	-
Firmicutes	<i>L. reuteri</i>	129	7
Proteobacteria	<i>E. coli</i>	155	4.7
Actinobacterium	<i>Bifidobacterium spp</i>	300	3.2
Bacteroidetes	Minigen sintético	126	7

Para la cuantificación de ADN se consideró el tamaño del fragmento amplificado por cada pareja de primers dirigidos contra el ADN de género bacteriano. También se incorporó a los cálculos la media de los operones (Qian, y otros, 2018) de cada phylum (Stoddard, Smith, Hein, Roller, & Schmidt, 2015) y la cantidad de heces pesadas de cada muestra (Tabla 5 y Tabla 9.) Esto con la finalidad de obtener el número de copias de cada gen de forma más precisa.

CUANTIFICACIÓN DE AGCC (Ácidos grasos de cadena corta)

La cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Waters®, Acquity Arq.). Se suspendieron 500mg de heces en 1 ml de agua desionizada y se homogenizaron utilizando el vortex a máxima velocidad. Se dejaron las muestras en reposo y cubiertas de la exposición a la luz durante 24 hrs. Posteriormente se volvió a homogenizar la suspensión y se centrifugo a 10 000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0.22 μm (Corning®) y se colocó en un tubo donde se ajustó el pH con 10 μl de ácido fosfórico. Posteriormente se colocó esta suspensión en viales ámbar y se pasó por una columna Shodex KC-811 con una fase móvil de ácido fosfórico al 0.1%, a un flujo isocrático de 1.0 mL/min con una temperatura de 40 °C en el detector y 35 °C para la columna, tiempo de corrida de 20 minutos, alícuotas de 1 mL y volumen de inyección de 5 μL . Se realizó una curva de calibración para ácido butírico, acético y propiónico a concentraciones de 8, 16, 40, 80, 160 y 400 mM y posteriormente se prepararon las mezclas con concentración final de 0.5 mM hasta 25 mM. Se utilizaron estándares de marca Sigma- Aldrich para el ácido butírico, acético y propiónico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 35 niños reclutados se diagnosticó con obesidad en la evaluación nutricional a 12 de ellos; resultando una muestra final de 24 niños, 12 normopeso y 12 con obesidad, los otros 11 participantes tuvieron un diagnóstico de sobrepeso, por lo tanto se descartaron esas muestras para este estudio. La Tabla 5 muestra las características antropométricas de la población de estudio. En total 12 niños con peso normal y 12 obesos clasificados por IMC. Las variables antropométricas como peso, IMC, circunferencia de cintura, cadera y media de brazo (CMB) fueron mayores en los niños obesos ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ y $P < 0.001$ respectivamente) (Figuras 5 y 6).

La media de la circunferencia de cintura en los niños con obesidad (81.54 ± 8.52 cm) es mayor a la referida en la NOM-043-SSA2-2012, como límite en el aumento de riesgo de padecer comorbilidades en mujeres (>80 cm) e incluso en algunos casos en el rango de riesgo para hombres adultos (>90 cm). En el caso de la composición corporal, el porcentaje de masa grasa (Figura 3) resultó mayor en los niños obesos con una media de 41.98 ± 6.87 ($P < 0.001$).

Tabla 6. Datos sociodemográficos y antropométricos de las poblaciones en estudio.

Datos Antropométricos	Obesos (n= 12)	Normopeso (n=12)	Valor de P	
Edad	8.67 ± 1.55	7.08 ± 1.08	0.0088	**
Sexo (F/M)	4/8	7/5		
Talla, cm	1.38 ± 0.13	1.22 ± 0.06	<0.001	**
Peso, kg	52.93 ± 12.98	25.10 ± 5.80	<0.001	***
IMC, kg/m ²	27.50 ± 3.05	16.51 ± 2.40	<0.001	***
Circunferencia de cintura, cm	81.54 ± 8.52	55.30 ± 6.69	<0.001	***
Circunferencia de cadera, cm	90.09 ± 7.33	62.88 ± 8.69	<0.001	***
CMB, cm	27.49 ± 0.79	18.56 ± 0.06	<0.001	***
% masa grasa	41.98 ± 6.87	20.17 ± 5.68	<0.001	***
% masa muscular	38.50 ± 3.26	40.99 ± 8.01	0.108	NS
PA Triceps, mm	24.88 ± 1.37	9.95 ± 1.20	<0.001	***
PA Biceps, mm	15.46 ± 1.26	5.5 ± 0.57	$<.001$	***
PA Abdominal, mm	35.54 ± 1.12	10.92 ± 2.24	$<.001$	***
***: $P < .001$, **: $P < .002$, *: $P < .033$. NS: No significativo. IMC: Índice de Masa Corporal. CMB: Circunferencia Media de Brazo. PA: Panículo Adiposo. <i>t de Student.</i>				

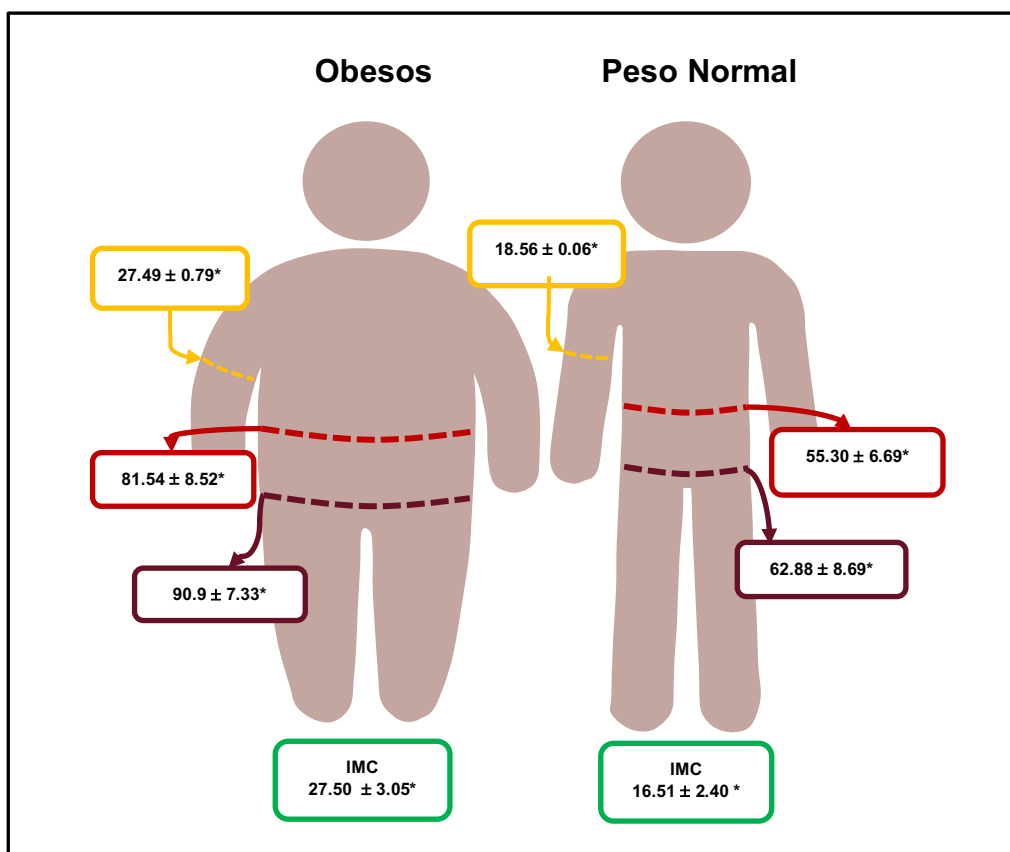


Figura 5. Medidas antropométricas (Circunferencia de cintura, cadera, circunferencia media de brazo e IMC de niños obesos y con peso normal).

En el análisis dietético (Tabla 6) la media total de consumo de energía(kcal) diaria en los escolares con peso normal fue de 2106.21 ± 898.6 kcal/día, y de los escolares con obesidad 2630 ± 894.7 kcal/día, no hubo diferencia significativa entre ambas poblaciones, sin embargo, la distribución de macronutrientos (Figura 7) presentó diferencia significativa en el porcentaje de consumo de hidratos de carbono siendo mayor en los niños con obesidad (Figura 7b)(50.66 ± 5.72)(P<0.05) y en el consumo de lípidos los niños NP (Figura 7a) consumen mayor cantidad a diferencia de los niños con obesidad (40.27 ± 4.73 , 36.13 ± 4.8 , P<0.05, respectivamente).

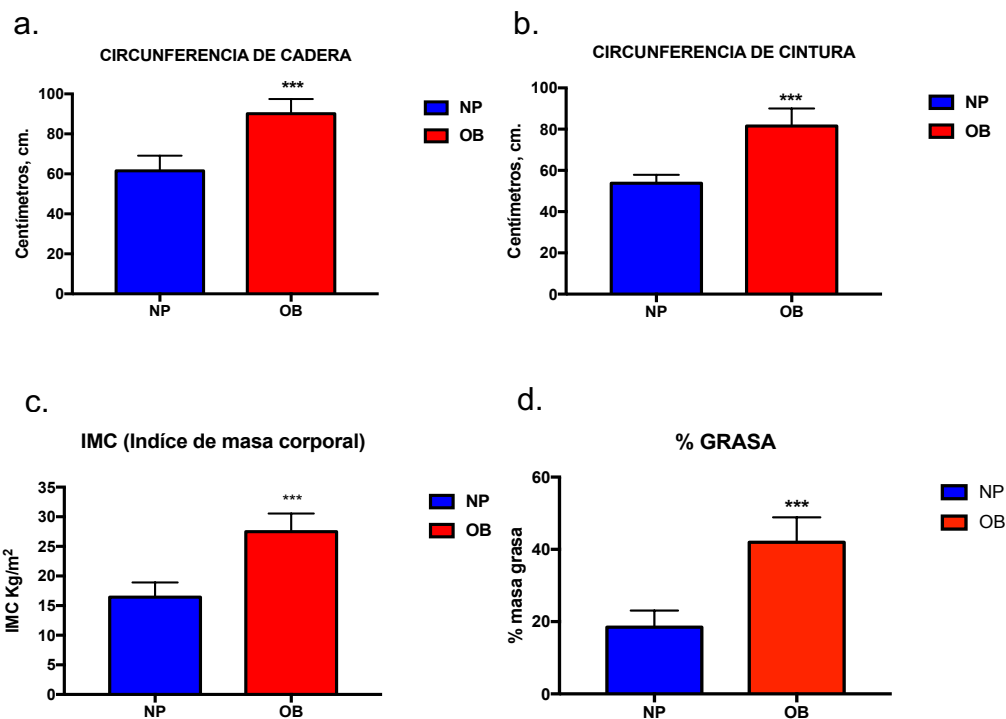


Figura 6. Diferencias significativas en la circunferencia de cadera(a), cintura(b), IMC (c) y porcentaje de masa grasa (d) entre ambas poblaciones. ($p < 0.001$).

Tabla 7. Análisis dietético de niños normopeso y con obesidad.

Datos dietéticos	Obesos	Normopeso	Valor de p	
Muestra, n	12	12		
Energía total, Kcal/día	2630 ± 894.7	2106.21 ± 898.6	0.167	NS
Hidratos de carbono %	50.66 ± 5.72	45.68 ± 5.68	0.044	*
Lípidos %	36.13 ± 4.8	40.27 ± 4.73	0.045	*
% grasa saturada	34.15 ± 3.78	33.03 ± 6.22	0.599	NS
% grasa poliinsaturada	18.77 ± 3.49	17.89 ± 4.57	0.601	NS
% grasa monoinsaturada	33.22 ± 3.19	35.73 ± 5.53	0.191	NS
Proteínas %	13.6 ± 3.64	15.39 ± 2.31	0.167	NS
Fibra dietética, g	14.85 ± 4.09	16.63 ± 5.87	0.397	NS
Grasa saturada, g	36.84 ± 15.71	31.39 ± 15.4	0.399	NS
Grasa monoinsaturada, g	35.55 ± 4.38	33.12 ± 3.81	0.680	NS
Grasa poliinsaturada, g	19.97 ± 8.15	16.7 ± 7.98	0.332	NS
Colesterol, mg	425.1 ± 62.34	332.4 ± 35.55	0.213	NS

*: $P < .033$., NS: No significativo. *t de Student*.

