

Departamento de Farmacología y Pediatría

Programa de Doctorado Avances en Ciencias de la Salud del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén 2007-2008

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU RELACIÓN CON NIVELES DE GLUCEMIA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Memoria para optar al título de doctora por la Universidad de Málaga
Presentada por:

Isabel Leiva Gea

Realizado bajo la dirección de:

Dra. M^a Isabel Queipo Ortuño
Dr. Federico Soriguer Escofet

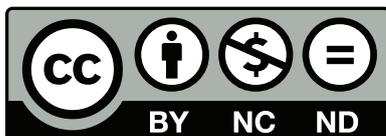
Tutor: Dr. Juan Pedro López-Siguero



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Isabel Leiva Gea

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Departamento de Farmacología y Pediatría

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

Dra. D^a M^a Isabel Queipo Ortuño (Investigadora Senior Miguel Servet) ,

Dr D. Federico Soriguer Escofet (Jefe de Servicio de Endocrinología de Hospital Civil hasta 18/08/2014) y **Dr D. Juan Pedro López Sigüero** (FEA Pediatra

Endocrinólogo de HMI Carlos Haya y Profesor Asociado de la Universidad de

Málaga) certifican que el trabajo de tesis elaborado por **D^a Isabel Leiva Gea**

titulado **CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOTA FECAL EN PACIENTES CON**

DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU RELACIÓN CON NIVELES DE GLUCEMIA Y

ESTRÉS OXIDATIVO, ha sido realizado bajo su supervisión y dirección y puesto que

cumple todos los requisitos legales, autorizan su defensa pública y obtención del

grado de doctora.

Málaga, Abril 2014

Dra. M^a I. Queipo Ortuño Dr. Federico Soriguer Escofet Dr. J.P. López Sigüero

(Directora)

(Co- Director)

(Tutor)

AGRADECIMIENTOS

A Federico Soriguer por encender la mecha de mi curiosidad, por enseñarme la investigación a través de la ventana del humanismo. Por su entusiasmo, generosidad y accesibilidad.

A Maribel Queipo por trasmitirme su método, por su incansable perfeccionismo y capacidad de trabajo.

Al equipo de investigación del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria por su entrega en recursos humanos y técnicos.

Al equipo de investigación del Servicio de Endocrinología del Hospital Civil, en especial a J.M. Gómez Zumaquero, Eduardo Fuentes y Gema Rojo por su desinteresada ayuda.

A la UGC de Pediatría del HMI Carlos Haya por confiar en mi y darme la oportunidad de trabajar con un equipo humano irrepetible en capacitación, dedicación y compañerismo.

A la Unidad de Endocrinología Pediátrica del HMI Carlos Haya. A Juan Pedro López-Siguero por contagiarme su interés científico y su compromiso con la diabetes. A M^a José Martínez Aedo, por su pragmática docencia y humilde genialidad.

A la UGC de Pediatría del Hospital Materno Infantil de Jaén, en especial a Jesús De la Cruz, por ser un ejemplo de entrega en la asistencia integral a los pacientes pediátricos.

A Chelo Arenas, educadora en diabetes, por enseñarme la vida mientras recogíamos los datos.

A los niños con Diabetes mellitus tipo 1 y sus familias por su ejemplo de lucha continua.

A mi familia, pilar fundamental de mi vida:

A mi padre, por mostrarme en tiempo record la valentía y el coraje en la adversidad. Por su ejemplo inmortal.

A mis madre, por enseñarnos a vivir en paz, por su permanente abnegación y su inquebrantable capacidad de ver el lado bueno de la vida.

A mis hijos, Eduardo y Ana por ser mi brújula.

A Antonio, por enseñarme a querer.

A mis hermanos Felipe, Ana, Antonio y Luis por su apoyo constante.

A mi abuela Antonia por hacernos creer que podemos cambiar la suerte.

INDICE

ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCIÓN	
1. Epidemiología de la Diabetes mellitus tipo 1	7
2. Patogenia de la Diabetes mellitus tipo 1	11
2.1 Inmunología de la mucosa intestinal	13
2.2 Función de la barrera intestinal	20
2.3 Evaluación de la microbiota intestinal	21
2.3.1 Composición de la microbiota intestinal	25
2.3.2 Establecimiento de la microbiota intestinal	28
2.3.3 Pérdida de la microbiota intestinal	29
3. Microbiota intestinal y Diabetes mellitus tipo 1.....	32
4. Microbiota intestinal y otras enfermedades metabólicas	35
5. Diabetes y Estrés oxidativo	38
5.1 Isoprostano	38
5.1.1 Isoprostano y Diabetes.....	41
5.2 NEFA.....	42
5.2.1 NEFA y Diabetes	43
5.3 Estrés oxidativo, microbiota intestinal y diabetes	44
FUNDAMENTO	45
OBJETIVO GENERAL	46
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
HIPÓTESIS	46

METODOLOGÍA	46
1. Sujetos de Estudio	46
2. Recogida de Muestras	47
3. Análisis de variables bioquímicas	48
4. Datos antropométricos.....	48
5. Extracción de ADN bacteriano.....	48
6. Determinación de la concentración y pureza de ácidos nucleicos	50
7. Análisis de microbiota fecal mediante PCR- DGGE (Electroforesis en gradiente desnaturalizante).....	51
8. Escisión, clonación y secuenciación de determinadas bandas de geles de DGGE.....	52
9. Cuantificación microbiana mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	53
10. Cuantificación de Acidos grasos no esterificados (NEFA)	55
11. Cuantificación de 8 isoprostano	57
RESULTADOS	59
1. Datos antropométricos y Bioquímicos	59
2. PCR-DGGE e Identificación de bandas bacterianas	60
3. Análisis cuantitativo de la microbiota intestinal.....	64
4. Relación entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles de glucemia en niños con DM1.....	65
5. Diferencias de estrés oxidativos entre niños diabéticos y sanos	66
DISCUSIÓN	66
BIBLIOGRAFÍA	77

ABREVIATURAS

BB-DP: Ratas predispuestas a diabetes

BB-DR : Ratas resistentes a diabetes

Cs: Coeficiente de similaridad

DGGE: Electroforesis en gel de acrilamida en gradiente desnaturalizante

GAD65: Anticuerpos ácido glutámico decarboxilasa

DM: Diabetes Mellitus

GIP: Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa

GLP-1: glucagon-like peptide 1

IAA: Anticuerpos anti insulín

IA2: Anticuerpos anti tiroxínfosfatasa

UPGMA: Método de grupos de pares no ponderados con la media aritmética

NOD: Ratones diabéticos no obesos

TCR: Receptores de células T

HLA: Antígeno leucocitario humano

Th1: T helpers 1

TLAI: Tejido linfoide asociado al intestino

RTT: Receptor de tipo Toll

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

STZ: Streptozotocina

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

FFA: Ácidos grasos libres

LPL: Lipoproteinlipasa

TG: Triglicéridos

iNOS: Óxido nítrico sintetasa

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGIA

La DM1 es un trastorno que resulta de un proceso autoinmune mediado por células T con diana en las células beta del páncreas. Es una de las enfermedades pediátricas más frecuentes en las dos primeras décadas de la vida y afecta a 430.000 niños en el mundo. Presenta una compleja patogénesis con formas variables de presentación y pronóstico (Mayer-Davis EJ y col, 2009).

Muchos de nuestros conocimientos sobre la epidemiología de la diabetes en gente joven ha sido generado por grandes esfuerzos colaborativos basados en registros de datos estandarizados tales como: Diabetes Mondiale (DiaMond) Project worldwide (DiaMond Project Group 2006) y The Epidemiology and Prevention of Diabetes (EURODIAB) study in Europe (EURODIAB ACE Study Group 2000). Estos registros mostraron que, mientras que al inicio del siglo XX la diabetes infantil era rara y rápidamente fatal, a finales de siglo, un incremento de la misma ha sido publicado en muchas partes del mundo (DERI Study Group 1990).

El mundo está experimentando un aumento de tendencia, como afirma Gale. (DiaMond Prroject Group 2006). Ya que la mayoría (EURODIAB ACE Study Group 2000, DERI Study Group 1990, Nystrom L y col 1990, Rewers M y col, 1987) aunque no todos (Kostraba JN y col, 1992, LaPorte RE y col, 1981) los registros basados en población mostraron un incremento de incidencia de DM1 a lo largo del tiempo. Algunas de las inconsistencias entre estos estudios podrían ser atribuidas a diferencias en la verificación a lo largo del tiempo o al inadecuado tamaño muestral para detectar cambios estadísticos significativos. Además, la mayoría de datos epidemiológicos están basados en criterios clínicos, incluyendo

diagnóstico de diabetes en inyección de insulina diaria. Así como, la mayoría de estudios en el rango de edad de población inferior a 14 años están limitados.

Un informe actualizado del proyecto DiaMond examinó la tendencia en incidencia desde 1990 a 1999 en 114 poblaciones de 57 países. Basándose en 43.013 casos de DM1 de un estudio de población de 84 millones de niños con menos de 14 años, la media anual de incidencia se incrementó a lo largo de este periodo de tiempo en un 2,8% (95% CI 2.4-3.2) con un ligero aumento en el último periodo de 5 años (3.4%; 95% CI 2.7-4.3) con respecto al periodo de los 5 primeros años (2.4%; 95% CI 1.3-3.4).

Similarmente, el estudio EURODIAB incluyó 20 poblaciones basadas en registros de 17 países, mostrando un 3,2% (95% CI 2.7-3.7) de incremento para el periodo 1989-1998 (Green A y col, 2001) y un incremento anual del 3.9% (95% CI 3.6-4.2) desde 1989-2003 (Patterson CC y col, 2009). Ambos estudios, DiaMond y EURODIAB usaron metodologías similares con la excepción que DiaMond recogió los datos de forma retrospectiva en algunos países, lo cual podría dar lugar a una infraestimación de incidencias. Igualmente, la verificación de finalización fue más variada en el DiaMond (35-100%) con una tasa de finalización más baja en Africa, América Central, América del Sur; aún así muchos países europeos en DiaMond tuvieron una tasa de verificación similar al EURODIAB (sobre el 90%).

Mientras que EEUU se mantiene aparte de otras zonas del mundo reportado una incidencia estable desde 1970 a 1990 (Libman IM y col, 2005). El estudio multicentrico para la investigación de la diabetes en jóvenes, *Multicentre Search for Diabetes in Youth Study* (SEARCH) publicó recientemente que la incidencia desde 2002-2005 de DM1 en jóvenes blancos no hispanos con ≤ 14 años fue de 27.5 /100.000 por año (Bell RA y col, 2009), una tasa que supera la incidencia predicha

para 2010 por datos previos del Allegheny County, Pennsylvania (Dokheel TM y col, 1993t). Además, usando datos del registro de Colorado de DMID y de SEARCH-Colorado la incidencia de DM1 ha mostrado tener un incremento del 2.3% (95% CI 1.6-3.1) por año en jóvenes ≤ 17 años de edad a lo largo de las 3 últimas décadas (Vehik y col, 2007).

Otros estudios han mostrado que la incidencia más alta en DM1 está ocurriendo entre los individuos más jóvenes (menores de 5 años). El EURODIAB (Patterson CC y col, 2009) estimó que las tasas de aumento en los 3 grupos de edad recogidos en los 20 registros fue del 5.4% (3.8-4.8) para niños de 0 a 4 años, 4.3% (3.8-4.8) para niños de 5 a 9 años y 2.9% (2.5-3.3) para niños de 10 a 14 años. En términos absolutos, el incremento fue similar en los grupos de edad de 0-4, 5-9 y 10-14 años pero el incremento relativo más rápido fue visto en el grupo de edad más joven. Basado en el modelo actual de las tasas de incremento, el estudio EURODIAB predice el doble de casos nuevos de DM1 en niños europeos entre 2005 y 2020. Similar a los datos de EURODIAB, en Colorado el incremento de incidencia fue más alto en el grupo de edad de 0-4 años (3.5%; 95% CI 2.1-4.9 por un año). Este patrón se inició a mitad de 1990 (Cutfield WS y col, 2008).

Un estudio austriaco no reportó cambios en incidencia en este grupo de edad desde 1979 a 1994 pero sí un aumento del 9,2% anual desde 1995 a 2005 (Schober E y col, 2008). Un patrón similar fue reportado en Colorado, notificando una incidencia estable desde 1978 a 1988 con un incrementeo del 60% entre 2002 a 2004. Otro estudio en Francia con incidencias estables desde 1988 a 1993 fue seguido de un rápido incremento desde 1994 a 1997 (Charkaluk ML y col, 2002). Un estudio español en la provincia de Málaga publicó una incidencia media de 16.3 (15.1-17.4) por 100.000 (rango 8,45-26,6) durante el periodo 1990-1994. El

análisis de regresión lineal de la tendencia mostró una incidencia anual de 3,15% (1,9-4,4) con un incremento anual de 3,8% (2,4-5,2). Este incremento de DM tipo 1 en Málaga es similar a la media aportada para otros países europeos (3,4%) (López-Siguero y col, 2002).

A pesar de la clara emergencia de la DM 1 como dato global, y los esfuerzos de investigación para explorar las causas, no tenemos factores genéticos o ambientales para explicar completamente el aumento de incidencia. El aumento de incidencia de DM1 en la pasada década ha sido demasiado rápido para ser atribuido completamente a un aumento en la susceptibilidad genética. Recientes estudios en Australia, Europa y EEUU han mostrado que la proporción de jóvenes con DM1 que tienen un HLA de alto riesgo (DR3/4) no ha cambiado, ya que la mayoría de individuos de reciente diagnóstico tienen un HLA de riesgo moderado (DR 3/3 y DR4/4) (Vehik K y col, 2008, Furlanos S y col, 2008).

Estudios epidemiológicos recientes han sugerido múltiples factores de riesgo tales como: la predisposición genética, la dieta, el peso, la estación de nacimiento, virus y la distribución geográfica, además de la autoinmunidad (Lernmark A y col 1998, Norris JM y col, 2003, Onkamo P y col, 1999, Padaiga Z y col, 1999, Pitkaniemi J y col, 2004, Rayfield EJ y col 1978, Ziegler AG y col 2003, Hyponen E y col 2000). De hecho, la presencia de anticuerpos frente a los islotes (ICA), anticuerpos frente a insulina (IAA), anticuerpos frente a la isoforma de 65-kDa del ácido glutámico decarboxilasa (GADA) y anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a insulinoma (IA-2A) son altamente predictivos de riesgo de DM1. Además, se cree que la seroconversión ocurre en la fase precoz de la vida (menos de 10 años de edad) (Colman PG y col, 2002), aunque puede acontecer a cualquier

edad (Orban T y col 2009). No obstante, mientras que estos anticuerpos han identificado a una larga proporción de caucásicos con DM1 (hasta en un 90%) (Wenlau JM y col 2008), algunos pacientes que presentan el fenotipo clínico de la enfermedad tienen negatividad para los principales anticuerpos conocidos (ICA, IA-2A, GADA o IAA). Recientemente, se han descrito anticuerpos frente el transportador de Zn 8 (ZnT8), una proteína encargada de proveer zinc para la maduración y almacenamiento de insulina en sujetos con DM1, mostrando una predicción adicional de riesgo (Chimienti F y col 2004). Además, múltiples modificaciones en los hábitos de vida y factores ambientales tales como cambios en la dieta, patrones de actividad física, infecciones en etapas precoces, cambios climáticos, vacunación y uso de fármacos, están posiblemente asociados con el aumento de riesgo global. Algunos autores argumentan que el aumento en la incidencia de la enfermedad observada en jóvenes es el resultado de una aceleración en el proceso de la enfermedad debido a factores ambientales, dando lugar a debuts en edades más precoces, más que a un aumento del riesgo a lo largo de la vida. El hecho que la autoinmunidad, un precursor de DM1, pueda aparecer en los 2 primeros años de vida, provee una fuerte evidencia de los factores que influyen en etapas precoces podrían jugar un importante papel en el inicio del trastorno.

2. PATOGENIA

La DM tipo 1, también conocida como diabetes insulino dependiente, es un trastorno autoinmune organoespecífico. Se caracteriza por una destrucción selectiva de células beta secretoras de insulina asociadas a una infiltración linfocitaria de los islotes de langerhans pancreáticos.

La DM tipo 1 cursa en dos estadios: Una fase oculta denominada insulinitis donde una población mixta de leucocitos invade los islotes provocando una destrucción específica de las células beta y una fase manifiesta cuando gran parte de las células beta han sido destruidas o dañadas y la cantidad de insulina no es suficiente para regular los niveles de glucosa en sangre.

Aún no se conocen los mecanismos que inician la destrucción, solo tenemos un conocimiento rudimentario de los factores que regulan su progresión, y tenemos un punto de vista confuso del mecanismo efector final.

Nos enfrentamos con las dificultades de localizar estos triggers en humanos. Muchos investigadores lo han hecho en modelos animales, en particular en ratones diabéticos no obesos (NOD) de líneas transgénicas de TCR (receptores de células T) (Katz JD y col 2000, Verdaguer J y col, 1996).

Desarrollados a finales de 1970, los ratones NOD son el modelo animal más frecuentemente usado en DM1. La enfermedad se desarrolla espontáneamente en estos ratones compartiendo características con su curso en humanos. El curso patológico, se inicia con una insulinitis que empieza entre las 4 y 6 semanas de edad, pero la diabetes no se manifiesta hasta las 15-30 semanas en la mayoría de colonias de ratones NOD. La diabetes en estos modelos animales, al igual que ocurre en humanos es un proceso mediado fundamentalmente por linfocitos T, aunque también intervengan otras células. Además, esta enfermedad tanto en humanos como en roedores está bajo un control poligénico complejo donde la mayor contribución corre a cargo del HLA (antígeno leucocitario humano) y el CMH (complejo mayor de histocompatibilidad). Estudios genéticos también han revelado puntos en común en otras vías inmunológicas como la Il-2 (Lee KH y col, 2001).

En la patogénesis de la DM1 en ratones NOD se han implicado múltiples células como células T, células B, células Natural killers, macrófagos y células dendríticas. Aún así, una batería de estudios ha establecido claramente que los linfocitos T tienen un papel central en la iniciación y progresión de la enfermedad tanto en humanos como roedores. De hecho, la enfermedad no se desarrolla en ratones NOD atímicos genéticamente o con linfopenia T o en ratones timectomizados al nacimiento. Así mismo, la diabetes puede ser transferida tras inyecciones de células T de donantes diabéticos en ratones sanos. A nivel histológico los pacientes diabéticos exhiben una infiltración de células T en el islote. Está bien reconocido que los linfocitos T CD4+ y CD8+ son poblaciones efectoras importantes en el desarrollo de diabetes en ratones NOD predispuestos a desarrollar diabetes. Las células T CD4+ son las invasoras dominantes en los islotes con un papel importante en la progresión, mientras que los CD8+ son requeridos para iniciar la insulinitis y para la destrucción de células β . El interferón γ producido por las células T helpers 1 (Th1) es también un efector crucial.

No obstante, como en otras enfermedades autoinmunes, la baja concordancia entre gemelos monozigotos (<40%) sostiene la importancia de la influencia de factores no genéticos en la iniciación y/o progresión de esta enfermedad. En el caso de la DM tipo 1 se han descrito un trió de factores asociados con su desarrollo como son: la alteración de la respuesta inmune, la función de la barrera mucosa intestinal, y la microbiota intestinal (Vaarala O y col , 2008).

2.1 INMUNOLOGÍA DE LA MUCOSA INTESTINAL

El tracto gastrointestinal constituye una interfase muy sensible para el contacto y comunicación entre el individuo y el medio externo. Las interacciones entre los microorganismos, el epitelio y los tejidos linfoides intestinales remodelan

constantemente los mecanismos locales y sistémicos de la inmunidad (Fagarasan S y col, 2002).

El epitelio intestinal es la superficie mucosa más extensa del cuerpo humano y proporciona una superficie de interfase entre el medio externo y el hospedador. Sus delicadas estructuras anatómicas y funcionales y la coordinación de las funciones digestivas, absortivas, neuroendocrinas, inmunológicas y de motilidad testimonian la complejidad del sistema gastrointestinal. Una importante función del sistema gastrointestinal es la regulación selectiva de células, microorganismos y el transporte de macromoléculas entre la luz intestinal y la submucosa. En cada nivel, la pared del intestino puede ser dividida en cuatro capas básicas: la serosa, la muscularis externa, la submucosa y la mucosa.

Dos poblaciones de células en el intestino poseen funciones únicas: las células enteroendocrinas y el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI). El TLAI se compone de varias células especializadas, incluyendo las placas de Peyer, las células M y los linfocitos intraepiteliales, que desempeñan papeles clave en la defensa del hospedador (Figura 1) (Nagler-Anderson C y col 2001).

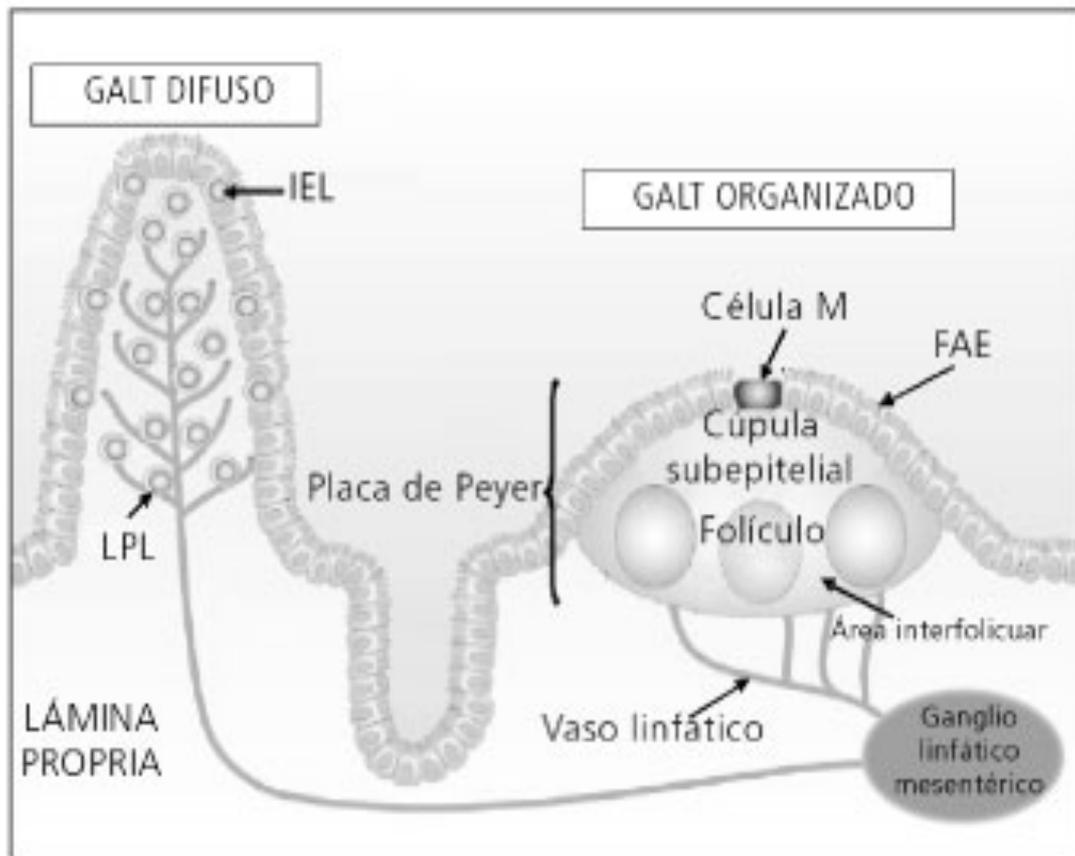


Figura 1. Estructura del tejido linfoide asociado al intestino.

La colonización bacteriana intestinal es necesaria para el desarrollo estructural y funcional del TLAI. Una de las funciones más importantes del TLAI es la distinción entre los microorganismos comensales y los microorganismos patógenos (Lanning DK y col, 2005).

Las células epiteliales llegan a ser participantes activos en la inmunidad mucosa a través de la expresión de receptores de tipo Toll (RTT), que inducen la transcripción de respuestas inmunitarias e inflamatorias (Cobrin GM y col, 2005). El procesamiento de estos antígenos bacterianos fomenta el desarrollo de linfocitos T de memoria que integran la mayoría de los linfocitos T en los tejidos linfoides intestinales. La disposición estructural de las células epiteliales e

inmunitarias intestinales justo por debajo de la mucosa epitelial es un testimonio de su compleja respuesta coordinada a microorganismos y macromoléculas presentes en la luz intestinal. De hecho, el tránsito paracelular de macromoléculas, tanto en circunstancias fisiológicas como patológicas, está salvaguardado por TLAI, el cual actúa como sistema de contención evitando que antígenos intestinales potencialmente nocivos accedan a la circulación sistémica a través de un proceso en el que participa la secreción de Ig A polimérica y la inducción de linfocitos T reguladores.

El TLAI se compone de zonas inductivas (placas de Peyer) y zonas efectoras (células intraepiteliales y lámina propia). También se han incluido recientemente los folículos linfoides aislados, que son similares a las placas de Peyer en cuanto a su composición celular y localización en el intestino distal y dependen de la interacción de la linfoxina con el receptor de linfoxina β para la formación de estas estructuras (Figura 2) (Lorenz RG y col 2003).

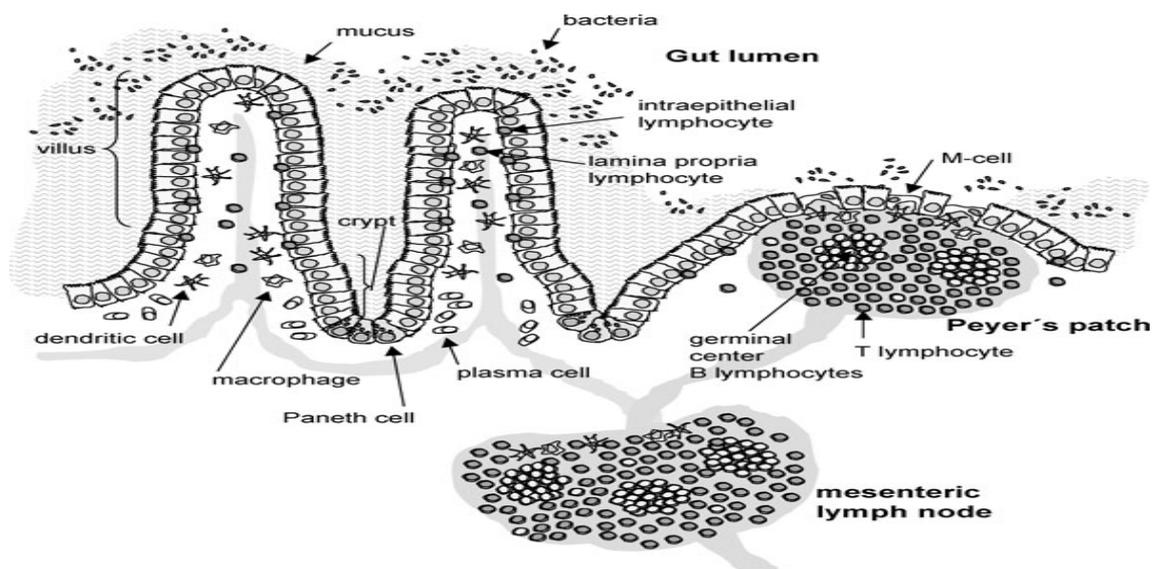


Figura 2. Estructura de los folículos linfoides aislados.

En la reactividad inmunológica intestinal otro factor importante es el complejo de histocompatibilidad principal. Los genes HLA de clases I y II se localizan en el complejo de histocompatibilidad principal en el cromosoma 6. Estos genes codifican para glicoproteínas que enlazan péptidos y este complejo HLA-péptido es reconocido por ciertos receptores de linfocitos T en la mucosa intestinal (Bjorkman PJ y col, 1987). Los alelos HLA específicos de clase I o II se asocian al desarrollo de un mínimo de cincuenta enfermedades.