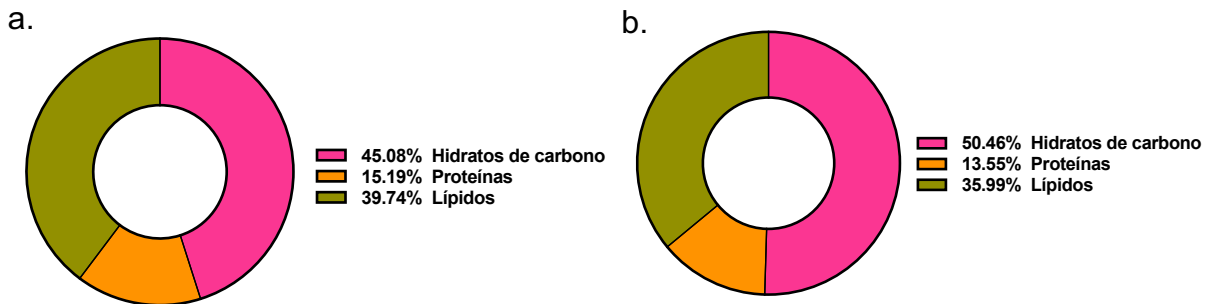


Figura 7. Distribución de consumo de macronutrientes de ambas poblaciones.

A pesar de esto, es importante mencionar que ambas poblaciones exceden el porcentaje recomendado de consumo de lípidos (25-35 %), esta situación también se ve en el porcentaje de grasa saturada. Ambas poblaciones exceden el 10 % sugerido como saludable, siendo en los niños de peso normal de 33.03 ± 6.22 %, y en los niños con obesidad de 34.15 ± 3.78 %. En el caso del colesterol no hubo diferencia significativa en el consumo de mg/día entre ambas poblaciones, aún así, los niños con obesidad presentaron un consumo medio de 425.1 ± 62.34 mg/día (Figura 8), esto es mayor a los 300 mg/día que se establecen como prevención primaria en la NOM-037-SSA2 para la prevención, tratamiento y control de dislipidemias.

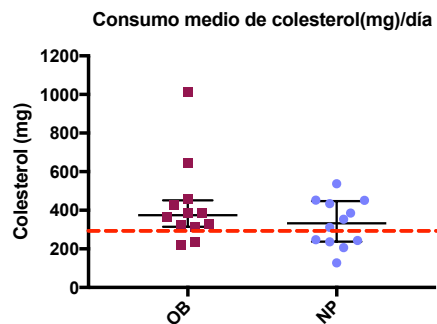


Figura 8. Consumo de colesterol (mg/día) de niños normopeso (NP) y con obesidad (OB).

Se evaluó la correlación del IMC (Figura 69.) con la circunferencia de cintura ($r=0.820$, $P<0.01$) y con el porcentaje de masa grasa (Figura 6b.) ($r=0.742$, $P<0.01$) donde resultó una correlación positiva del IMC con ambas variables. Esto es relevante, pues un IMC categorizado como obesidad en edad escolar aumenta cinco veces la probabilidad de ser un adulto obeso. (Simmonds, LLevellyn, Owen, & Woolacott, 2015).

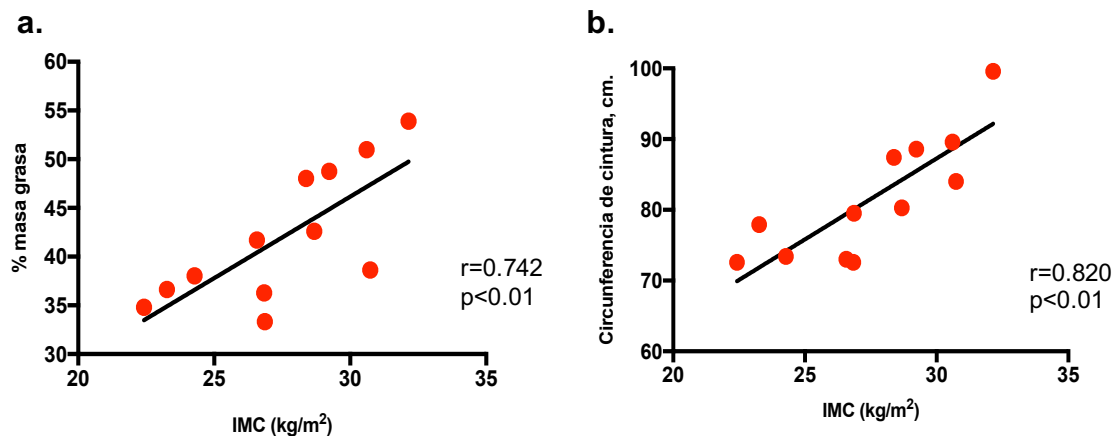


Figura 9. Correlación del IMC (Kg/m²) con el % de masa grasa y la circunferencia de cintura (cm).

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

La cantidad de UFC/g en heces de *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp en escolares de peso normal se muestra en la Figura 10. En el caso de *Lactobacillus* spp se observa una tendencia en los niños con obesidad a una mayor cantidad de UFC/g en heces comparados con los de peso normal. Esto coincide con lo reportado en 2013 por Bervoets et al. donde se reportó una mayor cantidad de *Lactobacillus* spp en las heces de niños obesos comparados con los de peso normal (Bervoets, y otros, 2013). Otro estudio realizado en 2008 reporta una menor cantidad de *Bifidobacterium* spp en niños con obesidad. (Kalliomäki, Maria, Seppo, & Erika, 2008). En 2013, se reportó una mayor abundancia de *Firmicutes* (phylum bacteriano al que pertenecen los *Lactobacillus* spp) en población infantil mexicana donde se asoció significativamente con el riesgo de tener sobrepeso y obesidad (Velasco, y otros, 2015), esto difiere de un estudio reportado en el 2011 en población suiza donde no se encontró diferencia en la correlación *Firmicutes/Bacteroidetes* en niños obesos. (Payne, y otros, 2011).

Sin embargo, la dieta, zona geográfica y costumbres de la población pueden impactar activamente en la diversidad y abundancia de la microbiota. En 2015 *Muruguesan* y colaboradores realizaron un estudio descriptivo de la diversidad y abundancia bacteriana en niños mexicanos con sobrepeso y obesidad donde reportaron mayor abundancia de *Firmicutes* en ambas poblaciones y no encontraron diferencia significativa en la cantidad de *Actinobacterias* (filo bacteriano al que pertenece el género *Bifidobacterium* spp) entre ambos grupos comparados con

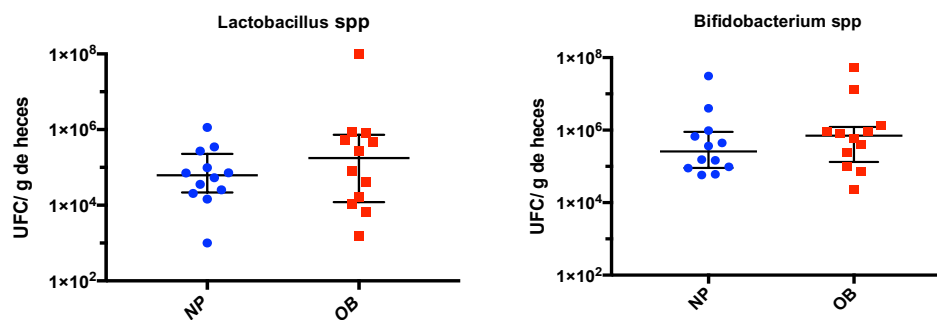


Figura 10. UFC/g de heces de niños con peso normal (NP) y con obesidad (OB) de *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp.

niños de peso normal. (Murugesan, y otros, 2015), estos datos son similares a los encontrados en este estudio.

Las asociaciones entre los géneros bacterianos analizados (Lactobacillus spp y Bifidobacterium spp) con los componentes de la dieta y la ingesta energética total (Kcal/día) de la muestra (24 niños, 12 con peso normal y 12 con obesidad) se presentan en la Tabla 6. Los niños con mayor consumo energético (kcal/día) presentaron una menor concentración de Bifidobacterium spp/g heces ($p < 0.036$).

Tabla 8. Correlación de los componentes de la dieta con UFC/g de heces de Bifidobacterium spp y Lactobacillus spp.

	Componentes de la Dieta				
	Hidratos de carbono (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Fibra (g/día)	Energía total (Kcal)
UFC/g de heces					
Lactobacillus spp	r -0.1054 (0.640)	r 0.3596 (0.100)	r -0.022 (0.919)		r -0.384 (0.077)
Bifidobacterium spp	r -0.188 (0.385)	r 0.284 (0.177)	r 0.0642 (0.765)		r -0.437 (0.036) *
Coeficiente de correlación con un CI de 95%. *Correlación significativa con $P < 0.05$.					

Se extrajo el ADN de las muestras de heces, el cual se rectificó que tuviera la calidad y cantidad adecuada (Tabla 8.) para la cuantificación de phylums por qPCR.

Tabla 9. Cuantificación de ADN de las muestras de heces de niños normopeso (NP) y obesos (OB).

Código	Peso muestra heces (mg)	Concentración ADN (ng/ul)	260/280	260/230
p6	214	61.9	1.92	1.4
p2	218	220	2.12	2.33
p7	219	29.6	1.92	1.91
p33	191	229.1	2.07	2.03
p11	215	53.7	1.98	2.02
p22	212	172.6	2.1	1.95
p8	186	30.8	2.01	2.15
p13	218	243.8	2.09	2.12
p18	217	52.4	2.09	2.14
p10	208	45.6	2.03	2.03
p9	213	149.4	2	1.98

p14	181	136.4	2	2.37
p15	189	37.4	1.78	2.05
p16	207	103	1.97	2.11
p20	187	19.8	1.99	1.78
p24	220	219	2.09	2.41
p25	199	232.2	2.06	2.43
p26	196	38.2	1.91	3.17
p30	184	157.3	2.04	2.44
p31	217	69.5	1.92	3.43
p32	207	585.2	2.06	2.22
p34	183	194.1	2.07	2.52
p35	207	290.9	2.1	2.45

Se realizó qPCR para cuantificar el número de copias de cada gen correspondiente a los phylum bacterianos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacterias* y *Proteobacterias* en las heces de los escolares con peso normal y obesos. La Figura 8 muestra el espectro completo de microorganismos bacterianos que hay en las heces de niños NP y OB. No se observó diferencia en la abundancia total de microorganismos entre ambas poblaciones, sin embargo, es evidente que hay una alteración en la abundancia de microorganismos en los niños OB comparados con las heces de los niños NP.

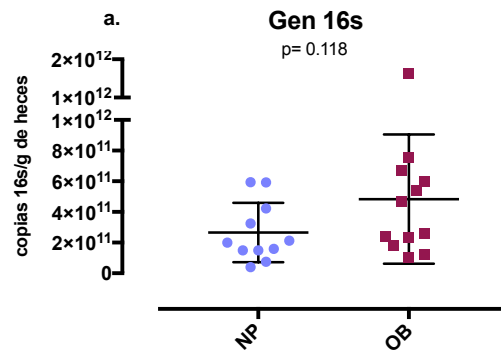


Figura 11. Copias gen 16s/g de heces (a) de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).

Al analizar los resultados por *Phylum* entre ambas poblaciones no se encontró diferencia en la cantidad de copias de los phylums *Firmicutes*, *Actinobacterias* y *Proteobacterias* ($p=0.37$, $p=0.23$ y $p=0.21$) entre ambas poblaciones. A excepción

del phylum *Bacteroidetes* que resultó ser más abundante en los niños OB ($p=0.01$), estos datos difieren a lo reportado previamente en el 2015 por Murugesan y colaboradores donde la cantidad de *Firmicutes* resultó ser más abundante y la cantidad de *Proteobacterias* menor en los niños con obesidad comparados con los niños con peso normal y no hubo diferencia en la cantidad de *Actinobacterias* y *Bacteroidetes* entre ambas poblaciones. (Murugesan, y otros, 2015). Otro estudio realizado en niños mexicanos en el 2015 por Burguete-García y colaboradores reportó que a mayor abundancia relativa de Firmicutes y menor abundancia de Bacteroidetes aumenta hasta 1.5 veces las probabilidades de que los niños presenten sobrepeso u obesidad, estos datos difieren a los de este estudio, sin embargo, en cuanto a la abundancia de Firmicutes reportada en este estudio a pesar de no ser significativamente mayor en los niños con obesidad si está relacionada con un patrón de alimentación no saludable caracterizado por alimentos con alto contenido de carbohidratos complejos y grasas saturadas (Estrada Velasco , y otros, 2015), mismo patrón que se ve reflejado en el análisis dietético de este estudio donde ambas poblaciones consumen una alta cantidad de colesterol y los niños con peso normal consumen mayor cantidad de grasas totales en comparación con los niños OB.