El equilibrio entre inmunidad y tolerancia es esencial para un intestino sano, dado que respuestas inmunitarias anormales o inapropiadas pueden dar lugar a enfermedades inflamatorias. Las células M presentadoras de antígenos captan y transportan eficientemente diversos microorganismos y presentan antígenos (Jang MH y col, 2004). En consecuencia se ha propuesto que los folículos linfoides aislados son zonas locales para interacciones linfocíticas, de antígenos y de células presentadoras de antígenos. Además de las células M, las células dendríticas también captan antígenos presentes en la luz intestinal por transmisión de las dendritas a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales, al tiempo que mantienen la integridad de la barrera (Bilsborough J y col, 2004). Y seguidamente migran a otras zonas como los ganglios linfáticos mesentéricos (Mellman I y col, 2001).

Se dispone de datos a favor de que las células dendríticas presentadoras de antígenos son educadas por los linfocitos T de memoria e inducen subsiguientemente linfocitos T naturales, sustentando de este modo el papel de las células dendríticas en el acoplamiento de respuestas inmunitarias congénitas y adaptativas, que influyen sobre la permeabilidad intestinal (Alpan O y col, 2004).

El reconocimiento de antígenos por las células dendríticas desencadena una familia de receptores de reconocimiento. Los receptores de tipo Toll (RTT) son los primeros receptores que participan en la discriminación entre propio y no propio. Los RTT dirigen las respuestas inmunitarias activando los fenómenos de transmisión de señales que conducen a la expresión de factores, como las citocinas y las quimiocinas que reclutan y regulan las células inmunitarias e inflamatorias que inician o intensifican las respuestas inmunitarias del hospedador (Akira S y col, 2004).

La homeostasis intestinal está coordinada por respuestas de diferentes tipos celulares, incluyendo células tanto inmunitarias como no inmunitarias. Los macrófagos, leucocitos y mastocitos de la mucosa elaboran un cierto número de mediadores que alteran la función intestinal. Los mastocitos parecen desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias adaptativas liberando mediadores preformados como histamina y serotonina, así como mediadores recién sintetizados como los leucotrienos, prostaglandinas, el factor activador de plaquetas, el Il-4 y TNF α , muchos de los cuales producen un efecto sobre la permeabilidad intestinal (Xavier RJ y col, 2007).

Las estructuras organizadas están cubiertas por epitelio especializado que transporta microorganismos o estructuras antigénicas desde la luz hasta el tejido linfóide subyacente. Los antígenos procesados se presentan a linfocitos T y se activa la expansión de los clones más afines al antígeno. La expansión clonal de células T da lugar a linfocitos helper (células Th) de distinto fenotipo Th1, Th2, o T reguladoras (Th3, Tr1 o células CD4-CD25). Las células T reguladoras juegan un papel central en la inmunotolerancia porque segregan citoquinas reguladoras de carácter antiinflamatorio (Il-10, TGF- β), en respuesta a antígenos que se reconocen

como comensales y no patógenos. En condiciones normales, la mucosa intestinal contiene pocas células T activadas de fenotipo Th1 y predominan las células T reguladoras. Este contexto de inmunotolerancia permite la exposición continua a una carga antigénica abrumadora de bacterias de la flora y comida (Figura 3).

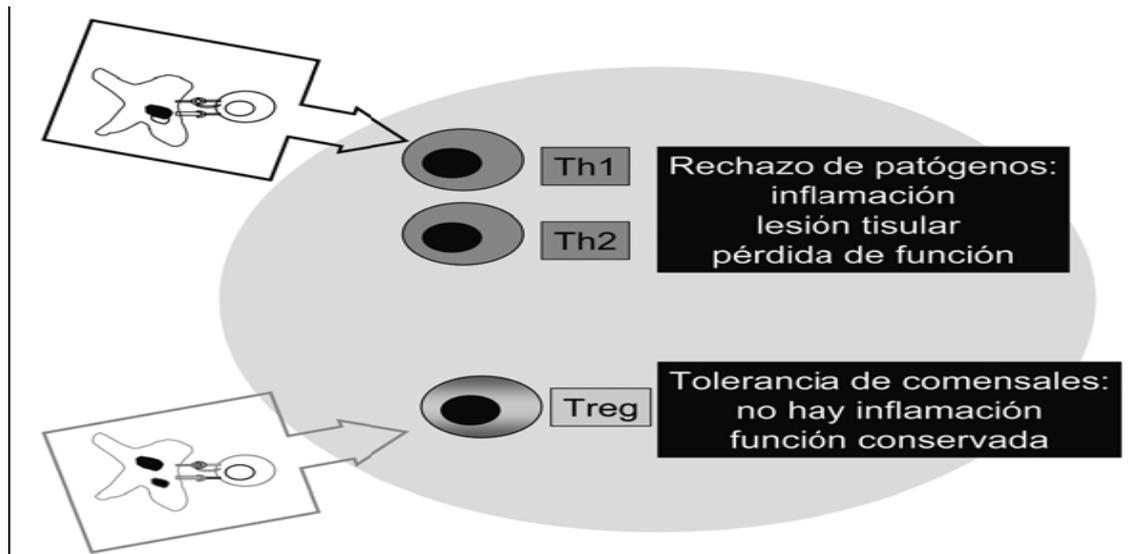


Figura 3. Esquema de inflamación e inmunomodulación.

La interacción de la luz intestinal con el mundo microbiano parece ser un mecanismo primario en la conformación del estado de inmunotolerancia activa mediado por células T reguladoras (Aderem A y col, 2000). Algunas anomalías en el desarrollo del sistema inmune podrían deberse a defectos en la interacción de la microbiota con los compartimentos inmuno-competentes de la mucosa. Estos hallazgos transforman a las bacterias comensales, consideradas hasta el momento como testigos inocentes que habitan en el huésped, en jugadores activos en el modelado del sistema inmune humano.

2.2 FUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL

El paradigma clásico de la patogénesis autoinmune que implica la constitución genética específica y la exposición a desencadenantes ambientales ha sido puesto a prueba recientemente por la incorporación de la pérdida de la función de barrera intestinal. Parece que la predisposición genética, la comunicación errónea entre la inmunidad congénita y adaptativa, la exposición a una microbiota específica y la pérdida de función de la barrera intestinal consecutiva a una disfunción de la unión estrecha intercelular son en su totalidad componentes de la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunidad.

La ruta paracelular es la vía predominante del flujo pasivo de solutos a través de la barrera intestinal y su estado funcional depende de la regulación de la unión estrecha intercelular, también conocida como zónula ocludens (ZO). La unión estrecha representa la barrera más importante en esta vía paracelular, con resistencia eléctrica de los tejidos epiteliales que depende del número y la complejidad de los filamentos de proteínas transmembránicas dentro de la unión estrecha. Las uniones estrechas consideradas hasta el momento como estructuras estáticas, son en realidad dinámicas y se adaptan fácilmente a diversas circunstancias de desarrollo, fisiológicas y patológicas.

El descubrimiento de la zonulina, una molécula que modula reversiblemente la permeabilidad de las uniones estrechas, nos da información de cómo es regulada la función de la barrera intestinal en la salud y la enfermedad (Wang W y col, 2000).

El papel fisiológico del sistema de la zonulina sigue sin estar aclarado, pero se postula que participa en la regulación de las uniones estrechas siendo responsable del movimiento de líquidos, macromoléculas y leucocitos entre el torrente sanguíneo, la luz intestinal y viceversa. Otra función fisiológica de la zonulina

intestinal es la protección frente a la colonización con microorganismos del intestino proximal (inmunidad congénita).

Dada la complejidad, tanto de los fenómenos de transmisión de señales celulares como de las estructuras intracelulares implicadas en el sistema de la zonulina, no es sorprendente que su activación por la presencia de determinadas bacterias en el intestino pueda ser el desencadenante de diversos trastornos de mediación inmunitaria, incluyendo enfermedades autoinmunes (Sapone A y col, 2006).

2.3 EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

El cuerpo humano es asilo no sólo de células humanas sino que albergamos al menos 100 billones de células microbianas (Whitman y col, 1998) y mil billones de virus (Haynes y col, 2011). Los microorganismos que residen en el cuerpo humano constituyen nuestra microbiota, y sus genes son conocidos como microbioma. Los componentes de la microbiota han mostrado que interactúan entre ellos y con el huésped. La microbiota desempeña un papel muy importante en la salud y la enfermedad en humanos de hecho, a veces se han referido a ella como “el órgano olvidado” (O’Hara y col, 2006).

El intestino humano alberga una microbiota que desempeña un papel fundamental en el bienestar de su huésped. La microbiota del intestino está implicada en una variedad de funciones metabólicas como la fermentación y absorción de carbohidratos sin digerir y la absorción de electrolitos y minerales (Gill y col, 2006), pero también a nivel del proceso digestivo influye en la motilidad digestiva y en la síntesis de algunos micronutrientes. Otro aspecto importante es que la microbiota intestinal interactúa con el sistema inmunitario, proporcionando señales para promover la maduración de las células inmunitarias y el desarrollo normal de las funciones inmunitarias, como se ha comentado anteriormente

(Chow y col, 2010). También contribuye de forma importante a la destrucción de toxinas y carcinógenos evitando la colonización por bacterias patógenas.

Los microbios colonizan todas las superficies del cuerpo humano que están expuestas al ambiente, la mayoría de los cuales residen en el tracto intestinal, aunque se han encontrado también en boca, vagina y piel. Las comunidades bacterianas en un sitio determinado del cuerpo tienen más similitud entre sujetos diferentes que en el mismo individuo en diferentes localizaciones corporales, es decir, existe más similitud entre las comunidades bacterianas orales de distintos individuos que entre las comunidades bacterianas de la piel y de la boca de un solo individuo (Costello y col, 2009), sin embargo también existe una considerable variabilidad interindividual (Robinson y col, 2010).

El componente bacteriano de la microbiota ha sido tema de estudio intensivo en los últimos años, conducido por proyectos a gran escala como el Proyecto del Microbioma Humano (Peterson J y col, 2009, Turnbaugh y col, 2007) y el MetaHIT (Qin J y col, 2010). Gran parte de la información sobre la diversidad del ecosistema intestinal sólo ha podido obtenerse durante la última década con la introducción de los métodos independientes de cultivo, que fijan como objetivo las secuencias de nucleótidos de la subunidad ribosómica del ARNr 16S, en el caso de bacterias. El empleo de estas metodologías ha revelado una complejidad de las poblaciones bacterianas muy superior a la que se había estimado inicialmente basándose en el cultivo bacteriológico clásico.

Estudios recientes dan a entender que el número de especies bacterianas contenidas en el tubo GI podría oscilar entre 15.000 y 36.000, según el método de clasificación (Frank DN y col, 2007). En consecuencia, resulta crucial estudiar la microbiota intestinal desde un punto de vista ecológico. El aislamiento de bacterias

en cultivos puros no puede abordar cuestiones referentes a la estructura, la función, la dinámica y la interacción de la comunidad. El uso generalizado del ARNr 16S como biomarcador para estudiar las poblaciones bacterianas se debe a propiedades intrínsecas de la molécula del ARN: 1) Aparece en todos los microorganismos vivos, 2) Posee un elevado grado de constancia funcional, 3) El cambio en su secuencia es un indicador de relación filogenética, 4) Puede ser secuenciado directamente utilizando iniciadores dirigidos a regiones conservadas, 5) En las bases de datos públicas se dispone de más de 300.000 secuencias no redundantes.

Los métodos basados en el ARNr 16S para estudiar la ecología microbiana pueden dividirse en dos amplios grupos en términos de su grado de resolución. Los de alta resolución, pueden utilizarse para generar un inventario de especies dominantes mientras que los de baja resolución pueden proporcionar información cuantitativa de grupos bacterianos seleccionados dentro de la microbiota dominante de un perfil dinámico de la población microbiana.

Los métodos de configuración, como la reacción de cadena de polimerasas (PCR) acoplada a electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, han sido muy útiles para comparar poblaciones diferentes. Estas herramientas han sido utilizadas con éxito para monitorizar desplazamientos de comunidades bacterianas, no solo en el tubo gastrointestinal de humanos, sino también en ecosistema marino o de suelo (Snart J y col, 2006). Aunque estos métodos no son cuantitativos, podría adaptarse para proporcionar resultados cuantitativos por inclusión de un estándar interno de concentración de ADN conocido o una combinación de PCR cuantitativa con electroforesis capilar (Lim ELm Tomita AV 2001).

Por otro lado, la PCR cuantitativa en tiempo real ha sido muy útil para la cuantificación de especies subdominantes, es decir, las que aparecen en cantidades reducidas. Alternativamente, un método atractivo que no precisa la extracción de ácidos nucleicos y que ha sido utilizado frecuentemente para analizar muestras bacterianas complejas es la hibridación fluorescente in situ en combinación con la microscopía óptica epifluorescente o la flujocitometría. Las sondas se marcan con un colorante fluorescente y se dirigen a los ribosomas dentro de las células. Cada célula hibridada emitirá luz fluorescente y podría detectarse y recontarse mediante microscopía automatizada o incluso seleccionarse con un citómetro de flujo.

Con la introducción de tecnologías de pirosecuenciación 454 puede obtenerse una información taxonómica de alta fidelidad que permite la investigación simultánea de varias muestras por pasada. Esta potente tecnología puede suministrar información taxonómica a costes menores por muestra (Anderson AF y col, 2008). Investigaciones sobre el microbioma intestinal, que utilizan principalmente ARNr 16S y la secuenciación de genomas completos (WGS- Whole-genome shotgun) (Turnbaugh PJ y col, 2009) han proporcionado una visión general de comunidades microbianas comensales y de su capacidad funcional. Por ejemplo, un catálogo de 3.3 millones de genes microbianos del intestino humano se estableció en 2010 (Qin J y col, 2010) y cabe mencionar, que un catálogo más amplio de microorganismos intestinales y sus genes fue publicado más tarde (Qin J y col, 2012). Estos estudios han demostrado una gran variabilidad en la composición de la microbiota en individuos sanos, encontrándose incluso que los gemelos comparten menos del 50 % de sus taxones bacterianos a nivel de especie (Turnbaugh, P.J 2010), sin embargo este hecho no quiere decir que la genética no

desempeñe un papel en el establecimiento y conformación de la microbiota intestinal, ya que se ha demostrado que la composición de la comunidad bacteriana está influenciada por locus genómicos específicos del huésped (Benson AK y col, 2010, Koenig JE y col, 2011)

2.3.1 COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Los estudios metagenómicos han establecido que a pesar de la extensa variabilidad interpersonal, hay unos grupos de bacterias que comparten funcionalidades (Burke C y col, 2011, Turnbaugh, P y col, 2009). Las principales bacterias corresponden a 3 grandes filos: *Firmicutes* (Gram-positivos), *Bacteroidetes* (Gram-negativos) y *Actinobacterias* (Gram-positivos). Los *Firmicutes* son el filo que se encuentra en mayor proporción (60 %), incluye más de 200 géneros y los más importantes son los *Micoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium* y a la vez en cada género pueden existir diferentes especies, los *Bacteroidetes* y *Actinobacterias* suponen el 10 % cada uno de la microbiota intestinal, el resto lo constituyen más de 10 familias minoritarias. En total hay más 1000 especies diferentes de bacterias en nuestro intestino (Eckburg PB y col, 2005).

Los hongos y *Archaea* pueden ser también residentes pero comprenden menos del 1% de la población total. Lo que ilustra que el ecosistema intestinal está dominado claramente por las bacterias, en particular las correspondientes a los tipos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

Más de 17 familias bacterianas engloban a 400-500 especies bacterianas diferentes que pueden ser encontradas en el intestino adulto humano (Yan F y col, 2004).

El intestino humano es el habitat de una población extensa y diversa de microbiota El genoma bacteriano colectivo de la microbiota humana codifica una cifra estimada en 2 a

4 millones de genes, sobrepasando el genoma humano en un factor de 140 veces (Hao WL y col, 2004).

Por lo tanto la adquisición de la microbiota intestinal en el momento del nacimiento a partir de la microbiota de la madre puede considerarse como la herencia de un genoma paralelo.

Han sido demostradas variaciones individuales en un nivel taxonómico más profundo, como las variaciones en las densidades de población y la diversidad de las especies bacterianas en todo el tubo digestivo. La boca y la cavidad oral presentan arquitecturas complejas al contrario que el resto del sistema GI, que es principalmente tubular. La presencia de ácidos biliares en el duodeno o las condiciones ácidas del estómago generan una presión de selección ambiental de los microorganismos locales. En la tabla 1 se resumen los géneros más abundantes en cada uno de los tramos del tubo digestivo.

Tabla 1. Microorganismos predominantes en el tracto gastrointestinal humano

Estómago	10 ⁴ UFC/g de contenido intestinal	<i>Helicobacter pylori</i> (Filo: <i>Proteobacteria</i>) <i>Lactobacillus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Streptococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Duodeno	10 ³ -10 ⁴ UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: <i>Bacteroidetes</i>) <i>Lactobacillus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Streptococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Staphylococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Yeyuno	10 ⁵ -10 ⁷ UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: <i>Bacteroidetes</i>) <i>Lactobacillus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Streptococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Bacillus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Ileon	10 ⁷ -10 ⁸ UFC/g de contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: <i>Bacteroidetes</i>) <i>Clostridium</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Enterobacteriaceae</i> (Filo: <i>Proteobacteria</i>) <i>Enterococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Lactobacillus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Veillonella</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Colon	10 ¹⁰ -10 ¹¹ UFC/g contenido intesti	<i>Bacteroides</i> (Filo: <i>Bacteroidetes</i>) <i>Bacillus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Bifidobacterium</i> (Filo: <i>Actinobacteri</i>) <i>Clostridium</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Enterococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Eubacterium</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Fusobacterium</i> (Filo: <i>Fusobacteria</i>) <i>Peptostreptococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Ruminococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Streptococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>)

2.3.2. ESTABLECIMIENTO DE LA MICROBIOTA

Una compleja y amplia comunidad de microorganismos habitan en simbiosis en el tracto gastrointestinal. Esta microbiota puede ser modulada por factores dietéticos y su interacción con el huésped desde los primeros días de vida.

En nuestra microbiota se producen cambios importantes desde el nacimiento a la edad adulta. El tracto gastrointestinal del feto es estéril hasta el nacimiento, después del cual el recién nacido comienza a ser colonizado. Los niños están expuestos a una plétora de microbios de diferentes ambientes inmediatamente después del nacimiento, y son colonizados rápidamente por los microbios en su primer encuentro, bien desde la vagina de la madre o desde los microbios de la piel, dependiendo del tipo de parto (Adlerberth, I y col, 2009).

La exposición a la microbiota materna, vaginal y fecal durante el parto ejerce un impacto importante sobre la colonización temprana del lactante. (Penders J y col, 2006)

Los bebés que nacen por vía vaginal tienen comunidades parecidas a las encontradas en la microbiota vaginal de sus madres. En contraste, aquellos nacidos por cesárea presentan una microbiota que se parece más al entorno circundante hospitalario con niveles menores de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y niveles más elevados de *Clostridium* (Palmer C y col, 2007), en definitiva poseen una microbiota característica de la piel y predominada por taxones como *Staphylococcus* y *Propionibacterium* spp. (Dominguez-Bello, M y col, 2010).

Algunos resultados permiten plantear la hipótesis de que el tipo de parto influencia las funciones inmunitarias durante el primer año de vida a través del desarrollo de la microbiota intestinal, ya que encontramos bebés nacidos por cesárea que tienen un bajo recuento de células bacterianas en muestras fecales y un alto número de células secretoras de anticuerpos (Huurre A y col, 2008)

En los primeros días después del nacimiento predominan las *Proteobacterias* y las *Actinobacterias* pero la microbiota intestinal varía considerablemente durante los primeros meses de vida. En varios estudios dependientes e independientes de cultivos se ha observado que en los primeros meses de vida predominan las *Bifidobacterias* en el intestino, especialmente en lactantes alimentados con leche materna. No obstante, cuando el niño crece, y empieza la ingesta de alimentos sólidos, la diversidad de la microbiota aumenta, y la composición bacteriana comienza a converger hacia un perfil de microbiota adulta al final del primer año de vida (Palmer C y col, 2007) y se asemeja por completo a la microbiota adulta a los dos 2 años y medio de edad (Ravel J y col, 2001) a partir de esta etapa predominan los *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Al mismo tiempo, el sistema inmunitario “aprende” a diferenciar entre las bacterias comensales y las patógenas.

Una vez que la microbiota ha alcanzado la madurez, ésta permanece en su mayor parte estable hasta la vejez. El consorcio ELDERMET estudió la microbiota de los ancianos, encontrando una composición característica y diferente a la de los adultos jóvenes, particularmente en las proporciones de los grupos *Bacteroides* spp. y *Clostridium* (Claesson MJ y col, 2011).

2.3.3 PERDIDA DE BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Recientemente, se ha propuesto que el incremento de la higiene y una falta de exposición a diversos microorganismos son responsables de la “epidemia” de enfermedades autoinmunes que se ha observado durante los últimos 30 a 40 años en países industrializados (Rook GA y col, 2005).

La esencia de la teoría de esta hipótesis sostiene que la incidencia creciente de enfermedades de mediación autoinmune se debe al estilo de vida y a los cambios

ambientales que nos ha hecho “demasiado limpios”. Destacando la mejora del saneamiento y las condiciones de vida, las vacunaciones y el tratamiento antimicrobiano junto con la disminución del tamaño de las familias y el cambio en la ingestión alimentaria.

De acuerdo con la hipótesis de la higiene, en las sociedades occidentalizadas la incidencia cada vez mayor de trastornos autoinmunes (DM tipo1, esclerosis múltiple) así como atopias (eczema, asma, rinitis, alergias) y la enfermedad inflamatoria intestinal, podrían explicarse por una disminución de la carga microbiana en los primeros meses de vida.

El descubrimiento de tres subgrupos de linfocitos T reguladores ha revolucionado la base inmunológica original de la hipótesis de la higiene, el paradigma T cooperador 1/T cooperador 2. La cual está sustentada por datos inmunológicos que demuestran que la respuesta a antígenos microbianos induce la expresión de citocinas Th1 que compensa la producción de citocinas Th2 polarizadas en recién nacidos.

En ausencia de microbios, el intestino puede propiciar una producción exagerada de IgE y enfermedades atópicas. Alternativamente la ausencia de infecciones helmínticas elimina la regulación por incremento normal de Th2 en la infancia, culminando en un entorno más propenso a Th1, que es característico de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Korzenik JR y col, 2006). Se considera que la inmunidad adaptativa y el desequilibrio entre las respuestas Th1, Th2, Th17 y linfocitos T reguladores son elementos clave en la patogénesis del proceso autoinmune.

En el momento actual hay bastantes evidencias que indican que en las últimas décadas se ha producido un importante cambio en la microbiota humana, incrementándose algunas especies y disminuyendo otras. Pero uno de los hallazgos más llamativos es que en los países desarrollados se ha producido una pérdida de determinadas especies

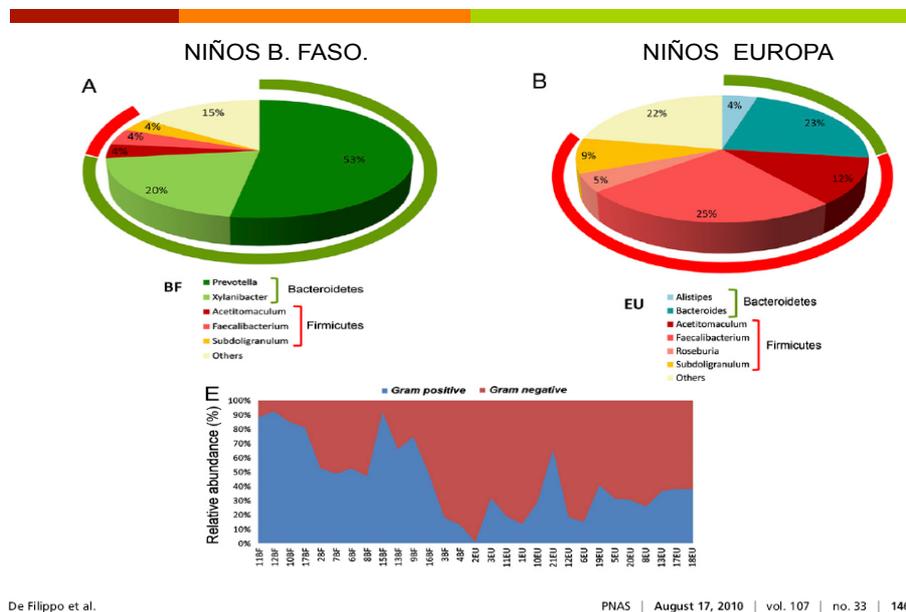
que colonizaban hace unas décadas nuestros intestinos, por tanto ha existido una pérdida de la biodiversidad de nuestra microbiota. Dentro de los factores que han influido en este cambio de la microbiota se encuentran:

- 1.-Saneamiento del agua.
- 2.-Incremento de las cesáreas.
- 3.-Aumento de uso de antibióticos en pretérmino.
- 4.-Reducción de la lactancia.
- 5.-Familias pequeñas.
- 6.-Aumento del uso de antibióticos.
- 7.-Aumento de aseo y jabones antibacterianos.

Uno de los factores más importantes que pueden perturbar la composición de la microbiota es el uso de antibióticos. Los antibióticos tienen un profundo efecto en la microbiota, y su uso excesivo está unido a un aumento de patógenos resistentes a los antibióticos. Ahora hay pruebas convincentes de que existen alteraciones importantes en la microbiota después de un tratamiento con antibióticos (Dethlefsen L y col, 2008 Jernberg C y col, 2001). Aunque el particular taxón afectado varía entre individuos, algunos taxones no se recuperan incluso después de meses de tratamiento, y en general, hay una disminución a largo plazo en la biodiversidad de las bacterias tras el uso de antibióticos.

De hecho, cuando comparamos las microbiotas de niños de Europa con niños africanos encontramos una composición de una microbiota radicalmente diferente. Como demuestra la Figura 4, los cambios se producen tanto en la proporción *Firmicutes/Bacteroidetes* como en la proporción de bacterias Gram negativo/Gram positivo. Los niños africanos presentan una mayor proporción de *Bacteroidetes* y de

Gram positivos en su intestino, por tanto parecería que el estilo de vida occidental es favorecedor del incremento de *Firmicutes* y de Gram negativos.



De Filippo et al.

PNAS | August 17, 2010 | vol. 107 | no. 33 | 14693

Figura 4. Diferencias en la microbiota entre un niño europeo y un niño africano. En las tartas A y B se presentan los filos y los géneros bacterianos más prevalentes. Abajo aparece la relación Gram positivas (en rojo) frente a las Gram negativas (azul) en diferentes niños de los dos continentes: los 14 primeros son niños africanos (BF) y 15 restantes son niños europeos (EU).

3. MICROBIOTA INTESTINAL Y DIABETES MELLITUS TIPO 1

Solo un par de estudios han evaluado la ecología de la microbiota intestinal en niños con diabetes mellitus tipo 1 (Giongo A y col, 2011, Brown CT y col, 2011). Estos estudios han presentado un bajo número de sujetos (solo 4 pacientes y 4 controles) y ninguno de ellos se controló factores tan importantes como modo de parto (vaginal o cesarea) o tipo de lactancia (materna o artificial), ambos factores determinantes de la composición de la microbiota intestinal durante la infancia (Penders J y col, 2010).

Estudios en modelos animales indican que ratones predispuestos a DM tipo 1 nacidos por cesarea presentan una aceleración del proceso respecto a aquellos nacidos por parto

vaginal, con las connotaciones que esto conlleva en la determinación de microbiota intestinal inicial dependiendo de la vía del parto (Like AA y col, 1991).

Apoyando este enfoque vemos como la administración de probióticos en ratones diabéticos no obesos aumenta la IL-10 (citocina antiinflamatoria) ejerciendo un efecto protector sobre DM1 (Calcinaro FDS y col, 2005). Por otro lado, la ingestión de *Lactobacillus Casei* retrasó el inicio de diabetes en ratones diabéticos no obesos así como en ratones con diabetes inducida por aloxano (Matsuzaki T y col, 1997). Los mecanismos específicos que explican como tales terapias modulan el desarrollo de DM no están claros pero es evidente que cambios en la microbiota intestinal afectan al desarrollo de diabetes autoinmune en modelos animales.