La relación entre la abundancia de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* con el desarrollo de enfermedades con la obesidad está documentado, existen grupos y familias de microorganismos dentro de éstos que se encargan de producir metabolitos como los AGCC provenientes de la digestión de ciertos carbohidratos complejos como fibras que están implicados en distintas funciones metabólicas. (Tremaroli & Bäckhed, 2012) (Canfora E. , Jocken, W., & Blaak E. , 2015). Por lo tanto es de relevancia mencionar que los resultados de este estudio pueden variar a lo previamente reportado por factores como la dieta en calidad y cantidad, que aunque no hubo diferencia entre la cantidad de energía (Kcal/día) y en el consumo de % carbohidratos, % proteínas y % lípidos consumidos entre ambas poblaciones no se hizo un análisis exhaustivo de la cantidad y el tipo de fibra consumida por ambas poblaciones que podría ayudar a explicar las diferencias en la cantidad de AGCC en las heces de ambas poblaciones que se presenta en las Figuras 11 y 12 a pesar de no presentar diferencia en los phylums bacterianos entre niños NP y OB.

En la Figura 13 se observa de manera más gráfica las proporciones de los phylums cuantificados y comparados entre ambas poblaciones.

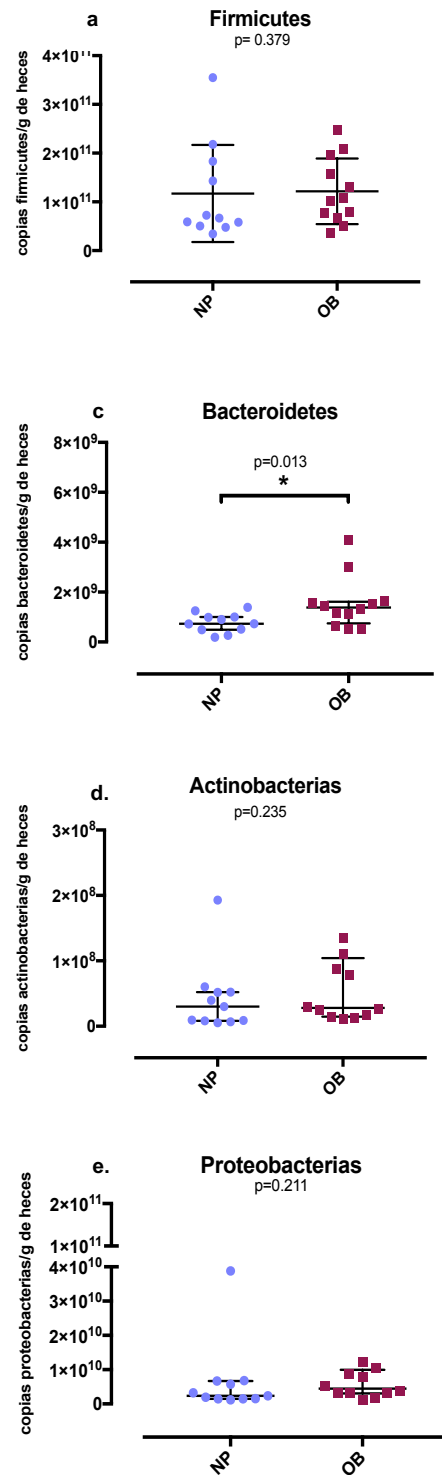
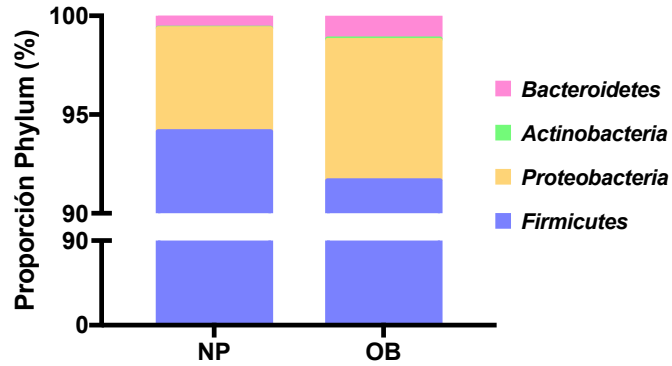


Figura 12. Copias genes phylums *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacterias* y *Proteobacterias*/g de heces (a) de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).



	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Actinobacterias</i>	<i>Proteobacterias</i>
NP	94.14	0.62	0.03	5.21
OB	91.66	1.16	0.08	7.09

Figura 13. Porcentaje de phyla en heces de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).

CUANTIFICACIÓN DE AGCC EN HECES

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son el principal metabolito de las bacterias, producto de la fermentación de los nutrientes no digeridos en la parte alta del tubo digestivo, principalmente carbohidratos. (MacFarlane & MacFarlane, 2012). El 95% de la producción de AGCC corresponde a los ácidos propiónico, butírico y acético. (Cummings, Pomare, Branch, Naylor, & MacFarlane, 1987). La proporción de la producción de estos AGCC tiene un rol clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, mecanismos reguladores de la saciedad y el gasto energético, la sensibilidad a la insulina, metabolismo de lípidos y el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. (Canfora E. , Jocken, W., & Blaak E. , 2015).

En este estudio se cuantificaron los AGCC (Ác. Acético, Ác. Propiónico y Ác. Butírico) en las heces de ambas poblaciones (niños NP y niños OB) por HPLC como se describe el apartado de materiales y métodos. Los niños NP y OB presentaron diferentes concentraciones de Ác. Acético, propiónico y butírico (Figura 8). Los niños NP tienen menor cantidad de Ác. Propiónico y Ác. Butírico en heces ($p=0.05$ y

p=0.03 respectivamente) comparados con los niños OB. En el caso del Ác. Propiónico lo niños OB presentaron una cantidad significativamente mayor (p=0.01) que los niños NP. En general los niños OB presentaron mayor cantidad de AGCC en heces que los niños NP. Estos resultados difieren de los reportados por Murguesan y colaboradores en el 2015, donde las cantidades de ác. Propiónico y butírico son menores en los niños OB contrario a los resultados del presente estudio. Las diferencias encontradas en ambos estudios pueden deberse a una disbiosis general en ambas poblaciones (NP y OB), en el caso de este estudio la mayor cantidad de AGCC en OB puede estar relacionada con una mayor cantidad de bacterias como se vio en los resultados de la cuantificación del Gen 16s, a mayor cantidad de bacterias, mayor fermentación y extracción de energía de los alimentos igual a mayor producción de AGCC. (MacFarlane & MacFarlane, 2012). Esto coincide con la cantidad de energía (Kcal/día) consumida por los niños OB, mayor en los niños OB que los NP en este estudio, sumado a esto las diferencias entre este estudio y lo reportado en 2015 en niños mexicanos pueden deberse a la zona geográfica del muestreo poblacional y el tipo y calidad de la dieta. En la Figura 15 se observa de manera gráfica las diferencias porcentuales de la cantidad de AGCC (ác. Acético, Butírico y Propiónico) en las heces de ambas poblaciones, donde se

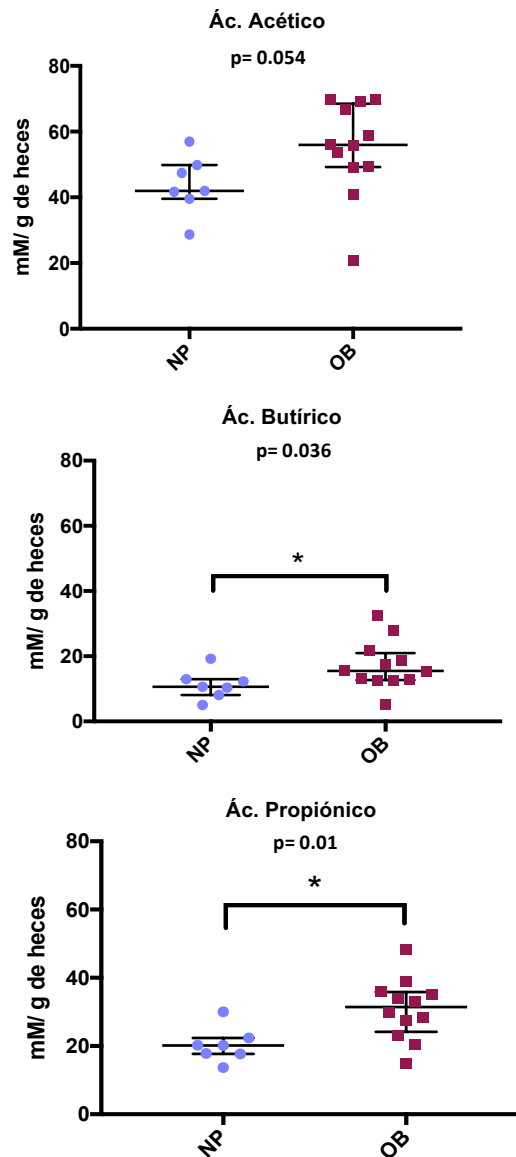
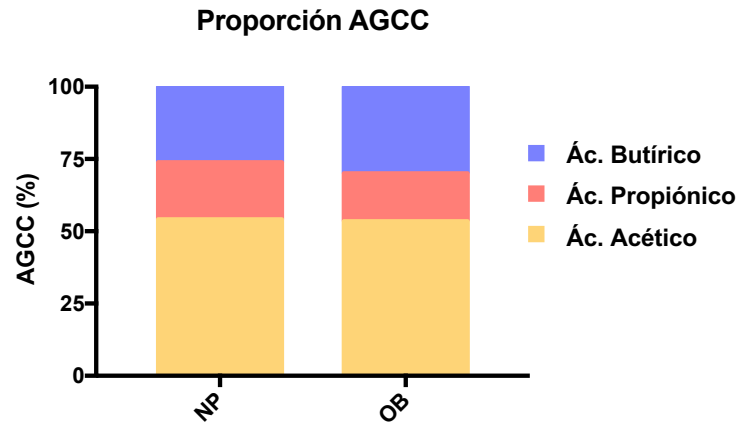


Figura 14. Cuantificación de AGCC (mM/g de heces) en ambas poblaciones (Peso Normal, NP., Obesos, OB).

observa nuevamente que los niños OB presentaron una mayor cantidad de ác. Butírico y ác. Propiónico en heces ($p=0.03$ y $p=0.01$).



	<i>Ác. Butírico</i>	<i>Ác. Propiónico</i>	<i>Ác. acético</i>
NP	26.11	19.75	54.14
OB	29.96	16.75	53.45

Figura 15. Porcentaje de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de niños con peso normal (NP) y obesos (OB).

EVALUACIÓN DEL SIMBIÓTICO EN EL SIMULADOR DEL TRACTO DIGESTIVO ARIS

Se evaluó el simbiótico que contenía fructanos de agave y lactobacilos en el simulador de tracto digestivo (ARIS) adaptado a condiciones de niños normopeso (NP) y obesos (OB) como se describió en el apartado de materiales y métodos. Este sistema es un modelo *ex vivo* con el cual se pueden obtener resultados previos a un estudio clínico, con el objetivo de tener un panorama más amplio de los fenómenos que pueden llegar a suceder en el comportamiento de la microbiota intestinal. (Hernández-Moedano, Moreno-Ramos, Herrera-Rodríguez, & González-Ávila, 2014).

En la Figura 16 se muestran las cuentas de UFC/mL de *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp en el colon ascendente durante la evaluación en el simulador con el alimento estándar (día 0, 1 digestión y digestión continua) y del alimento estándar adicionado con el simbiótico (Sin administración, una administración y administración continua) con la microbiota intestinal de los niños normopeso (NP) (Fig 13a) y obesos (OB) (Fig 13b).