Wen demostro la relacion del desarrollo de DM tipo 1 y la presencia de proteina MyD88 en ratones diabeticos no obesos. La ablacion genica de la proteina MyD88 (un adaptador para multiples receptores de inmunidad innata que reconocen estímulos bacterianos) está relacionada con un efecto protector para el desarrollo de DM1, debido a una mayor tolerancia local a antígenos pancreáticos. Pero ratones diabeticos no obesos knockout de MyD88 no son protegidos frente a DM1, donde se deduce que el knock out de Myd 88 no es un factor independiente en la protección de DM. Existe una fuerte asociación del déficit de proteina MyD88 y la presencia de una determinada flora intestinal para ejercer dicho efecto protector. Ya que cuando a los ratones knockout de la proteina MyD88 se les administra un antibiotico de amplio espectro que elimina toda flora intestinal, la deficiencia de dicha proteina dejó de presentar tal efecto protector en el desarrollo de DM1. Los ratones con deficiencia de MyD88 y no tratados con antibiotico presentaban un cociente mas bajo de Firmicutes/Bacteroidetes así como un aumento de *Lactobacillus*, *Rikeallaceae* y *Porfiromonadaceae*. (Wen L y col, 2008)

El tratamiento con estreptozotocina (STZ) en ratas y ratones induce una diabetes dependiente de insulina debido a la toxicidad de las células β pancreáticas relacionada con el fármaco. El pronóstico de la diabetes por inyección neonatal de STZ puede mitigarse alimentando a los roedores con pienso al que se ha incorporado *Lactobacillus rhamnosus* (Tabuchi M y col, 2003). Así mismo, la administración de Dahi, un producto lácteo fermentado indio que contiene *Lactobacillus acidophilus* (NCDC14) y *L. Casei* (NCDC19) en ratas tratadas con STZ mejoró la tolerancia a la glucosa y redujo los niveles de LDL colesterol y VLDL totales así como, los niveles de triglicéridos (Yadav H y col, 2008).

En otro estudio, los *Lactobacillus* con actividad cinnamoyl esterasa (*L. Johnsonii* y *L. Reuteri*) fueron correlacionados negativamente con DM1. Las bacterias que están relacionadas negativamente con DM1 pueden prevenir o postponer el inicio de DM1 en ratas predispuestas. Como prueba de este concepto se aisló *L. Johnsonii* de BBDR (ratas resistentes a DM1) y se alimentó con éste a BBDP (ratas predispuestas a DM1) (Lai KK y col, 2009). Los resultados muestran cambios en la composición de la microbiota intestinal, retrasando el proceso de autoinmunidad. La respuesta del huésped a *L. Johnsonii* consistió en: 1) Aumento de los niveles de proteínas de unión intraepitelial 2) Aumento en la secreción de moco, 3) Disminución del estado oxidativo, 4) Disminución de la inflamación del intestino. La administración de *L. Johnsonii* N 6.2 modifica la microbiota intestinal. Los grupos alimentados con *L. Johnsonii* y *L. Reuteri* mostraron colonias de morfología homogénea. Además, el análisis de la mucosa ileal presentó un aumento estadísticamente significativo de la población de *Lactobacillus* en todas las ratas que no desarrollaron diabetes. Los efectos beneficiosos del *Lactobacillus* se deben a una mejor barrera física que impide el paso de antígenos bacterianos y una mayor

degradación de componentes tóxicos (Valladares R y col, 2010). Esto explica un efecto directo de la bacteria en la integridad de la barrera intestinal.

No obstante, el efecto preventivo en el desarrollo de DM1 de *L. Johnsonii* fue solo observado cuando la administración empezó en el periodo postdestete más que durante la administración predestete, probablemente por la mayor madurez intestinal.

4. MICROBIOTA Y OTRAS ENFERMEDADES METABÓLICAS COMO LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Numerosos trabajos en humanos han encontrado cambios en la microbiota de sujetos con diabetes o resistencia a la insulina comparados con sujetos sin alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado (Serino M y col, 2012 Qin J y col, 2012).

Además, tratamientos probióticos y prebióticos (Amar J y col, 2011) han demostrado que modifican la microbiota intestinal y el metabolismo hidrocarbonado. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la influencia directa de la microbiota sobre la resistencia a la insulina, a continuación se detallan los mecanismos que se postulan como más sólidos en la literatura.

4.1. Incremento en la endotoxemia.

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas, se ha observado que se produce un incremento en los niveles de LPS circulantes en sujetos que tienen un incremento en la ingesta de grasas (Amar J y col, 2008). Se han encontrado resultados similares en estudios con ratones (Cani PD y col, 2007) y ratones mutantes, como los ratones deficientes en leptina, incluso alimentándose de una dieta normal lo que (Cani PD y col, 2008) sugiere que ante determinadas situaciones se produce o un cambio en la proporción de bacterias Gram negativas en el intestino o un cambio en la permeabilidad intestinal para que los LPS se incrementen en suero (Cani PD y col, 2009) y este incremento en suero se relaciona de

forma directa con el grado de resistencia a la insulina. Se ha demostrado que los LPS se absorben por el enterocito y son vehiculados en plasma fundamentalmente unidos a los quilomicrones (Clemente Postigo M y col, 2012).

El papel causal de los LPS ha sido demostrado, ya que al infundir LPS en ratones alimentados con una dieta normal se induce resistencia a la insulina a nivel hepático, intolerancia a la glucosa, y un incremento en el peso del tejido adiposo (Cani PD y col, 2007).

El LPS se une al receptor CD14/TLR4 presente en los macrófagos y se produce un incremento en la producción de moléculas pro-inflamatorias (Figura 6), cuando las inyecciones de LPS se administraron a ratones con ausencia genética del receptor CD14/TLR4 no provocaron estas características metabólicas y no presentaron diabetes tipo 2 y ni obesidad, mostrando el importante papel del mecanismo del receptor CD14/TLR4 para LPS (Cani PD y col, 2007 Poggi M 2007). Además, los ratones CD14/TLR4 con knock out eran incluso más sensibles a la insulina que los controles de tipo salvaje.

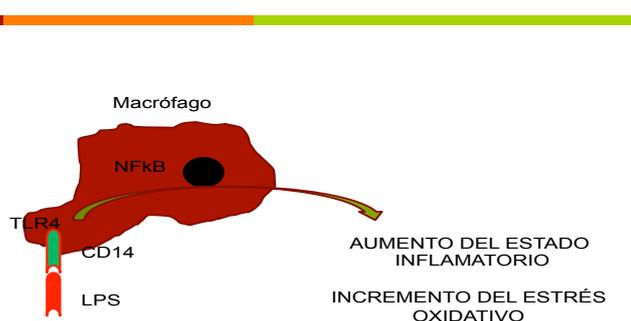


Figura 6. Mecanismo a través de los cuales LPS incrementa el estrés oxidativo y el grado de inflamación.

4.2. Modificaciones de la secreción de incretinas relacionadas con la resistencia a la insulina y la funcionalidad de la célula beta.

Se ha mostrado que un aumento de *Bifidobacterium* spp. modula la inflamación en ratones obesos por un incremento en la producción de péptido similar al glucagón, reduciendo también la permeabilidad intestinal (Cani, P.D 2009).

Existe evidencia de que el incremento de *Bifidobacterium* spp que producen algunos prebióticos se acompaña de un incremento en la secreción de GLP1 y de Péptido YY por parte del intestino, estas dos moléculas tienen efectos favorables en el descenso de la resistencia a la insulina e incremento de la funcionalidad de la célula beta (Cani PD y col, 2009).

4.3.- Modificaciones en la producción de butirato.

Un estudio reciente (Qin J y col, 2012) ha encontrado en un análisis de sujetos chinos con y sin diabetes datos muy interesantes. Este estudio encuentra una disbiosis bacteriana intestinal en un grado moderado en sujetos con diabetes tipo 2; sin embargo, los análisis funcionales de estos cambios indican una disminución en las bacterias que producen butirato (el incremento de butirato puede ser metabólicamente beneficioso) y además encontraron un aumento en varios patógenos oportunistas. Se ha informado recientemente sobre tales cambios en la composición bacteriana intestinal en pacientes de cáncer colón-rectal y (Wang T y col, 2012) en población de avanzada edad (Biagi E y col, 2010)

Por ello, está apareciendo una visión general donde las bacterias que producen butirato parecen tener un papel protector contra muchos tipos de enfermedades. Adicionalmente, este estudio demuestra más la existencia de una disbiosis funcional, que un cambio en una especie microbiana específica que tenga una asociación directa con la patofisiología de la diabetes tipo 2. Además, dado que otras enfermedades intestinales muestran una

pérdida de bacterias que producen butirato con un aumento acorde en patógenos oportunistas, es posible que este cambio en la microbiota pueda provocar un incremento de la susceptibilidad a padecer una más amplia variedad de enfermedades

5. DIABETES y ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) altamente reactivos y el mecanismo de limpieza o de bloqueo natural de estas sustancias. Debido a la habilidad de los RLO de oxidar y dañar DNA, proteínas y lípidos, se han asociado los RLO con la patogénesis de algunas enfermedades humanas como la diabetes (Sies H y col, 1991).

5.1 Isoprostanos

La disponibilidad de un abordaje fidedigno y no invasivo para valorar el estrés oxidativo en humanos es una prioridad en el campo de la investigación de los RLO.

En 1990 Morrow et al, describieron la formación de compuestos similares a la prostaglandina F₂ en vivo en humanos producidos por la peroxidación no enzimática inducida por los RLO del ácido araquidónico que es un ácido graso poli-insaturado ampliamente distribuido en el organismo. Estos autores denominaron a estos compuestos isoprostanos. A diferencia de las prostaglandinas, las cuales están formadas por la acción de enzimas ciclooxigenasas, los isoprostanos se generan como un resultado de la peroxidación mediada por los RLO del ácido araquidónico independiente de esta enzima (Morrow JD y col, 1990).

El origen de los RLO que contribuyen a la formación de los isoprostanos in vivo es múltiple. Incluye la generación y transformación de los RLO, como el superóxido y el radical hidroxil, desde el sistema de transporte de electrones mitocondrial y de la familia P₄₅₀ de enzimas que metabolizan los fármacos, la generación de

superóxido por las oxidasas de NADPH, del radical hidroxiperoxy a partir de lipooxigenasas y la formación catalizada por metales de transición de los RLO, entre otros.

El mecanismo por el cual estos compuestos se producen se basa en los principios químicos propuestos por Pyor, Porter y otros de la generación de intermediarios biciclo-endoperóxidos producidos por la peroxidación de otros ácidos grasos polinsaturados (Roberts LJ y col, 2000) (Figura 7).

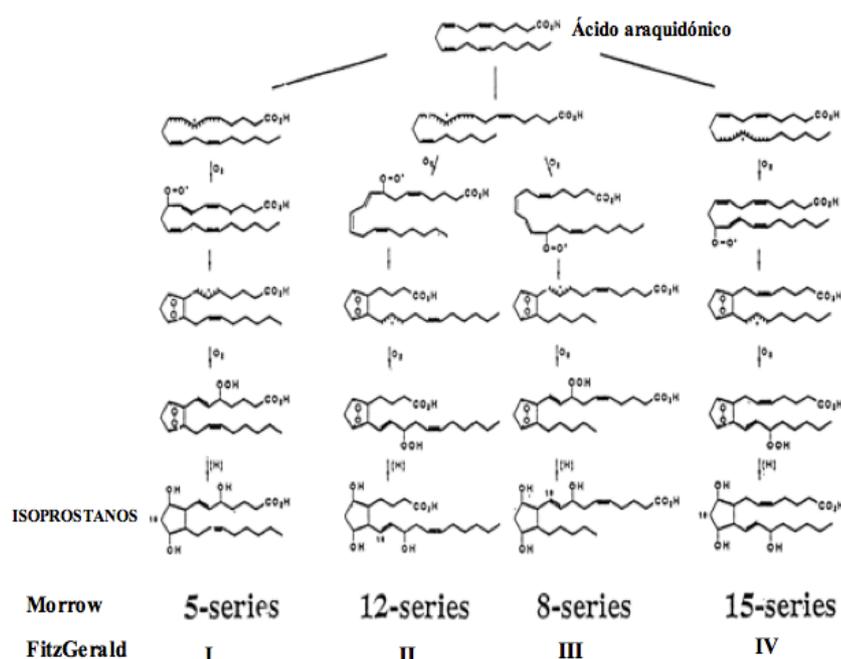


Figura 7. Clasificación basada en el sistema de nomenclatura para isoprostanos aprobada por el Comité de Nomenclatura Eicosanoide y ratificada por la "Joint Commission on Biochemical Nomenclature of the International Union of Pure and Applied Chemistry".

Los isoprostanos pueden medirse en los fluidos biológicos como sangre y orina (Morrow JD y col, 1999). Actualmente se han detectado en todos los tejidos humanos y fluidos evaluados, y esto es particularmente importante, ya que

permite la valoración de los efectos de enfermedades sobre la situación oxidante endógena.

La definición de los niveles de isoprostanos *in vivo* es importante porque permite la valoración de la extensión en la cual las intervenciones terapéuticas influyen sobre los niveles de estrés oxidativo.

Para estudios en humanos, la medición de isoprostanos en los fluidos corporales como orina y plasma es significativamente más conveniente y menos invasivo que la medición en tejidos orgánicos. Basándonos en los datos disponibles, la medición en plasma y orina es un índice preciso y exacto de estrés oxidativo.

Debido a que el 8 isoprostano representa el componente más abundante de todos los isoprostanos medidos en plasma y orina, se han desarrollado análisis específicos para su determinación por lo que es el más extensamente estudiado.

Se ha observado que este compuesto tiene importantes efectos biológicos, es un potente vasoconstrictor (Takahashi K y col, 1992) e induce la síntesis de DNA en las células del músculo liso vascular, probablemente a través de su interacción con receptores de tromboxanos así como la activación de los receptores de prostaglandinas y estimula la respuesta proliferativa de los fibroblastos (Kunapuli P y col, 1997).

5.1.1 Isoprostanos y diabetes

La generación de isoprostano es inducida *in vitro* en las células del músculo liso vascular por niveles de glucemia elevados, por este motivo varios investigadores exploraron la posibilidad de aumento del estrés oxidativo en los pacientes con DM.

En la actualidad existen pocos estudios y han sido realizados en los últimos 15 años en los que se ha relacionado la formación de isoprostanos en la DM (Natarajan R y col, 1996) (Figura 8).