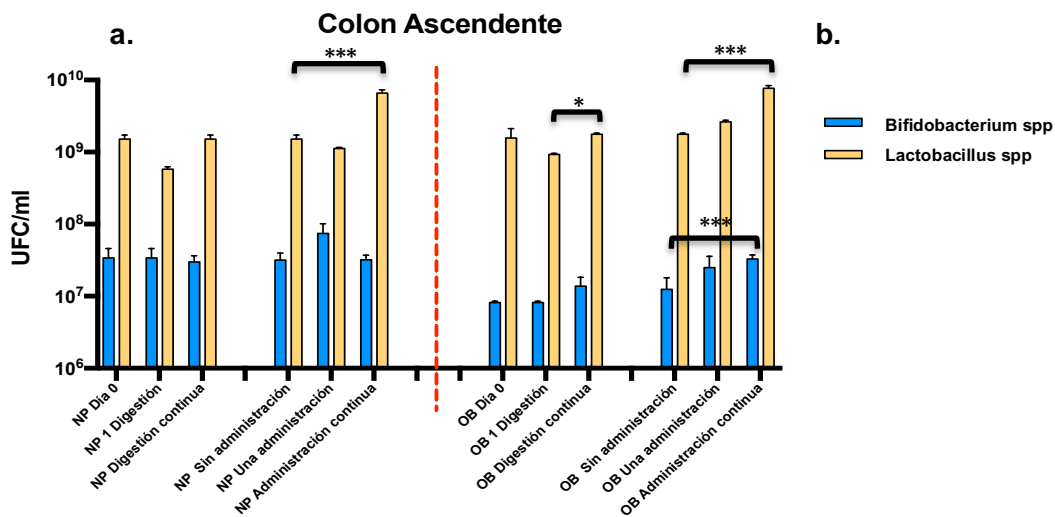


Figura 16. UFC/ml en colon ascendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador del tracto digestivo ARIS. (NP: Simulador adaptado a condiciones de niños normopeso, OB: Simulador adaptado a condiciones de niños con obesidad).

Es posible observar que en el conteo de bacterias se encontraron valores que van desde 1×10^6 hasta 1×10^9 UFC/mL. En el caso de *Lactobacillus spp* se observó un aumento con la administración continua del simbiótico en la microbiota de los niños NP y OB (Fig 16a y 16b). En el caso de *Bifidobacterium spp* se observó un aumento con la administración continua del simbiótico en la microbiota intestinal de los niños OB (Fig 16b). En la Tabla 10 se pueden consultar el valor de p y la significancia de las diferencias entre los tiempos de administración de cada género.

Tabla 10. Diferencias significativas en UFC/mL (*Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*) en el colon ascendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.

Colon Ascendente				
	Adaptación ARIS	Administración/ Digestión	Diferencia	Valor de p
<i>Lactobacillus spp</i>	NP + simbiótico	0-3	-5.085E9	0.0001
	OB	1-3	8.71333E8	0.0053
	OB + simbiótico	0-3	-5.93E9	0.0000
<i>Bifidobacterium spp</i>	OB + simbiótico	0-3	-5.93E9	0.0000

En la Figura 17 se muestran las cuentas de UFC/ml de *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus spp* en el colon transversal durante la evaluación en el simulador con el alimento estándar (día 0, 1 digestión y digestión continua) y del alimento estándar adicionado con el simbiótico (Sin administración, una administración y administración continua) con la microbiota intestinal de los niños normopeso (NP) (Fig 17a) y obesos (OB) (Fig 17b).

En la microbiota de los niños NP (Fig 17a) se observó una disminución en *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp* con el alimento estándar, sin embargo, con la suplementación del simbiótico hubo un aumento en ambos grupos bacterianos con la administración continua del simbiótico. En el caso de la microbiota de los niños OB (Fig 17b) el género *Bifidobacterium spp* disminuyó sin la administración y con la administración continua del simbiótico y el género *Lactobacillus spp* disminuyó con la administración continua del simbiótico.

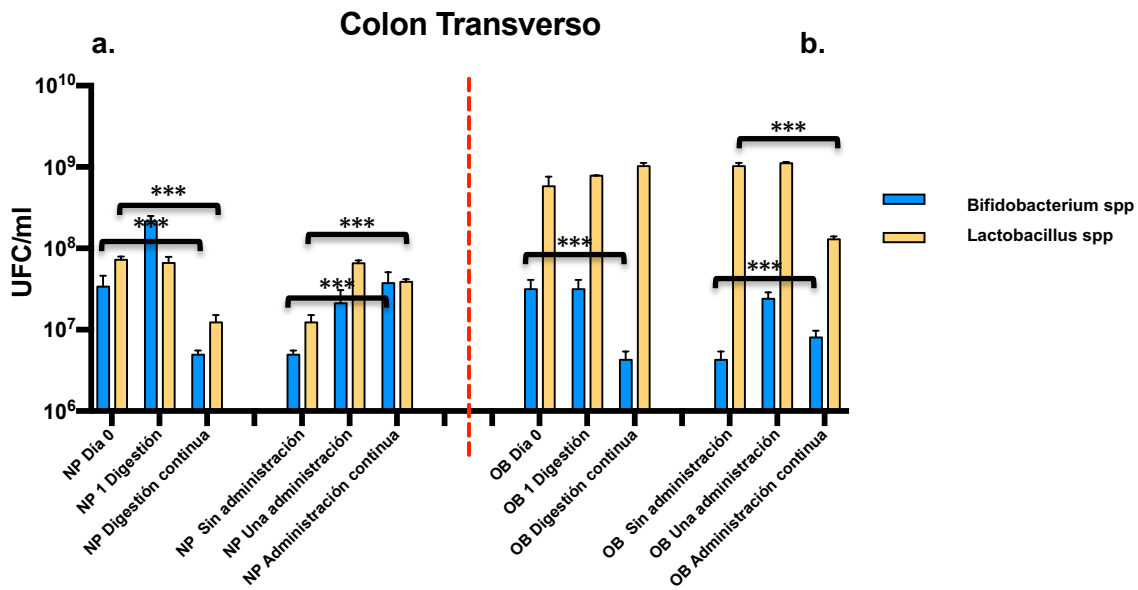


Figura 17. UFC/ml en colon transverso durante la evaluación del simbiótico en el simulador del tracto digestivo ARIS. a.: NP: Simulador adaptado a condiciones normopeso, b.: OB: Simulador adaptado a condiciones de obesos.

En la Tabla 11 se pueden consultar el valor de p y la significancia de las diferencias entre los tiempos de administración de cada género.

Tabla 11. Diferencias significativas en UFC/mL (Lactobacillus spp y Bifidobacterium spp) en el colon transverso durante la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.

Colon Transverso				
Grupo Bacteriano	Adaptación ARIS	Administración/ Digestión	Diferencia	Valor de p
Lactobacillus spp	NP	0-3	6.26667E7	0.0001
	NP + simbiótico	0-3	-2.66667E7	0.0000
	OB + simbiótico	0-3	8.96667E8	0.0000
Bifidobacterium spp	NP	0-3	1.90245E8	0.0000
	NP + simbiótico	0-3	-3.26817E7	0.0342
	OB	0-3	2.7345E7	0.0247
	OB + simbiótico	0-2	-3.38617E7	0.0004
		2-3	3.00967E7	0.0004

En la Figura 18 se muestran las cuentas de UFC/ml de Bifidobacterium spp y Lactobacillus spp en el colon descendente durante la evaluación en el simulador con el alimento estándar (día 0, 1 digestión y digestión continua) y del alimento estándar adicionado con el simbiótico (Sin administración, una administración y

administración continua) con la microbiota intestinal de los niños normopeso (NP) (Fig 18a) y obesos (OB) (Fig 18b).

En el caso de *Lactobacillus* spp en la microbiota intestinal de los niños NP disminuyó la cantidad de bacterias con la alimentación estándar y con la administración continua del simbiótico, de manera contraria al grupo *Bifidobacterium* spp el cual aumento con la administración continua del simbiótico (Fig18a). Por otra parte, en la microbiota de los niños OB se observó un aumento de *Lactobacillus* spp y una disminución de *Bifidobacterium* spp con la digestión continua del alimento estándar, al contrario de lo ocurrido con la administración continua del simbiótico donde el fenómeno fue inverso, una reducción de *Lactobacillus* spp y un aumento en el grupo de bifidobacterias (Fig 18b).

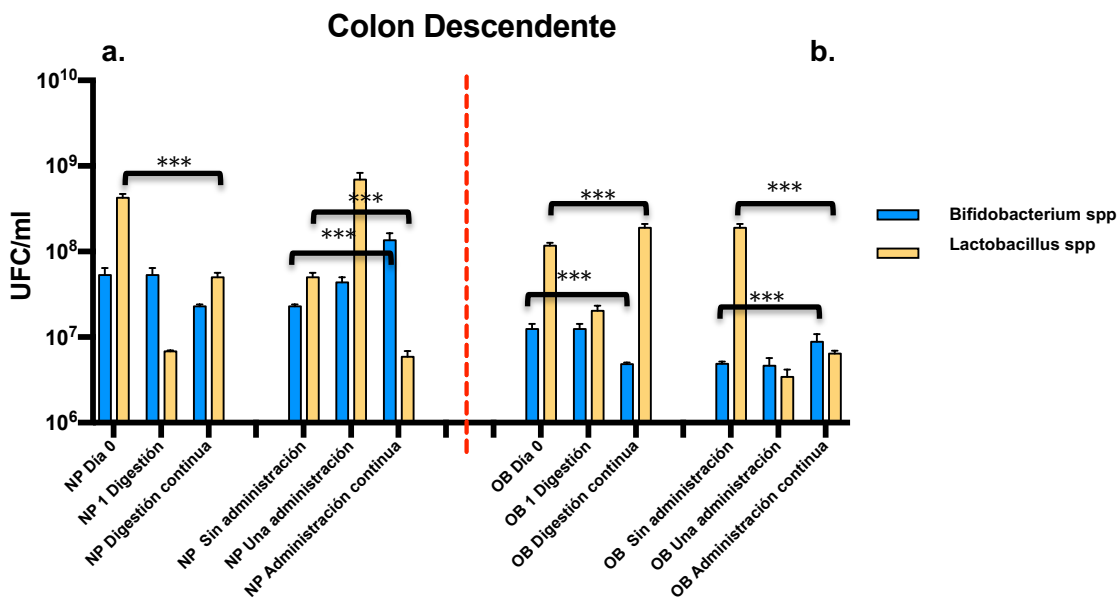


Figura 18. UFC/mL en colon descendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador del tracto digestivo ARIS. (NP: Simulador adaptado a condiciones Normopeso., OB: Simulador adaptado a condiciones de obesos).

En la Tabla 12 se pueden consultar el valor de p y la significancia de las diferencias entre los tiempos de administración de cada género.

Tabla 12. Diferencias significativas en UFC/mL (*Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*) en el colon descendente durante la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS.

Colon Descendente				
Grupo Bacteriano	Adaptación ARIS	Administración/ Digestión	Diferencia	Valor de p
<i>Lactobacillus spp</i>	NP	0-3	3.555E8	0.0000
	OB	0-3	-7.3E7	0.0000
	OB + simbiótico	0-3	1.83567E8	0.0000
<i>Bifidobacterium spp</i>	NP + simbiótico	0-3	-1.12088E8	0.0072
	OB	0-3	7.6E6	0.0005
	OB + simbiótico	0-3	-3.91667E6	0.0280

Los resultados de la evaluación del simbiótico en el simulador de tracto digestivo ARIS considerando la definición de simbiótico como “producto que impacta de manera benéfica al huésped promoviendo la sobrevivencia y crecimiento de microorganismos en combinación con sustratos que suscitan el crecimiento selectivo y activación metabólica de microorganismos benéficos propios de la microbiota intestinal”, es decir que brinda los beneficios de un probiótico y prebiótico. (Pandey, Naik, & Vakil, 2015), y que como beneficio primario del uso de un simbiótico se reporta el aumento en los niveles de *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp* se puede inferir que el producto evaluado en este proyecto tuvo este efecto durante su evaluación con la microbiota intestinal de niños OB y de manera contraria en la microbiota de los niños NP. Estos resultados coinciden con los reportados por Safavi y colaboradores en 2015, donde evaluaron el efecto de un simbiótico en niños con sobrepeso y obesidad donde hubo un aumento en las cuentas de *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus spp* en las heces de los niños después de consumir de manera continua (8 semanas) un simbiótico que contenía varias cepas de probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus bulgaricus*) y FOS (fructooligosacaridos) en comparación con el grupo placebo. (Safavi, Farajian, Kelishadi, Mirlohi, & Hashemipour, 2013). Sin embargo, no se puede declarar como simbiótico este producto, ya que los beneficios como la inmunomodulación, la prevención y disminución de la translocación bacteriana e incluso la mejora ciertas funciones

orgánicas, por ejemplo, hepáticas en el caso de pacientes con cirrosis (Pandey, Naik, & Vakil, 2015) no fueron evaluadas.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA PRODUCIDOS DURANTE LA EVALUACIÓN DEL SIMBIÓTICO EN EL SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO ARIS.

Se cuantificó la producción de AGCC (Ác. Láctico, Acético, Butírico) durante las cuatro evaluaciones en el simulador de tracto digestivo ARIS. En la Figura 16 se muestran los datos obtenidos de la cuantificación de AGCC durante la evaluación del simbiótico con la microbiota intestinal de niños NP (Simbiótico ARIS), en comparación con los datos obtenidos en este estudio del contenido de AGCC en heces de niños NP (Figura 19) y datos obtenidos de un estudio realizado en 2015 por Muruguesan y colaboradores del contenido de AGCC en heces de niños NP mexicanos.

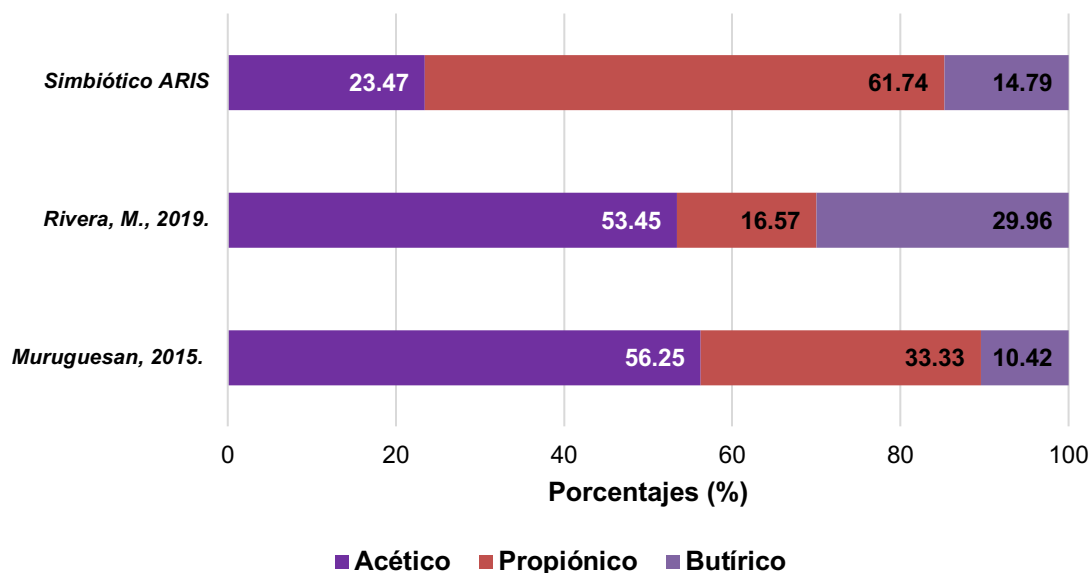


Figura 19. Comparación de los porcentajes de AGCC en heces de niños con obesidad con la cantidad de AGCC producidos durante la evaluación del simbiótico en ARIS con microbiota intestinal de niños con obesidad.

En la Figura 19 podemos observar que existe diferente proporción en la cantidad de AGCC en las 3 columnas, es importante mencionar que las 3 columnas corresponden al mismo tipo de población (niños escolares con obesidad) en diferentes condiciones. Los datos reportados por Murugesan y colaboradores en 2015 difieren a las proporciones que resultaron en este estudio (Rivera, M., 2019) de la cuantificación de AGCC en heces de niños con obesidad, esto puede deberse a las diferencias que existen en la dieta de cada población e incluso la zona geográfica. (Bervoets, y otros, 2013). Sin embargo, las concentraciones de Ác. Acético y Ác. Butírico son más elevadas en las heces de niños con obesidad en este estudio (Figura 14), datos que coinciden con lo reportado Payne y colaboradores en el 2011 donde también observaron mayor concentración de ác. Acético y ác. Butírico en heces de niños con obesidad comparadas con niños de peso normal. (Payne, y otros, 2011).

En la tercer columna que corresponde a la cuantificación de AGCC producidos durante la evaluación del simbiótico en el ARIS con microbiota intestinal de niños con obesidad también se observó un comportamiento diferente, hubo un aumento en la producción de ácido propiónico en comparación con la cantidad presente en las heces de los niños, esto puede deberse a la manipulación que existe de la microbiota al momento de adaptar el ARIS a las condiciones necesarias para hacer la evaluación afectando la proporción de los filos bacterianos que están involucrados en la producción de AGCC como el ácido propiónico. (Bourriaud, y otros, 2005).

Considerando que el objetivo de esta investigación era evaluar un simbiótico con la finalidad de modular la microbiota intestinal de niños con obesidad hacia un perfil parecido de microbiota intestinal de niños con peso normal con la suplementación de un simbiótico evaluado en un simulador de tracto digestivo, es importante comparar también la producción de AGCC en el simulador adaptado a niños con obesidad después de la administración continua del simbiótico con la cantidad de AGCC en las heces de niños con peso normal (Figura 20), esperando que el perfil de metabolitos generados durante la evaluación del simbiótico en el simulador se asemejara al de los niños con peso normal. (Murugesan, y otros, 2015; Payne, y

otros, 2011). Sin embargo, como se aprecia en la Figura 20, las proporciones de AGCC generadas durante la evaluación del simbiótico no se asemejan a las del perfil de heces de niños mexicanos con peso normal reportadas en 2015 por Muruguesan y colaboradores, al contrario, se ve un aumento en la cantidad de ácido propiónico. El ácido propiónico está implicado en el metabolismo de la glucosa a nivel hepático utilizado principalmente como sustrato para la gluconeogénesis, esto en conjunto con el butirato y el acetato utilizados como sustrato para la lipogénesis, se ha reportado una mejora en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa. (Canfora E. , Jocken, W., & Blaak E. , 2015).

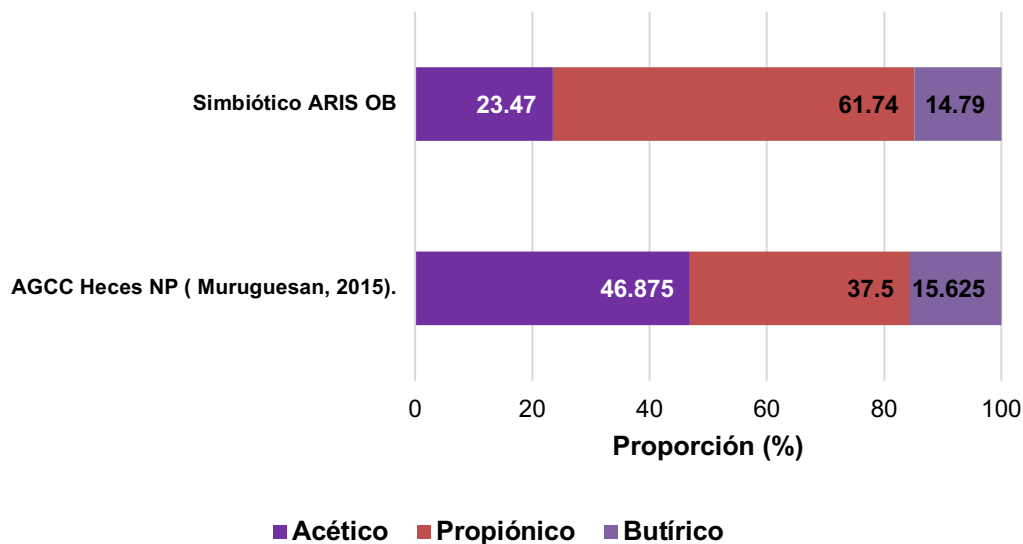


Figura 20. Comparación de la proporción de AGCC en heces de niños con obesidad con la cantidad de AGCC producidos durante la evaluación del simbiótico en ARIS con microbiota intestinal de niños con obesidad.

En este estudio se demuestra que la microbiota se encuentra en un estado dinámico, ésta se puede alterar o modificar por distintos factores como el tipo de población y/o la dieta, en este caso también se demuestra el impacto del uso de un simbiótico. A pesar de que numerosas publicaciones reportan el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos (Markowiak & Slizewska, 2017; Barengolts, 2016; Patel & L. Du Pont, 2015; Krumbeck, Maldonado-Gomez, Ramer-Tait, & Hutkins, 2016; Pandey, Naik, & Vakil, 2015) como estrategia de manipulación de

la microbiota no se puede concluir solo con esta evaluación que el uso de un simbiótico como suplemento alimenticio para niños con obesidad tendrá un efecto positivo en cuanto a la modulación de la microbiota intestinal y sus metabolitos. Otros estudios realizados con simuladores, sugieren complementar los resultados con técnicas moleculares para poder determinar el potencial benéfico de un simbiótico sobre la microbiota intestinal. (Gmeiner, y otros, 2000).

CONCLUSIONES

- En la evaluación nutricional de niños normopeso y obesidad de este estudios no hubo diferencia en el consumo energético (Kcal totales) en niños con peso normal y con obesidad.
- Los niños con peso normal y con obesidad consumen una mayor cantidad de colesterol (>300 mg/día) que la recomendada por la NOM – 037 (Prevención y control de dislipidemias).
- A mayor consumo energético (Kcal/día) aumenta el IMC y disminuyen las bifidobacterias en heces de niños con obesidad.
- Los niños con obesidad tienen más *Bacteroidetes* (no. de copias/g de heces) que los niños con peso normal.
- Los niños con obesidad tienen mayor cantidad de Ác. Propiónico y Ác. Butírico en heces que los niños con peso normal.
- El simbiótico evaluado NO modula la microbiota intestinal de niños con obesidad ni la producción de AGCC en un simulador de tracto digestivo “ARIS”.

ANEXOS

1. Consentimiento Informado

A: _____ del año _____.

En: _____.

Para procedimiento de obtención de muestras de heces fecales.

Nombre del Padre o Tutor:

Nombre del participante:

DECLARO que he leído y comprendo la información que consta en este documento **DOY MI CONSENTIMIENTO (aprobación)** para que mi hijo(a) participe en el estudio denominado: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN SIMBIÓTICO EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE POBLACIÓN INFANTIL CON OBESIDAD EN UN SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO”** y con motivo de ello doy mi consentimiento para **DONAR** al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ, A.C.), de forma gratuita las muestras de heces de mi hijo(a) que me sean requeridas, en las condiciones que me indiquen y con los procedimientos que el estudio requiere, los cuales me serán informados en tiempo y forma. Así mismo me serán entregados los materiales necesarios para la recolección de muestras. El proyecto de investigación corresponde al tipo: a) investigación con riesgo mínimo.

EN VIRTUD DE LO CUAL YO ENTIENDO QUE:

I. La justificación y los objetivos de la investigación son:

La obesidad es un problema de salud que afecta a la población mundial, en el 2016 más de 1.9 billones de adultos tenían sobrepeso u obesidad. La población infantil y adolescente esta siendo afectada por esta condición con rapidez, en los últimos 30 años la incidencia se ha cuadruplicado en esta población. En México el 18% de los niños entre 5 y 11 años tienen obesidad.

Las estrategias y tratamientos que se utilizan actualmente para prevenir y tratar la obesidad parecen no tener un impacto a largo plazo, las cifras han ido y siguen en aumento.

Al ser una enfermedad de etiología multifactorial (factores ambientales, genéticos, psicológicos, composición de la microbiota intestinal, niveles de estrés) la elección de un tratamiento preventivo o correctivo efectivo es crucial para el beneficio del paciente dadas las consecuencias negativas que la obesidad tiene sobre la salud.

La microbiota intestinal es un factor involucrado en el metabolismo humano, sin embargo, no se considera a la hora de diseñar un tratamiento para control de peso. Los probióticos, prebióticos y simbióticos se han comenzado a estudiar como moduladores de la microbiota intestinal en personas con obesidad, a pesar de ello, los estudios en humanos se ven limitados por problemas de ética.

El desarrollo de sistemas *in vivo* y simuladores *ex vivo* que reproducen los procesos de digestión humana e incluso los procesos de fermentación de la microbiota intestinal son

métodos de utilidad para evaluar estos productos sin poner en riesgo la salud de una persona.

Por motivos como los antes mencionados se propone evaluar el efecto de un simbiótico sobre la microbiota intestinal de población infantil con obesidad en un simulador de tracto digestivo.

La suplementación con un simbiótico como modulador de la microbiota intestinal se propone como coadyuvante en la prevención y tratamiento de la obesidad dada la relación que existe entre la microbiota intestinal y el metabolismo.

II. Los procedimientos a usarse y su propósito:

- La participación de mi hijo(a) en este proyecto es totalmente voluntaria y consiste en la donación de las muestras de heces que me sean requeridas.
- Una vez obtenidas las muestras de heces estas deben ser trasladadas en frío al Laboratorio de Digestión *ex vivo* de CIATEJ ubicado en Av. Normalistas 800 Col. Colinas de la Normal en Guadalajara e iniciar los procedimientos para el análisis de microbiota intestinal y su conservación a -80°C para los posteriores análisis correspondientes. Los restos de las muestras de heces serán desechados de acuerdo con lo que señala la norma NOM 087-SEMARNAT-SSA1-2002 normatividad para el manejo de residuos biológicos.