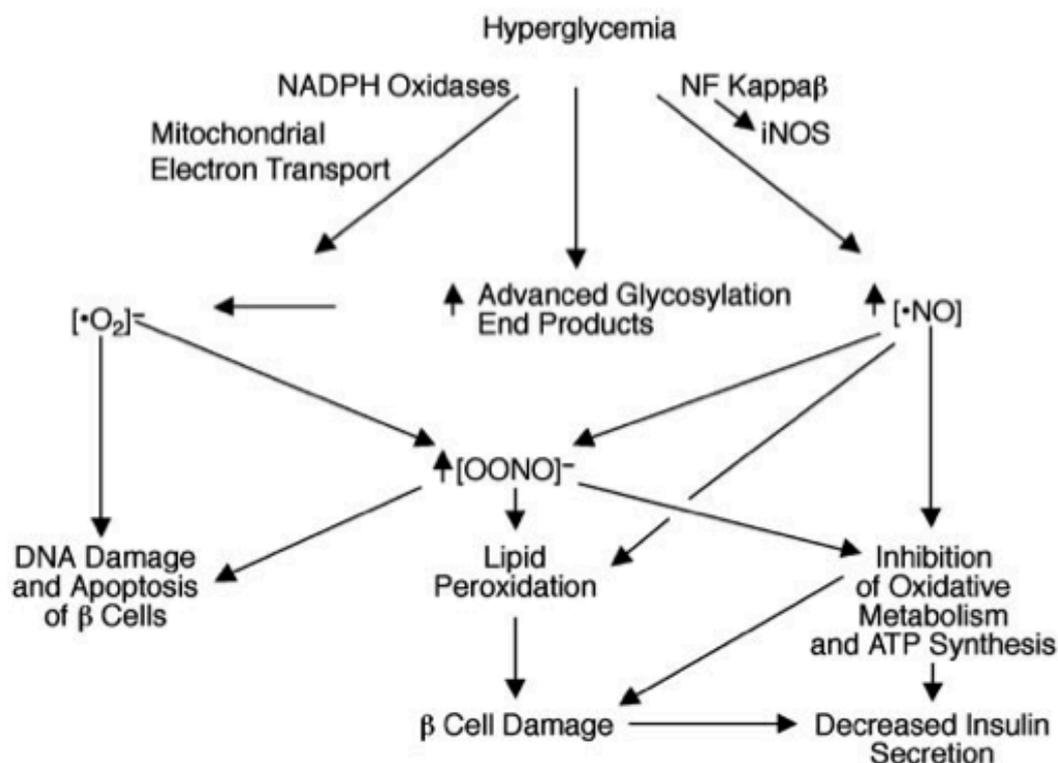


Figura 8. Los isoprostanos son productos biológicamente activos derivados del metabolismo del ácido arquidónico de relevancia especial en la DM (Robert D. Hoeldtke y col, 2003)

Se ha observado que la excreción de 8 isoprostanos en pacientes adultos con DM1 y DM2 era el doble de la que se observó en sujetos sanos de similar edad (Takahashi K y col, 1992). Esta observación similar en los pacientes con DM1 y DM2 implica a la hiperglucemia como principal alteración metabólica, debido a que ésta es la característica fundamental en ambas poblaciones de pacientes. Estos autores también observaron una correlación significativa entre los niveles de glucosa en plasma y la concentración urinaria de isoprostanos, sugiriendo que la peroxidación

lipídica está relacionada con el control glucémico. La observación que el tratamiento intensivo con agentes hipoglucemiantes disminuye los niveles de glucosa y la excreción urinaria de isoprostanos, apoya la idea de que la hiperglucemia es responsable de la mayor parte de la formación de isoprostanos (Sampson NK y col, 2002). Otra importante observación de este estudio, fue el hallazgo de una correlación entre la excreción urinaria de 8 isoprostano y la activación plaquetaria y, sobre la base de estudios previos, en los que se sugería que el 8 isoprostano amplificaba la agregación plaquetaria inducida por agonistas, estos resultados sugieren un incremento de la peroxidación lipídica en pacientes con DM en los que la formación de 8 isoprostano inicia la activación plaquetaria.

5.2 Ácidos grasos no esterificados

Existe una amplia aceptación en la literatura que los ácidos grasos no esterificados (NEFA) también llamados ácidos grasos libres (FFA) pueden mediar muchos efectos metabólicos adversos, el más notable la resistencia a la insulina. El proceso de movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo normalmente inhibido por la insulina, da lugar a insulinoresistencia, motivo por el que se incrementa la lipólisis dando lugar a un círculo vicioso. Este modelo ha sido aceptado durante muchos años (Frayn KN y col, 1996)

Los NEFA circulan en plasma unidos a albúmina plasmática, su función fué ampliamente estudiada en 1950 a través del trabajo de Vicent Dole (Dole VP y col, 1956) y Robert Gordon (Gordon RS Jr y col, 1957). Gordon demostró el origen de los NEFA plasmáticos del tejido adiposo y su uso por otros tejidos como el hígado y el corazón pero no por el cerebro. Nosotros actualmente reconocemos que los NEFA son el vehículo por el cual los depósitos de triglicéridos en tejido adiposo son transportados

a su sitio de utilización (Fredrik Karpe y col, 2011). La vida media de los NEFA es corta alrededor de 2-4 min (Eaton RP y col, 1969).

La grasa subcutánea abdominal es la fuente dominante de NEFA (Nielsen S y col, 2004). En ayunas, los NEFA plasmáticos aumentan casi enteramente de la hidrólisis de los TG en el adipocito. Tras una comida que contiene grasas hay una ruta importante de generación de NEFA plasmáticos. La lipoproteinlipasa (LPL) en los capilares del tejido adiposo hidroliza los TG circulantes principalmente procedentes de la dieta en los quilomicrones. La movilización grasa es inhibida por la insulina. Las concentraciones plasmáticas de NEFA disminuyen después de cualquier comida que contiene hidratos de carbonos la cual estimula la liberación de insulina.

Los perfiles circadianos de las concentraciones plasmáticas de NEFA muestran las concentraciones más altas tras el ayuno nocturno con supresión después de cada comida (Bakewell L y col, 2006). Se encuentran más altas en las mujeres que en los hombres y se incrementan en las situaciones de estrés. Durante el ejercicio cuando la grasa es movilizada desde el tejido adiposo para llevar a cabo el trabajo muscular, las concentraciones pueden aumentar (Stefan N y col, 2010).

5.2.1 NEFA y diabetes

Se ha descrito un aumento de NEFA en pacientes con diabetes (Basu Ay col, 2001). En estudios con DM y mal control metabólico se pueden encontrar niveles elevados de NEFA, no existiendo un aumento notable cuando hay un buen control metabólico (Groop LC y col, 1989) (Sørensen LP y col, 2011). Una clásica relación de feedback ha sido postulada entre la hormona de crecimiento (GH) y los NEFA. La GH tiene un efecto lipolítico directo en el tejido adiposo, apoyando la liberación de glicerol, FFA y cuerpos cetónicos (Vance M y col, 1993). La reducción farmacológica

de FFA está asociada con la liberación de GH. (Dieguez, C. & Casanueva, F.F. 1995). El Acipimox es un fármaco antilipolítico que inhibe la lipólisis y produce una reducción de FFA (Pontiroli A y col, 1990). Coiro y col. llevaron a cabo un estudio que evaluaba si el incremento de secreción de GH en pacientes con DM1 podría ser debido a una alteración en el mecanismo inhibitor debido a los FFA circulantes, ya que la hiperglucemia ejerce un efecto inhibitor habitualmente en la liberación de GH. La reducción de FFA con acipimox es un estímulo para la secreción de GH en pacientes con DM1. La administración conjunta en este estudio de acipimox y GHRH produjo un marcado incremento de liberación de GH en sujetos con DM1 cuando los compararon con sujetos normales. Estos datos sugieren que los pacientes con DM1 tienen mayor capacidad secretora de GH que los sujetos normales pero los niveles endógenos de FFA ejercen un importante efecto inhibitor en los pacientes con DM1 (Coiro V y col, 1999).

5.3 Estrés oxidativo, microbiota intestinal y diabetes

Existe en la literatura escasa referencia a marcadores de estrés oxidativo, microbiota intestinal y diabetes. Uno de los efectos más precoces de las "especies reactivas de oxígeno" (ROS) es la disrupción de las uniones estrechas de las células epiteliales del intestino (Schulzke JD y col, 2009). Los efectos beneficiosos de *L. Johnsonii* se deben a la liberación de componentes antioxidantes a través de la hidrólisis de fibras de la dieta. *L. Johnsonii* produce una disminución de la respuesta del huésped al estrés oxidativo. El nivel de Hexanoylsina (un marcador de stress oxidativo fue determinado por ELISA en mucosa ileal) se observó que fue más elevado en ratas diabéticas cuando se comparaban con el grupo control y con el grupo alimentado con *L. Johnsonii* (Kato Y y col, 2004). El estado oxidativo de la mucosa ileal fue valorado midiendo niveles de mRNA de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo (SOD, GPX1, Cat y GR) y se observó una correlación

negativa entre las bacterias capaces de liberar componentes antioxidantes bioactivos desde componentes fenólicos. *L. Johnsonii* N.6.2 posee 2 esterasas que pueden liberar ácido cinnámico y otros componentes fenólicos con propiedades antiinflamatorias. No obstante, el papel directo de estas enzimas y el componente antioxidante en la patogénesis en la patogénesis de DM1 requiere más investigación. El óxido nítrico es una molécula asociada a la inflamación y desarrollo de diabetes. Un aumento en la transcripción y traducción del gen de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) ha sido asociada con desarrollo de DM1 en BBDP. La expresión de iNOS (y su citokina inductora IFN γ) fue disminuida en el grupo *L. Johnsonii* comparado con el grupo control (Kato Y y col, 2004). *L. Johnsonii* disminuye la expresión de IFN γ , ejerciendo por esta otra vía un efecto protector para diabetes. Existen enfermedades descritas en las que a través de la medición de F2-isoprostanos se han implicado a los radicales libres de oxígeno en la patogénesis de algunas enfermedades como es el caso de la diabetes y la aterosclerosis (Koenig W y col, 2006) (Flores L y col, 2004).

FUNDAMENTOS DEL ESTUDIO

- En modelos animales se ha podido observar cambios en la flora intestinal, a través de manipulación antibiótica y/o administración de probióticos, que han desencadenado cambios en el curso de la enfermedad de ratones predispuestos a desarrollar DM tipo 1, bien atrasando su momento de presentación o incluso evitando su aparición.
- Existen muy pocos estudios que aporten datos sobre la microbiota intestinal en niños con DM tipo 1 que nos permitan establecer una relación entre ambos.
- Ha sido descrita la relación entre diabetes y estrés oxidativo pero solo existen algunas referencias puntuales en la relación entre diabetes mellitus tipo 1, estrés oxidativo y

microbiota intestinal. El conocimiento de la relación entre microbiota y estrés oxidativo nos permitiría conocer posibles conexiones no descritas hasta el momento en el desarrollo de DM tipo 1.

HIPOTESIS

-Existen diferencias entre la microbiota intestinal de niños con diabetes mellitus tipo 1 y niños sanos. Estas diferencias en la microbiota intestinal podrían estar relacionadas con los elevados niveles de glucemia presentes en los niños diabéticos.

- Existen diferencias de estrés oxidativo entre sujetos con DM tipo 1 y sujetos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en la microbiota intestinal de niños con DM tipo 1 comparada con la de niños sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Cuantificar la microbiota intestinal presente en ambos grupos de estudio.

-Establecer la posible relación entre la microbiota presente en los niños con diabetes mellitus tipo 1 y los niveles de glucemia presentes.

-Medir biomarcadores de estrés oxidativo en niños con diabetes mellitus tipo 1 y niños sanos.

-Analizar biomarcadores de estrés oxidativo en los dos grupos de estudio.

-Determinar si existe relación entre la microbiota intestinal y los biomarcadores de estrés oxidativo analizados.

METODOLOGIA

Sujetos de estudio

En el estudio se incluyeron 16 niños con edades comprendidas entre 5 y 10 años afectos de DM tipo 1 en seguimiento en la Unidad de Diabetes infantil del Complejo Hospitalario de Jaén durante el año 2009/2010. Los niños diabéticos fueron tratados y monitorizados acorde a protocolos médicos standarizados y todos ellos se encontraban en tratamiento intensivo de insulino terapia a través de infusión continua de insulina. Se excluyeron aquellos pacientes afectos de otras enfermedades. Los sujetos del estudio no recibieron tratamiento antibiótico, probióticos, prebióticos o cualquier otro tratamiento médico que pudiera influir en la microbiota intestinal en los últimos 3 meses antes del inicio del estudio.

Los controles fueron 16 niños con edades comprendidas entre 5-10 años que acuden a revisión de control de niño sano al centro de salud de la misma área sanitaria que los casos a través de muestreo consecutivo en el mismo periodo de tiempo. Estos controles fueron seleccionados pareados en edad, sexo, antecedentes, modo de parto y duración de lactancia materna con los pacientes. Los padres de los pacientes y controles completaron un entrevista estructurada para obtener los siguientes datos: estado de salud, aspectos de estilo de vida (ambiente rural/ urbano, actividad física) y hábitos dietéticos (cuestionario de frecuencia de alimentos).

La toma de muestras fue llevada a cabo tras la aprobación del Comité de Ética del Hospital de Jaén y el consentimiento informado de los padres de los pacientes.

Recogida de muestras

A todos los pacientes que participaron en el estudio se les extrajeron muestras de sangre por la mañana tras doce horas de ayunas. Estas muestras de sangre fueron recogidas en dos tubos; uno con ácido-etileno-diamino tetracético (EDTA) y otro sin anticoagulante, y fueron centrifugadas a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C, para aislar el plasma y el suero, respectivamente, en el mismo día

de la punción venosa. Estas muestras de suero y plasma fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Muestras de heces del tamaño de una nuez fueron recogidas en un frasco esteril de boca ancha. Una vez recogidas las muestras fueron transportadas en nieve carbonica ,previamente suministrada a los padres, hasta el hospital donde fueron alicuotadas y congeladas a -80 °C. El tiempo transcurrido desde su recogida por parte de los padres hasta su entrega siempre fue inferior a 24 horas. Posteriormente las muestras fueron enviadas en nieva carbonica al laboratorio de investigación de IBIMA del Hospital Clinico Virgen de la Victoria de Malaga, donde fueron procesadas y secuenciadas en la ECAI de Biología Molecular.