III. Las molestias o los riesgos esperados:

- La investigación que se practicará en y con las muestras de heces no supone complicaciones y/o efectos secundarios que lesionen a mi hijo(a) como donador de muestra para el presente proyecto de investigación.

IV. Los beneficios que se pueden observar:

- Los posibles beneficios que se obtendrán con este estudio son: obtener datos de referencia de microbiota intestinal de población infantil mexicana y de obtener resultados positivos en la evaluación *ex vivo* del simbiótico, la obtención de un probable coadyuvante en el tratamiento de la obesidad.
- Los beneficios que obtendré con este estudio son: una evaluación del estado nutricional, dietético y de composición corporal de mi hijo(a), así como los resultados de un análisis de microbiota intestinal de mi hijo(a).

V. La seguridad de que no se identificará al participante y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada a su privacidad:

- El protocolo de investigación se llevará a cabo respetando siempre el derecho a la confidencialidad y dignidad de mi hijo(a), así como la confidencialidad de los datos personales sensibles que se lleguen a recabar relacionados con el estado de salud y no podrán ser usados con fines discriminatorios ni en perjuicio, tampoco podrá facilitarse el acceso a otras personas, salvo que exista el consentimiento por escrito. No será aplicable lo anterior cuando el tratamiento de la información sea con fines históricos, estadísticos y/o científicos en cuyo caso no habrá una asociación con los

datos personales, evitando así se pueda identificar a mi hijo(a), asimismo autorizo la publicación científica de dichos resultados obtenidos de este estudio.

VI. Que existan gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

- Los estudios realizados en la investigación serán cubiertos con el presupuesto aprobado para esta investigación, pero no así los procedimientos para la devolución y entrega de las muestras de heces en el caso de que lo solicite.

Habiendo comprendido lo anterior y una vez que se aclararon todas mis dudas que surgieron con respecto a la participación en este proyecto, acepto que mi hijo(a) participe con la donación de muestra de heces en el estudio titulado:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN SIMBIÓTICO EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE POBLACIÓN IESCOLAR CON OBESIDAD EN UN SIMULADOR DE TRACTO DIGESTIVO”.

Nombre y Firma del Padre o Tutor.

Nombre y Firma de testigo 1	Nombre y Firma de testigo 2
-----------------------------	-----------------------------

Nombre y Firma del Investigador responsable	Nombre y Firma quien aplica el consentimiento informado
---	---

2. Historia Clínica

Exp. No:

FECHA:

DATOS PERSONALES

NOMBRE DEL TUTOR: _____

NOMBRE DEL NIÑO: _____

FECHA DE NACIMIENTO: _____ EDAD CON MESES: _____

TIPO DE NACIMIENTO: _____ SDG: _____

PESO AL NACER: _____ LONGITUD AL NACER: _____

ANTIBIÓTICOS EMBARAZO: _____

NO. DE HERMANOS: _____ QUIEN LO CUIDA: _____

SERVICIOS BÁSICOS: _____

LACTANCIA (materna exclusiva, mixta, formula): _____ ¿CUÁNTO TIEMPO? _____

ABLACTACIÓN: _____

CIRUGÍAS: _____

MEDICAMENTOS/SUPLEMENTOS: _____

ENFERMEDADES DIAGNOSTICADAS: _____

ALERGIAS: _____

HÁBITOS DE EVACUACIÓN: _____

ESCALA DE BRISTOL: _____

ACTIVIDAD FÍSICA: _____

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES

CANCER: _____ HTA: _____

DIABETES: _____ OBESIDAD: _____

OTRAS: _____

ANTROPOMETRÍA

TALLA		CMB	
PESO		BRAZO FLEX	
TRICEPS		CINTURA	
BICEPS		CADERA	
SUBESCAPULAR		ABDOMEN	
CRESTA ILEACA		MUSLO MEDIAL	
ABDOMINAL		PANTORRILLA	
MUSLO FRONTAL		MUÑECA	
PANTORRILLA		HUMERAL	
		FEMORAL	

3. Frecuencia de Alimentos.



CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Por favor, marque una única opción en función del número de veces que consuma cada alimento.

	Para cada alimento, marque el recuadro que indica la frecuencia de consumo promedio durante el año pasado. Se trata de tener en cuenta también la variación de verano/invierno. Por ejemplo, si tomas helados 4 veces/semana solo durante los tres meses de verano, el uso promedio al año es 1/semana.	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO											
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA						
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6			
I. LACTEOS	1. Leche entera (1 taza, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2. Leche semidescremada (1 taza, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3. Leche descremada (1 taza, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	4. Leche condensada (1 cucharada, 15 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	5. Nata o crema (1 cucharada, 15 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	6. Licuados de leche envasados o industrializados (1 vaso, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7. Yogurt entero (1 pieza, 125 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	8. Yogurt descremado (Light) (1 pieza, 125 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9. Petit suisse (tipo danonino) (1 pieza, 45 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	10. Requesón o jocoque (3 cucharadas, 35 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	11. Queso crema (1 porción o 25 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	12. Otros quesos: curados, semicurados (manchego, gouda, oaxaca, mozzarella) (1 rebanada, 30 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	13. Queso blanco o fresco (cabra, adobera, panela) (1 rebanada, 40 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	14. Natillas, flan, jericalla (1 pieza, 130 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	15. Helados (1 bola, 90g), paletas heladas de crema (1 pieza, 90 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	16. Bebida láctea fermentada (1 pieza, 80 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	17. Leche evaporada (1/2 taza, 124 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	18. Queso cottage (3 cucharadas, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Un plato o ración de 100-150 g, excepto cuando se indique otra cantidad	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA					
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6		
		II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	19. Huevos de gallina (1 pieza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. Pollo o pavo CON piel (1 ración o pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. Pollo o pavo SIN piel (1 ración o pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Carne de res (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Carne de cerdo (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Carne de borrego (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. Carne de conejo (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26. Hígado (res, cerdo, pollo) (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
27. Otras vísceras (menudo, sesos, corazón, mollejas) (1 ración, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28. Jamón cocido (cerdo, pavo, etc) (1 rebanada, 30 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. Carnes procesadas (salami, chorizo, longaniza, rellena, moronga, mortadela, salchicha) (1 rebanada 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. Carne de hamburguesa (1, 50 g), albóndigas (2 piezas)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31. Tocino, bacon (1 rebanada, 16 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, mojarra (1 plato, pieza o ración, 125 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33. Pescado azul: sardinas, atún, salmón, huachinango, bagre (1 plato, pieza o ración, 130 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. Pescados salados: bacalao, charales (1 ración, 60 g en seco)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. Ostras, ostiones, almejas, mejillones y similares (6 piezas, 60 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36. Calamares, pulpo (1 ración, 200 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
37. Crustáceos: camarones, langostinos, etc. (4-5 piezas, 200 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
38. Pescados y mariscos enlatados en agua (sardinas, anchoas, atún, salmón) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
39. Pescados y mariscos enlatados en aceite (sardinas, anchoas medianas, atún, salmón) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
40. Pescados y mariscos preparados (entomatados, ensalada, otros) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
41. Chicharrón (1 ración, 12 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Iniciales		

Código		

Día		Mes		Año

Firma del encuestador							

Una ración de ½ taza en crudo, excepto cuando se indique otra cantidad		CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO											
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA						
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6			
III. VERDURAS Y HORTALIZAS	42. Acelgas, espinacas o verdolagas (1/2 taza, 25 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	43. Col, coliflor, brócoli (1/2 taza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	44. Lechuga, endivias (1/2 taza o 25 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	45. Tomate rojo o jitomate crudo o en salsa (1 pieza o 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	46. Zanahoria, calabaza (100 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	47. Ejotes (1/2 taza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	48. Berenjenas, calabacitas, pepinos (1/2 taza, 50 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	49. Pimientos, chile morrón (1/2 pieza, 35 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	50. Espárragos (3 piezas o 45 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	51. Otras verduras (alcachofa, puerro, cardo, apio) (1/2 taza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	52. Cebolla (1/4 taza, 30 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	53. Ajo (1/4 pieza, 1 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	54. Perejil, tomillo, laurel, orégano, cilantro, hierbabuena, menta, albahaca, etc. (una pizca de dos dedos, 6 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	55. Papas fritas comerciales, churritos, palomitas comerciales u otra fritura (1 bolsa, 50 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	56. Papas fritas caseras (1 ración, 150 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	57. Papas asadas o cocidas (1/2 taza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	58. Setas, champiñones (1/2 taza, 50 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	59. Tomate verde o tomatillo crudo o en salsa (5 piezas, 85 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	60. Chiles picantes: jalapeño, serrano, habanero, etc. (1 pieza o 30 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	61.. Nopales cocidos (1 pieza o 1/2 taza, 70 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	62. Limón (1 pieza, 10 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	63. Elote (1 pieza) o esquite (1 vasito, 55 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	64. Chayote cocido (1/2 taza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	65. Jícama (1/2 taza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	66. Chile poblano (1/2 pieza, 40 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	67. Flor de calabaza (3/4 de taza, 25 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA					
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6		
		IV. FRUTAS	68. Naranja, toronja, mandarinas (1 pieza, 76 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
69. Plátano (1 pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
70. Manzana o pera (1 pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
71. Fresas (6 piezas, 72 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
72. Cerezas, ciruelas (3 piezas, 90 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
73. Durazno, albaricoque, nectarina (1 pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
74. Sandía (1 rebanada, 200-250 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
75. Melón (1 rebanada, 200-250 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
76. Kiwi (1 pieza, 90 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
77. Uvas (15 piezas, 75 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
78. Aceitunas (3 piezas, 15 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
79. Frutas en Almíbar (2 piezas, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
80. Dátiles, higos secos, ciruelas pasas (2 piezas o 20g) pasas (10 piezas, 20 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
81. Almendras, cacahuates, avellanas, pistaches, piñones (30 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
82. Nueces (4 mitades o 1 1/2 cucharada o 10 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
83. Mango (1/2 pieza, 60 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
84. Guayaba (3 piezas, 120 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
85. Tuna (2 piezas, 140 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
86. Tamarindo (1 pieza o 20 g o 1 cucharada de pulpa)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
87. Papaya (1 taza, 140 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
88. Aguacate (1/3 pieza, 31 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
89. Limas (3 piezas, 147 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
90. Piña (1 rebanada, 84 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Iniciales		

Código		

Día	Mes	Año		

Firma del encuestador



CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Por favor, marque una única opción en función del número de veces que consuma cada alimento.