Análisis de variables bioquímicas

Las mediciones se hicieron con un autoanalizador Dimensión de Dade Behring Inc. (Deerfield, IL, EE.UU.). Además, la insulina fué cuantificada mediante RIA proporcionado por BioSource SA (Nivelles, Bélgica) y las lipoproteínas séricas (HDL, LDL) se medieron mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. Los triglicéridos del suero se midieron por cromatografía de gases-después de la separación mediante cromatografía en capa fina.

Datos antropométricos

El peso y la talla de los niños fueron medidos acorde a procedimientos estandarizados.El peso se registró utilizando una báscula (Tanita 2001T-TB), con precisión de fracciones de 100 g. La talla con un estadímetro Holtain (Holtain Ltd., Dyfed, UK) con precisión de fracciones de 0,1 cm.

Extracción del ADN bacteriano

La descongelación de las alícuotas de las muestras de heces se realizó de manera gradual durante 24 horas a 4°C para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos más sensibles a los cambios de temperatura. La extracción de ADN se realizó a partir de 200 mg de heces utilizando el QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de manufactura.

El protocolo de aislamiento del DNA de muestra de heces para detección de patógenos ha seguido el siguiente procedimiento:

1. Se pusieron 200 mg de heces en un tubo de microcentrifuga de 2 ml y se mantuvo el tubo en hielo.
2. Se añadió 1.4 ml de Buffer ASL a cada muestra de heces. Se vorteo de forma continuada durante 1 minuto para homogeneizar las heces
3. Se calentó la suspensión a 70°C ,
4. Se vorteo durante 15 s. y se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 1 min.
5. Se pipeteó 1,2 ml del sobrenadante en un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 ml y se desechó el pellet.
6. Se añadió una pastilla inhibitEX a cada muestra y se vorteo inmediatamente y de forma continuada durante 1 min. o hasta que la pastilla estuviera completamente disuelta. Se incubó la suspensión durante 1 min. a temperatura ambiente
7. Se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 3 min. para eliminar inhibidores unidos a la matriz inhibitEX.
8. Se pipeteó todo el sobrenadante en un nuevo tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5 ml y se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 3 min.

9. Se pipeteó 15 µl de proteinase K en tubo nuevo de microcentrifuga de 1,5 ml
10. Se pipeteó 200 µl de sobrenadante anterior en el tubo de microcentrifuga que contenía proteinase K
11. Se añadió 200 µl de buffer AL y se vorteoó durante 15 s.
12. Se incubó a 70°C durante 10 min.
13. Se añadió 200 µl de etanol al lisado y se mezcló vorteoando.
14. Se añadió el lisado a la columna y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min.
15. Se abrió la columna y se añadió 500 µl de buffer AW1. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min y se desechó el filtrado.
16. Se abrió la columna y se añadió 500 µl de buffer AW2. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min y se desechó el filtrado.
17. Se abrió la columna y se añadió 40µl de agua Milliq. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 4 min y se recogio el filtrado conteniendo el ADN purificado.

Determinación de la concentración y pureza de los acidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se puede determinar la concentración de los ácidos nucleicos, considerando que 1 unidad de absorción a 260 nm equivale a 50 µg de DNA de doble cadena por ml y a 40 µg de ARN por ml, mediante las siguientes fórmulas:

$$[\text{DNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times [(50 \text{ µg ARN/ml}) / A_{260 \text{ nm}}] \times 1 \times D$$

$$[\text{ARN}] = A_{260 \text{ nm}} \times [(40 \mu\text{g ARN/ml}) / l A_{260 \text{ nm}}] \times 1 \times D$$

Siendo, 1 = paso de luz de la cubeta en cm (normalmente 1 cm)

D= factor de dilución

A_{260 nm}= absorancia a 260 nm

La relación entre A_{260 nm}/A_{280 nm} permite determinar la calidad (pureza) de los ácidos nucleicos. Se considera que el DNA puro tiene una relación de 1.8, aunque el rango de relaciones comprendidas entre 1.6 y 1.8 se consera un buen grado de pureza de las muestras. De la misma manera, el ARN puro tiene una relación de 2, y consideramos un buen grado de pureza el rango de relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.

Procedimiento utilizando un sistema NanoDrop ND-1000

1. Limpiar la superficie del sistema de retención de muestra del microespectrofotómetro con 2 μl de agua deionizada RNasa-free en la superficie óptica inferior. Luego pasar un paño especial Kimwipe.
2. Abrir el software de NanoDrop y seleccionar el módulo de ácidos nucleicos.
3. Inicializar el espectrofotómetro añadiendo 2 μl de agua deionizada RNasa-free en el NanoDrop. Limpiar con Kimwipe.

Realizar una medida de blanco con 2 μl de agua deionizada RNasa-freeLimpiar con Kimwipe.5. Medir la muestra de ácido nucleico añadiendo 2 μl .

Análisis de microbiota fecal mediante PCR-DGGE (electroforesis en gradiente desnaturalizante)

La región V2-V3 del gen de ARNr 16S (posiciones 339 a 539 en el gen de Escherichia coli) de las bacterias en las muestras fecales se amplificaron utilizando los cebadores **HDA1-GC** (5'-CGC CGC GGG CCG CCG CCG GGC GGG GGG GCA GCG

CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3 ') y **HDA2** (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'). Alícuotas (2 µl) de ADN fueron amplificadas mediante PCR a tiempo real (20 µl volumen final) en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR utilizando la Faststart SYBR Master Mix y 200 nM de cada uno de los cebadores universales HDA1- GC/HDA2 con el siguiente programa de amplificación: una desnaturalización inicial a 95 ° durante 20 s, wil amplificación se llevó a cabo utilizando 45 ciclos incluyendo desnaturalización a 95 ° C durante 3 s, hibridación a 55 ° C durante 30 s y extensión a 72 ° C durante 1 min.

Las electroforesis fueron realizadas con un DCode™ Universal Mutation Detection System instrument (Bio-Rad) utilizándo geles de poliacrilamida al 6% (preparados y corridos en buffer TAE 1 × preparado a partir de buffer TAE 50 × (2 M Tris base, 1 M de ácido acético glacial, 50 mM EDTA, pH 7,4) con un gradiente de urea y formamida del 20 al 75 % que se incrementaba en la dirección de la electroforesis. 15 µl del producto PCR del paso anterior, fueron mezclados con 6 µl de tampón de carga y la electroforesis fué corrida en buffer TAE 1x a 130 V y 60 °C durante 4.5 h. A continuación, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio e incubados durante 15 minutos en oscuridad, se enjuagaron con agua desionizada, se visualizaron en un transiluminador mediante luz ultravioleta y se fotografiaron con el software de adquisición de imagen Gelcapture (DNR Bio-Imaging Systems Ltd). Los perfiles DGGE obtenidos fueron comparados para determinación del coeficiente Dice, utilizando el paquete informatico Bionumerics (versión 4.01, Applied Maths) con una sensibilidad del 1-2%.

Escisión, clonación y secuenciación de determinadas bandas de geles de DGGE

Las bandas de interés específico fueron cortadas de los geles de DGGE con una cuchilla estéril, colocadas en 50 µl de TE, e incubadas a 4 °C toda la noche para la difusión del ADN en el TE. 10µl de este ADN tratado fueron utilizados en una PCR a tiempo real utilizando los primers HDA1 sin GC-clamp y HDA 2 (desnaturalización inicial a 95 ° C durante 20 s, seguido de 45 ciclos incluyendo desnaturalización a 95 ° C durante 3 s, hibridación a 55 ° C durante 15 s y extensión a 72 ° C durante 10 s)). Posteriormente, los productos PCR fueron directamente clonados utilizando en kit PCR ® 4-TOPO (Invitrogen, UK), de acuerdo con las instrucciones de manufactura. Los plasmidos de ADN fueron aislados de las células utilizando Qiagen Mini Spin Prep Kit (Qiagen, Alemania), y sometidos a PCR (HDA1-GC/HDA2) como se describe anteriormente. Los productos de PCR se diluyeron hasta 20 ng/l, se purificaron con ExoSAP-IT (USB corporación, Miles Road, Cleveland, Ohio, EE.UU.) y se secuenciaron en un ABI 3130 (Applied Biosystems), utilizando el Big Dye Terminator sequencing kit. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron mediante el software MicroSeqID v2.1.1 (Applied Biosystems). La identidad de las cepas fue establecida mediante comparación de las secuencias con las presentes en las bases de datos públicas (“GenBank” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o “Ribosomal Database Project”: <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), mediante el programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”)

Cuantificación microbiana mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Cebadores específicos dirigidos a diferentes géneros bacterianos basados en el ARNr 16S se han utilizado para caracterizar la microbiota en las muestras de heces mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Figura . En resumen, los experimentos de PCR cuantitativa se realizaron en un termociclador LightCycler 2.0 utilizando el kit

FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Todas las pruebas de PCR se llevaron a cabo con un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µl de cada preparación de ADN y 200 nM de cada uno de los cebadores. Las condiciones de amplificación fueron como sigue: una etapa de desnaturalización a 95°C 10 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C 10 s, annealing (temperatura óptima para cada primer) 20 s y extensión a 72°C 15 s. Para la cuantificación se utilizó una curva estándar realizada a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de éstas bacterias obtenido de cultivos puros (10^1 - 10^{10} copias / gramo de heces) utilizando el software LightCycler 4,0. Las diferentes cepas utilizadas se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (*Bacteroides vulgatus* NCTC 11154, *Fusobacterium varium* NCTC 10560, *Enterococcus faecalis* CECT 184, *Enterobacter cloacae* CECT 194, *Clostridium perfringens* CECT 376) y la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (*Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696, *Lactobacillus casei* ATCC 334D-5, *Prevotella intermedia* ATCC 25611D-5). Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado

Table 2. Cebadores utilizados en qPCR

Bacteria	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Reference
<i>Bacteroidetes</i>	CATGTGGTTTAATTCGATGAT AGCTGACGACAACCATGCAG	<i>Guo et al, 2008 (30)</i>
<i>Bacteroides</i>	GAGAGGAAGGTCCCCCAC CGCTACTTGGCTGGTTCAG	<i>Guo et al, 2008 (30)</i>
<i>Lactobacillus</i>	GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC	<i>Delroisse et al, 2008 (31)</i>
<i>Fusobacterium</i>	CCCTTCAGTGCCGCAGT GTCGCAGGATGTCAAGAC	<i>Friswell et al, 2010 (32)</i>
<i>Firmicutes</i>	ATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	<i>Guo et al, 2008 (30)</i>

<i>Actinobacteria</i>	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG CCGTACTCCCCAGGCGGGG	<i>Stach et al, 2003 (33)</i>
<i>Bifidobacterium</i>	CTCCTGGAAACGGGTGG GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	<i>Matsuki et al, 2002 (34)</i>
<i>Prevotella</i>	GGTTCTGAGAGGAAGGTCCCC TCCTGCACGCTACTTGGCTG	<i>Bekele et al, 2010 (35)</i>
<i>Enterococcus</i>	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT ACTCGTTCTTCCCATGT	<i>Rinttila et al, 2004 (36)</i>
<i>Proteobacteria</i>	CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	<i>Friswell et al, 2010 (32)</i>
<i>Clostridium</i> Cluster IV	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCTCCGTTTTGTCAA	<i>Matsuki et al., 2004 (34)</i>
<i>Blautia</i> <i>coccoides–</i> <i>Eubacterium</i> <i>rectale</i> group	CGGTACCTGACTAAGAAGC AGTTTCATTCTTGCGAACG	<i>Rinttila et al, 2004 (36)</i>
<i>Veillonella</i>	ACCAACCTGCCCTTCAGA CGTCCCGATTAACAGAGCTT GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	<i>Rinttila et al, 2004 (36)</i>
β -Globin	CAACTTCATCCACGTTCCACC	<i>Fredricks et al, 2005 (37)</i>

Cuantificación de NEFA

Para la cuantificación de NEFA en plasma se utilizó el kit para cuantificación in vitro RX MONZA (Randox Laboratories), siguiendo instrucciones de manufactura. Como muestra en el ensayo se utilizó plasma recogido en tubos con citrato sódico.

Composición de los reactivos utilizados:

Contenidos	Concentración inicial de la soluciones
R1a. Buffer	
Fosfato buffer	0.04 mol/l, pH 6.9
Cloruro de magnesio	3 mmol/l
Surfactante	
R1b. Enzima/Coenzima	
Acy Coenzima Sintetasa	≥0.3 U/ml
Ascorbico oxidasa	≥1.5 U/ml

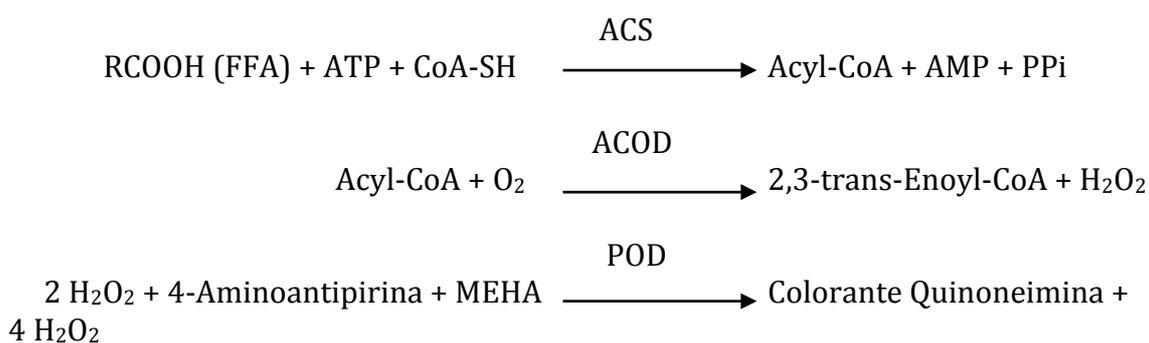
Coenzima A	0.9 mmol/l
ATP	5.0 mmol/l
4 aminoantipyrine	1.5 mmol/l
R2a. Diluyente enzimático	
Fenoxietanol	0.3%(w/v)
Surfactante	
R2b. Maleimide	10.6 mmol/l
R2c. Reactivo enzimático	
Acyl Coenzima A oxidasa	≥10 U/ml
Peroxidasa	7.5 U/ml
TOOS	1.2mmol/l
CAL. Estándar	

Procedimiento :

	Reactivo Blank S0	Standard SI	Muestra	Muestra blank
dd H2O2	10 µl	-	-	-
Standard	-	10 µl	-	-
Reactivo I	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Meclar, incubar durante 5 minutos a 37°C				
Reactivo 2	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Muestra	-	-	-	10 µl

Fundamento:

Los FFA se miden mediante un método colorimétrico enzimático:



La intensidad de color es proporcional a la concentración de ácidos grasos libres de la muestra, la cual se mide a 550 nm durante 10 min.