Para cada alimento, marque el recuadro que indica la frecuencia de consumo promedio durante el año pasado. Se trata de tener en cuenta también la variación de verano/invierno. Por ejemplo, si tomas helados 4 veces/semana solo durante los tres meses de verano, el uso promedio al año es 1/semana.		CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA				
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6	
I. LACTEOS	1. Leche entera (1 taza, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2. Leche semidescremada (1 taza, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3. Leche descremada (1 taza, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	4. Leche condensada (1 cucharada, 15 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	5. Nata o crema (1 cucharada, 15 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	6. Licuados de leche envasados o industrializados (1 vaso, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7. Yogurt entero (1 pieza, 125 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	8. Yogurt descremado (Light) (1 pieza, 125 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9. Petit suisse (tipo danonino) (1 pieza, 45 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	10. Requesón o jocoque (3 cucharadas, 35 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	11. Queso crema (1 porción o 25 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	12. Otros quesos: curados, semicurados (manchego, gouda, oaxaca, mozzarella) (1 rebanada, 30 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	13. Queso blanco o fresco (cabra, adobera, panela) (1 rebanada, 40 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	14. Natillas, flan, jericalla (1 pieza, 130 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	15. Helados (1 bola, 90g), paletas heladas de crema (1 pieza, 90 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	16. Bebida láctea fermentada (1 pieza, 80 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	17. Leche evaporada (1/2 taza, 124 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	18. Queso cottage (3 cucharadas, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Un plato o ración de 100-150 g, excepto cuando se indique otra cantidad		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA				
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6	
		II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	19. Huevos de gallina (1 pieza, 60 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. Pollo o pavo CON piel (1 ración o pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. Pollo o pavo SIN piel (1 ración o pieza, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Carne de res (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Carne de cerdo (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Carne de borrego (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. Carne de conejo (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26. Hígado (res, cerdo, pollo) (1 ración, 100 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
27. Otras vísceras (menudo, sesos, corazón, mollejas) (1 ración, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28. Jamón cocido (cerdo, pavo, etc) (1 rebanada, 30 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. Carnes procesadas (salami, chorizo, longaniza, rellena, moronga, mortadela, salchicha) (1 rebanada 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. Carne de hamburguesa (1, 50 g), albóndigas (2 piezas)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31. Tocino, bacon (1 rebanada, 16 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, mojarra (1 plato, pieza o ración, 125 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33. Pescado azul: sardinas, atún, salmón, huachinango, bagre (1 plato, pieza o ración, 130 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. Pescados salados: bacalao, charales (1 ración, 60 g en seco)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. Ostras, ostiones, almejas, mejillones y similares (6 piezas, 60 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36. Calamares, pulpo (1 ración, 200 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
37. Crustáceos: camarones, langostinos, etc. (4-5 piezas, 200 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
38. Pescados y mariscos enlatados en agua (sardinas, anchoas, atún, salmón) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
39. Pescados y mariscos enlatados en aceite (sardinas, anchoas medianas, atún, salmón) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
40. Pescados y mariscos preparados (entomatados, ensalada, otros) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
41. Chicharrón (1 ración, 12 g)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Iniciales		

Código			

Día	Mes	Año		

Firma del encuestador

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA				
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6	
VIII. MISCELÁNEA	133. Sopas y cremas de sobre (1 plato, 100 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	134. Mostaza (1 cucharadita, 5 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	135. Mayonesa comercial o aderezo cremoso (1 cucharadita, 5 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	136. Salsa de tomate frito, cátsup (1 cucharadita, 15 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	137. Salsas picantes embotellada (1 cucharadita, 9 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	138. Sal (1 pizca de dos dedos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	139. Mermeladas (1 cucharadita, 7 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	140. Azúcar (1 cucharadita, 3 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	141. Miel (1 cucharadita, 7 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	142. Chucherías: gomitas (4 piezas), paletas de caramelo (1 pieza), dulces comerciales (1 pieza), gelatina (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	143. Cacahuates, semillas, habas (salados, enchilados, garapiñados) (15 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	144. Cajeta (2 cucharaditas, 12 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	145. Piloncillo (10 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1-3	A LA SEMANA			AL DÍA				
				1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	+ 6	
IX. BEBIDAS	146. Bebidas carbonatadas con azúcar: refresco de cola, refresco de sabores, limonadas (1 botella, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	147. Bebidas carbonatadas bajas en calorías, bebidas light: refrescos light, agua mineral, etc. (1 botella, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	148. Jugo de naranja natural (1 vaso, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	149. Jugos naturales de otras frutas: toronja, mandarina, etc. (1 vaso, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	150. Jugos de frutas en botella o enlatados (1 botella, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	151. Café descafeinado express (1 taza, 50 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	152. Café express (1 taza, 50 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	153. Té (1 taza, 240 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	154. Vaso de vino rosado (1 copa, 100 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	155. Vaso de vino tinto joven, del año (1 copa, 100 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	156. Vaso de vino tinto añejo (1 copa, 100 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	157. Vaso de vino blanco (1 copa, 100 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	158. Cerveza (1 tarro, 330 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	159. Licores: anís, amaranto, café, etc. (1 copa, 50 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	160. Destilados: whisky, vodka, ginebra, coñac, tequila, mezcal, ron (1 copa, 50 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	161. Café soluble, café descafeinado (1 taza, 240 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	162. Agua natural (1 vaso, 240 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Iniciales		

Código		

Día	Mes	Año		

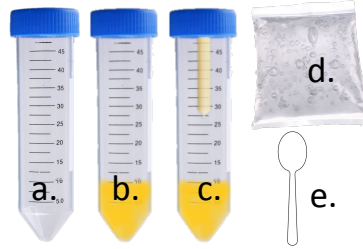
Firma del encuestador

4. Protocolo recolección muestra de heces.

PROTOCOLO PARA TOMA DE MUESTRA DE HECES

Kit para toma de muestra:

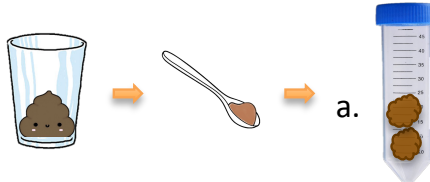
- 1 tubo vacío.
- 1 tubo con líquido.
- 1 tubo con líquido y con una vela en la tapa.
- Un gel refrigerante.
- Una palita para recolección de muestra.



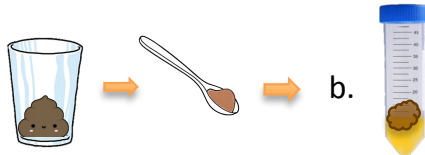
La muestra debe ser tomada de la primer evacuación del día con ayuda de un objeto desechable para evitar el contacto de la muestra con el agua del WC.



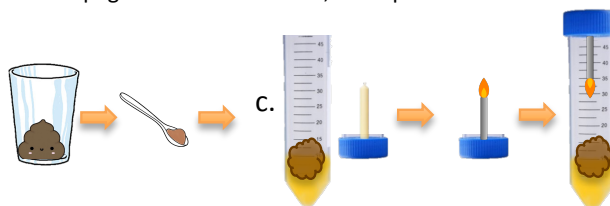
1. De la muestra obtenida se toma una porción con la palita y se coloca en el tubo a.



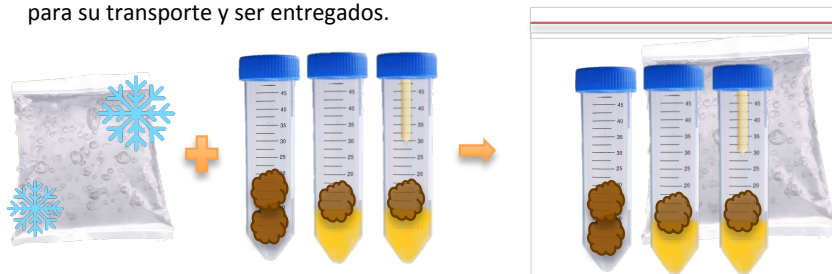
2. De la muestra obtenida se toma otra porción con la palita y se coloca en el tubo b.



3. De la muestra obtenida se toma otra porción con la palita y se coloca en el tubo c. (Tiene VELA en la tapita). Antes de cerrar el tubo se enciende la vela. Con la vela ENCENDIDA se cierra el tubo. (la vela debe apagarse dentro del tubo, no importa si cae cera sobre la muestra).



4. El gel refrigerante debe ser congelado horas antes de la recolección de muestra. Y colocarse dentro de la bolsa ziploc con los 3 tubos con muestra para su transporte y ser entregados.



5. Características de las dietas.

CONDICIONES DEL SIMULADOR ADAPTADO A NIÑOS (5 A 12 AÑOS).					
	Estómago	Intestino delgado	Colon Ascendente	Colon Transverso	Colon Descendente
Enzimas	Pepsinas	Pancreatina, Lipasas, Sales biliares.			
pH	2-2,5	6.4-7	5.5-6	5.5-6	6-6.5
Temperatura	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C
CARÁCTERÍSTICAS DEL ALIMENTO PARA EL SIMULADOR					
		Energía (Kcal).	%CHO	% Pr	% Lps
Dieta	Normopeso	2100	46%	15%	39%
	Obeso	3000	49%	14%	37%

6. Curvas de estandarización qPCR's.

Tabla S 1. Curvas de estandarización PRC's.

qPCR	Cepa/Minigen	bp	Operones (media)	R ²	Ecuación	Pendiente	Eficiencia
16s rRNA	<i>L. reuteri</i>	516	-	0.9872	-3.2753x + 16.815	-3.2753x	101.98%
Firmicutes	<i>L. reuteri</i>	129	7	0.9916	-2.8616x + 21.734	-2.8616	123.59%
Bacteroidetes	Minigen	126	7	0.9971	-3.4216x + 10.512	-3.4216	96.00%
Actinobacterias	<i>Bifidobacterium spp</i>	300	3.4	0.9913	-3.539x + 23.447	-3.539x	91.68%
Proteobacterias	<i>Escherichia coli</i>	155	4.7	0.9978	-3.2834x + 17.756	-3.2834x	101.63%

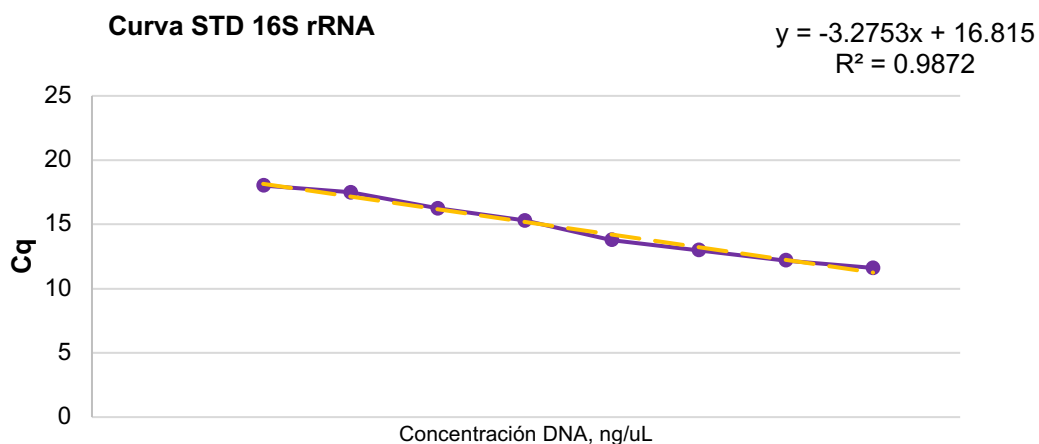


Figura S1. Curva de estandarización en la PCR en tiempo real para la cuantificación de microorganismos por el primer 16s rRNA.

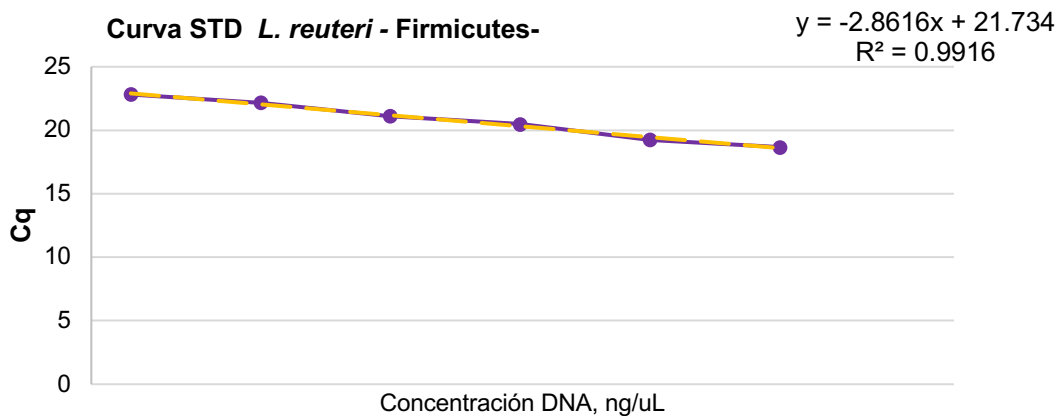


Figura S2. Curva de estandarización en la PCR en tiempo real para la cuantificación de microorganismos por el primer para Firmicutes.

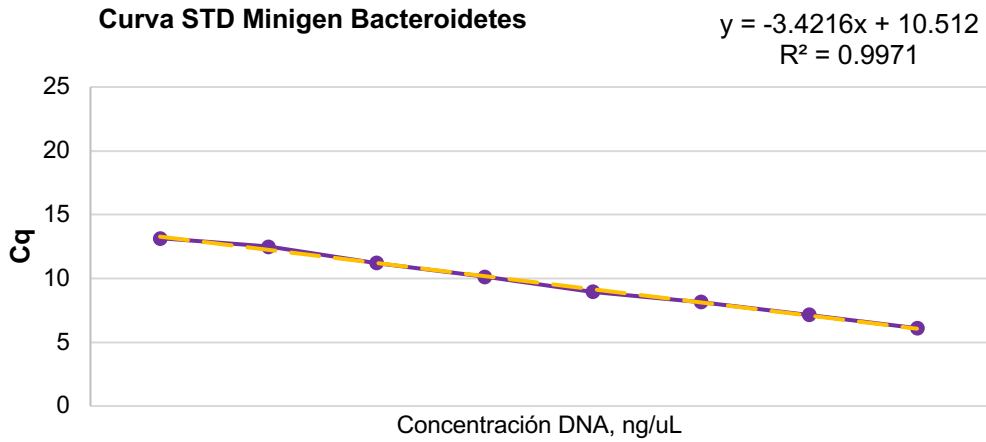


Figura S3. Curva de estandarización en la PCR en tiempo real para la cuantificación de microorganismos por el primer para Bacteroidetes.

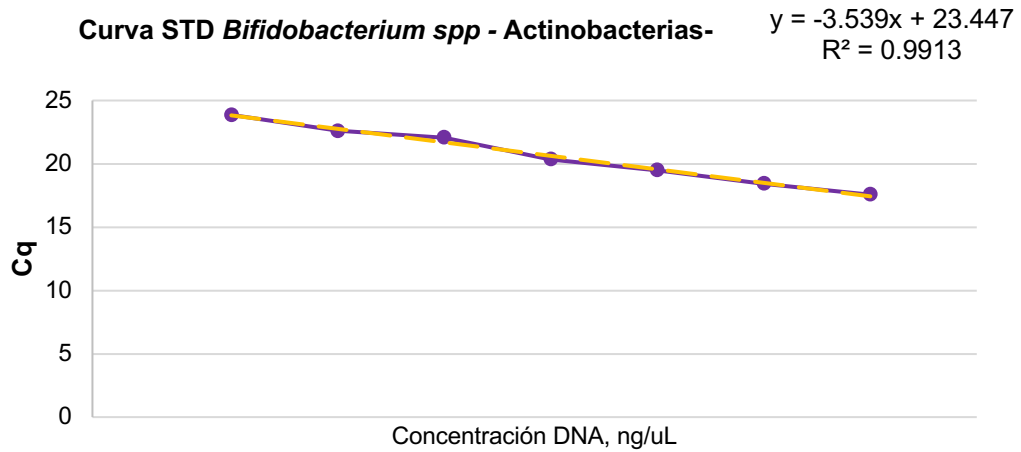


Figura S4. Curva de estandarización en la PCR en tiempo real para la cuantificación de microorganismos por el primer para Actinobacterias.

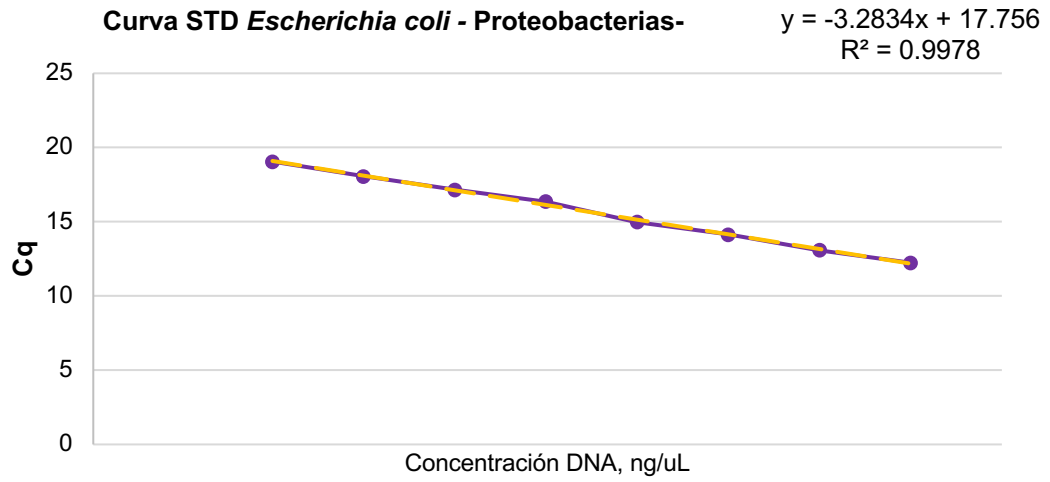


Figura S 5. Curva de estandarización en la PCR en tiempo real para la cuantificación de microorganismos por el primero para Proteobacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Canfora E. , E., Jocken, W., J., & Blaak E. , E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews ENDOCRINOLOGY*, 1-15.
2. Cummings, J., Pomare, E., Branch, W., Naylor, C., & MacFarlane, G. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 1221-1227.
3. Agnieszka gag-GoBdb, P. K.-G. (2013). Gut Microbiota, Microinflammation, Metabolic Profile, and Zonulin Concentration in Obese and Normal Weight Subjects . *International Journal of Endocrinology* , 1-9.
4. Agyemang-Yeboah, F. (2011). Health Benefits of Coconut (Cocos nucifera Linn.) Seeds and Coconut Consumption. En *uts & Seeds in Health and Disease Prevention*. (págs. 361-367). El Sevier.
5. Andreas Schwiertz, D. T. (2010). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity Journal*, 190-195.
6. Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., & Abu-Farha, M. (2016). The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes . *Lipids in Health and Disease*(15), 108-116.
7. Barengolts, E. (2016). Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in managment of obesity and prediabetes: review of randomized controlled trials. *Endocrine Practice*, 1224-1234.
8. Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, C., & Requena, T. (2014). Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI . *LWT - Food Science and Technology* (61), 283-289.
9. Bervoets, L., K. V., I. K., C. V., N. H., C. V., . . . V. V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathogens*, 5-10.

10. Bourriaud, C., Robins, R., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C., & Michel, C. (2005). Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *Journal of Applied Microbiology*, 201-212.
11. Dávila-Torres, J., González-Izquierdo, J., & Barrera-Cruz, A. (2015). Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 53(2), 240-249.
12. DebMandal, M., & Mandal, S. (Marzo de 2011). Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.
13. Emanuel E. Canfora, J. W. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 1-15.
14. Esquenazi, D., D. Wigg, M., M.F.S. Miranda, M., Rodrigues, H., Tostes, J., Rozental, S., . . . Alviano, C. (Octubre de 2002). Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from Cocos nucifera Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*.
15. Estrada Velasco, B. I., Cruz, M., García-Mena, J., Valladares Salgado, A., Peralta Romero, J., Guna Serrano, M., . . . Burguete-García, A. (2015). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos de alto contenido energético. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1074-1081.
16. Gabriela Macedo-Ojeda, B. V.-L.-S.-R.-U.-B. (2013). Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire to assess food groups and nutrient intake. *Nutrición Hospitalaria*, 2212-2220.
17. García-Mena, S. M.-M.-R.-R.-B.-E.-Z.-V. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 1337-1346.
18. Gibson, G. R. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotic. *Nature Reviews, Gastroenterology and Hepatology*, 491-502.

19. Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K., Wouters, R., Boever, P., Nollet, L., & Verstraete, W. (2000). Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 219-223.
20. Hernández-Moedano, A., Moreno-Ramos, E. F., Herrera-Rodríguez, S. E., & González-Ávila, M. (2014). Changes in Intestinal Microorganisms Influenced By Agave Fructans in a Digestive Tract Simulator. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4(5), 19-25.
21. Kalliomäki, M., M. C., S. S., & E. I. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *American Journal of Clinical Nutrition*, 534-538.
22. Kamal, D., Ravi, S., Teck, Y., Shiau, H., & Adinarayana, G. (12 de 2013). Anti-Inflammatory, Antibacterial and Analgesic Potential of *Cocos Nucifera* Linn. : A Review. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*.
23. Karlsson, C. L., J. Ö., J. X., G. M., S. A., & Jerneck, K. T. (2012). The Microbiota of the Gut in Preschool Children With Normal and Excessive Body Weight. *Obesity*, 2257-2261.
24. Kobozev, I., Reinoso Webb, C., Furr L., K., & Grisham, M. (2014). Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 122-133.
25. Krumbeck, J., Maldonado-Gomez, M., Ramer-Tait, A., & Hutkins, R. (2016). Prebiotics and synbiotics: Dietary strategies for improving gut health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 110-119.
26. MacFarlane, G. T., & MacFarlane, S. (2012). Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Macfarlane & Macfarlane: Journal of AOAC International*, 50-60.
27. Magrone, T., & Jirillo, E. (2015). Childhood obesity: immune response and nutritional approaches. *Frontiers in Immunology*, 1-13.

28. Markowiak, P., & Slizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 1-30.
29. Mendez Salazar, E. O., Ortiz-Lopez, M., Granados-Silvestre, M., Palacios-Gonzalez, B., & Menjivar, M. (2018). Altered Gut Microbiota and Compositional Changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican Undernourished and Obese Children. *Frontiers in Microbiology*, 1-11.
30. Molly, K., Vande, M., & Verstraete, W. (1993). Development of 5-steps multi-chamber reactors as a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 254-258.
31. Moschen, A. R., Wieser, V., & Tilg, H. (2012). Dietary Factors: Major Regulators of the Gut's Microbiota. *Gut and Liver*, 6(4), 411-416.
32. Mumme, K., & Stonehouse, W. (2015). Effects of Medium-Chain Triglycerides on Weight Loss and Body Composition: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *JOURNAL OF THE ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS*, 249-263.
33. Murugesan, S., Khemlal, N., Vadillo, C. H., Espitia, M. G., Sánchez, D. R., & Mena, J. G. (2017). Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
34. Murugesan, S., Martinez, M. U., Martinez, H. R., Galvan, F. R., Brito, C. M., M. R., . . . Mena, J. G. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European Journal of Clinical Microbiological Infect Disease*, 1337-1346.
35. Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 7577-7587.
36. Patel, R., & L. Du Pont, H. (2015). New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 108-121.
37. Payne, A., C. C., M. Z., P. M., S. S., & C. L. (2011). The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight

- children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutrition and Diabetes* , 2-8.
38. Payne, A., Chassard, C., Zimmermman, M., Müller, P., Stinca, S., & Lacroix, C. (2011). The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutrition and Diabetes*, 1-8.
 39. Poortmans J, B. N.-R. (2005). Estimation of total-body skeletal muscle mass in children and adolescents. *Med Science Sports Exercise*, 316-323.
 40. Qian, Y., Yang, X., Xu, S., Wu, C., Qin, N., Chen, S.-D., & Xiao, Q. (2018). Detection of Microbial 16S rRNA Gene in the Blood of Patients With Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 1-11.
 41. Rinaldi , S., Silva, D., Bello, F., Alviano, C., Alviano, D., Matheus, M., & Fernandes, P. (Febrero de 2009). Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). *Journal of Ethnopharmacology*.
 42. Rtveladze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sanchez Romero, L. M., Levy, D., Melendez, G., . . . Brown , M. (1 de Febrero de 2013). Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutrition*., 17(1), 233-239.
 43. Slaughter MH, L. T. (1988). Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Human Biology* , 709-723.
 44. Schulze, J., & Sonnenborn, U. (2009). Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents . *Deutsches Ärzteblatt International*, 837-842.
 45. Saéz-Lara, M. J., Robles-Sanchez, C., Ruíz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., & Gil , A. (2016). Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(928), 15.
 46. Safavi, M., Farajian, S., Kelishadi, R., Mirlohi, M., & Hashemipour, M. (2013). The effects of synbiotic supplementation on some cardio-metabolic risk

- factors in overweight and obese children: a randomized triple-masked controlled trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 687-693.
47. Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*(46), 58-61.
 48. Sanz Y, A., & Santacruz J, D. (25 de 05 de 2009). Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y las alteraciones del metabolismo. *Acta Pediátrica Española*, 67(9), 437-442.
 49. Sanz, Y., Collado, M., Haros, M., & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta pediátrica española*(62), 520-526.
 50. Secretaria de Salud. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino*. Cd. de México: Instituto Nacional de Salud Pública.
 51. Simmonds, M., Llewellyn, A., Owen, C., & Woolacott, N. (2015). Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 95-107.
 52. Skalkam, M. L., Wiese, M., Nielsen, D. S., & Van Zanten, G. (2016). In Vitro Screening and Evaluation of Synbiotics. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*, 477-486.
 53. Stoddard, S., Smith, B., Hein, R., Roller, B., & Schmidt, T. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, 593-598.
 54. Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (13 de Septiembre de 2012). Functional Interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489, 242-248.
 55. Tristano Bacchetti De Gregoris, N. A. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 351-356.
 56. Velasco, B. E., M. C., Mena, J. G., Salgado, A. V., Romero, J. P., Serrano, M. G., . . . Garcia, A. B. (2015). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutrición Hospitalaria*, 1074-1081.

57. Vyas, U., & Ranganathan, N. (2012). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond. *Gastroenterology Research and Practice*, 1-16.
58. Wang, X. G. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 367-373.