Cálculo de los datos:

La concentración de NEFA en una muestra se determina a través de la siguiente ecuación.

$$\text{mmol/l} = A_{\text{simple}} / A_{\text{standard}} \times \text{Concentración de standard}$$

Cuantificación de isoprostano

La cuantificación en plasma de los niveles de 8-isoprostano se realizó mediante un Kit EIA, (Cayman Chemical), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este ensayo está basado en la competencia entre 8-isoprostano y el conjugado 8-isoprostano-acetilcolinesterasa para un número limitado de sitios de unión de antisuero anti-conejo específico para 8-isoprostano. La incubación con el reactivo de Ellman's produce un producto amarillo que absorbe a 412 nm. La intensidad de color, determinada espectrometricamente es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano. Los resultados se expresaron en pg/mL.

Preparación de reactivos:

Buffer para lavado: se diluye el buffer de lavado 10X hasta 1X con agua desionizada, agitando hasta la homogenización.

Dilución del anticuerpo Anti-8-iso-PGF2 α : inmediatamente antes de usarlo se diluye el anticuerpo Anti-8-iso-PGF2 α 1:1000 con el diluyente.

Dilución del conjugado 8-iso-PGF2 α -HRP: inmediatamente antes de usarlo se diluye el conjugado 1:80 con el diluyente.

Preparación de la solución substrato: antes de ser usado se atempera a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras: las muestras de plasma se atemperan y se

acidificación de muestras adicionando 100 μL de HCl 1N.

Elaboración de la curva standard mediante la realización de diluciones seriadas del standard de 8-iso-PGF2 α .

Protocolo del ensayo:

Se añaden 100 μL del anticuerpo Anti-8-iso-PGF2 α diluido a los pocillos de la placa. Se lava la placa 5 veces con 300 μL de buffer de lavado 1X. En un tubo se mezclan 55 μL de la muestra de plasma y 55 μL del 8-iso-PGF2 α -HRP conjugado y se añaden 100 μL a la placa. Finalmente se añaden 100 μL de solución substrato a cada placa y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos para proceder a su lectura en el espectrofotómetro a 412 nm.

Analisis de los datos

Los patrones de DGGE fueron analizados mediante el software MicroSeq version 2.1.1. Las similitudes entre los perfiles de DGGE obtenidos con los primers universales fueron determinados usando el coeficiente Dice y el UPGMA (unweighted-pair group method with the arithmetic average) a través del software BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths, Bélgica). El numero de bandas de cada individuo en cada perfil DGGE fué considerado como un indicador de diversidad de la microbiota fecal.

El análisis estadístico fué realizado con el programa informatico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). El tamaño muestral fue calculado para obtener una diferencia en la media del número de bacterias entre el grupo de niños con DM1 y niños sanos de al menos 2×10^5 copias/gramo de heces, con una potencia del 80%, un error alfa de 0.05 y una desviación estándar estimada entre grupos de 1.13×10^5 copias/gramo de heces (datos obtenidos de Guo y col, 2008). Se necesitarían 6 niños en cada grupo. Aún así, en nuestro estudio hemos incrementado el número a

16 niños diabéticos tipo 1 y 16 controles sanos. Los valores de copias bacterianas han sido convertidos a valores logarítmicos antes de su análisis estadístico. Para valorar los cambios en el número de bacterias, así como los cambios bioquímicos y de estrés oxidativo entre ambos grupos utilizamos el test U Mann-whitney. El coeficiente de correlación de Spearman fue calculado para estimar las correlaciones lineales entre variables. Se realizaron análisis de regresión múltiple para identificar bacterias individualmente como predictores independientes del nivel de glucosa plasmática. La significación estadística fue establecida en todos los casos para valores de $P < 0.05$. Todos los datos fueron presentados como media \pm SD.

RESULTADOS

Datos antropométricos y bioquímicos

Los datos obtenidos tras el análisis de las variables antropométricas y bioquímicas de los niños con DM1 y niños sanos se muestran en la (Tabla 2). Después del análisis estadístico solo se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles de glucosa y hemoglobina glicada (HbA1c), los cuales fueron significativamente más altos en niños con DM1. Además, dado que los niños sanos y diabéticos fueron pareados para el tiempo de lactancia materna y modo de parto, no se encontraron diferencias significativas en estas variables.

Tabla 2. Variables antropométricas y bioquímicas en niños sanos y niños con DM1

	Niños Sanos	Niños con DM1	P
N	16	16	
N varones/mujeres	8/8	8/8	
Parto vaginal /Cesarea	12/4	12/4	
Edad al debut (meses)		24.62 \pm 1.52	
Duración de diabetes (años)		4.84 \pm 1.79	
Edad (años)	7.48 \pm 0.87	7.16 \pm 0.72	0.266
BMI (kg/m²)	16.35 \pm 0.82	16.57 \pm 0.95	0.489
Peso (kg)	25.15 \pm 2.12	24.88 \pm 1.98	0.712

Talla (cm)	120.65 ± 5.05	118.48 ± 4.96	0.211
Peso al nacimiento	3.33 ± 0.19	3.42 ± 0.24	0.249
Glucosa (mg/dL)	84.61 ± 1.99	158.56 ± 3.78	0.001
HbA1c (%)	4.47 ± 0.21	7.63 ± 0.43	0.001
Trigliceridos (mg/dL)	56.54 ± 6.43	56.93 ± 4.92	0.849
Colesterol (mg/dL)	162.84 ± 11.46	164.89 ± 9.76	0.590
Tiempo de lactancia maternal (meses)	3.98 ± 1.32	4.00 ± 1.12	0.963

Los valores son representados como media ± SD.

Los datos han sido analizados usando el test de U Mann-Whitney. Los valores son significativamente diferentes para * $P < 0.05$

PCR-DGGE e identificación de bandas bacterianas

La identificación de los perfiles de bandas bacterianas en los sujetos de ambos grupos de estudio y su posterior comparación puso de manifiesto la existencia de diferencias entre grupos tanto en la presencia o ausencia (cualitativo) como en la intensidad (cuantitativo) de las bandas entre niños sanos y niños diabéticos.

Los perfiles de bandas DGGE mostraron diferencias en el número de bandas entre los dos grupos de estudio. El análisis de la diversidad de la microbiota mostró que la media de bandas fue de 13.85 ± 3.87 para niños sanos y 11.63 ± 3.64 para los niños diabéticos, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, algunas bandas fueron vistas en los patrones de todos los niños (en calles diferentes pero en la misma posición) indicando que algunas especies de la microbiota predominante fueron comunes para todos los niños.

El coeficiente de similaridad Dice fue usado para calcular los índices de similaridad entre perfiles de bandas de DGGE relativos a las muestras de los niños sanos y diabéticos. La media del índice de similiaridad intra-grupo fue de 47.39% para niños sanos y 37.56% para niños diabético y la del índice de similaridad inter-grupos fue de 26.69% (Tabla 3).

Tabla 3. Diversidad y similitud de la microbiota de niños con DM1 y niños sanos.

	Diversidad	Similitud	
	DGGE bandas ^a (means ± SD)	Intra grupo ^b	Inter group ^c
Sanos	13.85 ± 3.87	47.39 ± 4.35	26.69 ± 6.78
Diabeticos	11.63 ± 2.99	37.56 ± 5.67	
P*	0.105	0.001	0.000

Los valores son representados como media ± SD.

Los datos han sido analizados usando el test de U Mann-Whitney. Los valores son significativamente diferentes para * $P < 0.05$

^a Número de bandas de DGGE producidas por cada muestra analizada

^b Coeficiente Dice de similitud comparando perfiles de bandas DGGE en individuos del mismo grupo.

^c Coeficientes Dice de similitud comparando perfiles de bandas DGGE entre el grupo de niños diabeticos tipo 1 y grupo de niños sanos.

Los geles de DGGE y los resultados del análisis filogenético de cluster son mostrados en la Figura 9. Este análisis de cluster mostró que la similitud intra-grupo tanto para el grupo de niños diabéticos como para el de sanos fue significativamente más alta que la similitud inter-grupo. Estos resultados demuestran que la microbiota dominante en el grupo de niños sano fue diferente de la del grupo de niños con DM1.

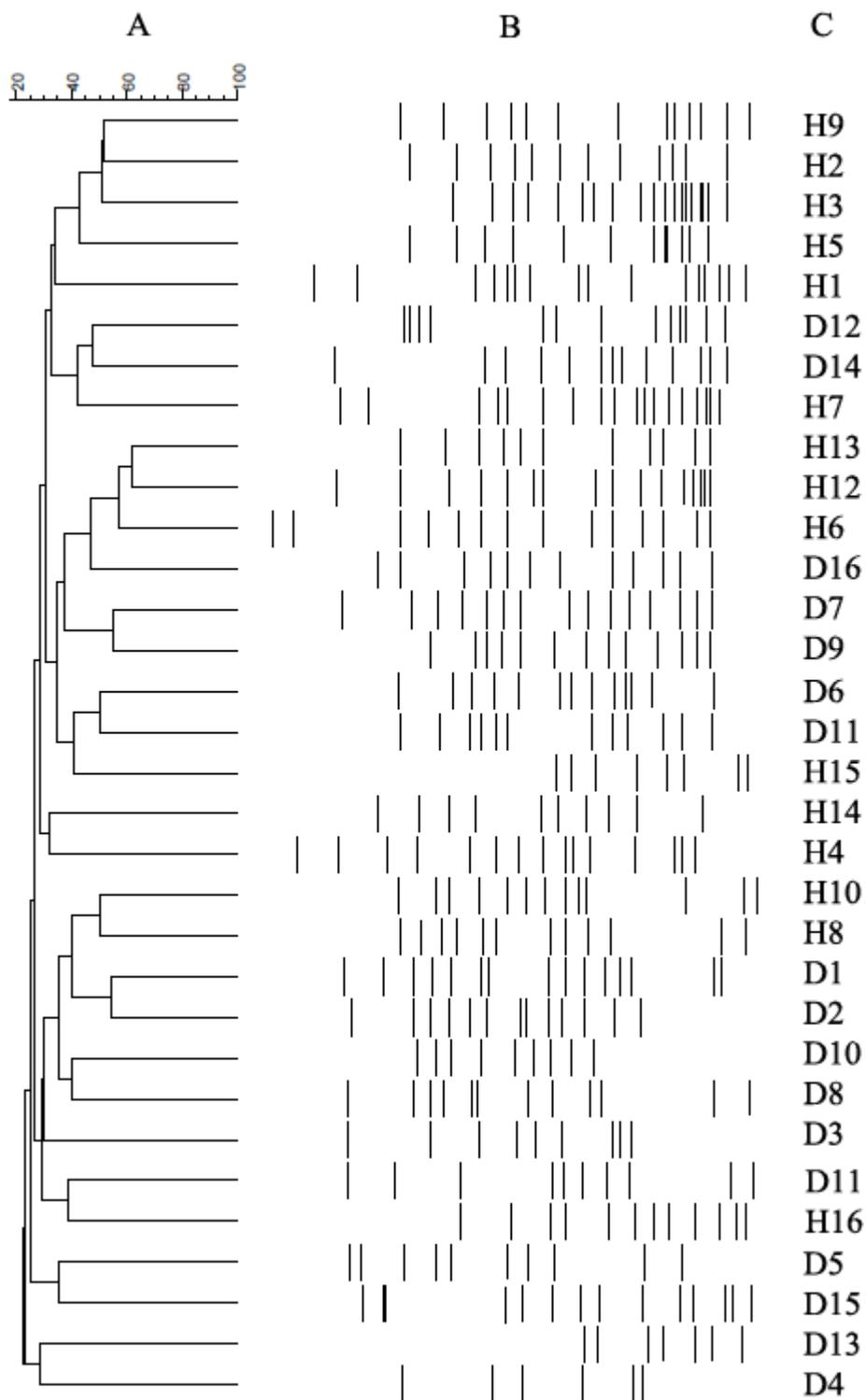


Figura 9. Dendrogramas de patrones de bandas de electroforesis obtenidas DGGE con primers universales en muestras de heces procedentes de sujetos sanos (H) y sujetos con DM1 (D). A: Análisis de cluster; B: perfiles bandas obtenidos mediante DGGE de las muestras de heces.

Tabla 4. Identificación bacteriana tras la secuenciación de las bandas obtenidas mediante DGGE en las muestras de heces de los niños sanos y los niños diabéticos.

Identificación	Sanos ^a (n=52)	Diabetes ^a (n=50)	Secuencia ^a Similitud (%)
Phylum Firmicutes			
<i>Genus Veillonella</i>	4 (7.7%)	9 (18%)	99.97
<i>Genus Bacillus</i>	0	2 (4%)	99.82
<i>Genus Clostridium</i>	6 (11.5%)	15(30%)	99.95
<i>Genus Gemella</i>	4 (10%)	2 (4%)	99.86
Phylum Fusobacteria			
<i>Genus Leptotrichia</i>	4 (7.7%)	3(6%)	99.94
Phylum Actinobacteria			
<i>Genus Bifidobacterium</i>	6 (11.5%)	0	99.75
<i>Genus Eggerthella</i>	0	4 (8%)	99.90
Phylum Proteobacteria			
<i>Genus Desulfovibrio</i>	4 (7.7%)	3(6%)	99.90
Phylum Bacteroidetes			
<i>Genus Prevotella</i>	16 (30.7%)	0	99.68
<i>Genus Bacteroides</i>	5 (9.6%)	10 (20%)	99.89
<i>Genus Pedobacter</i>	3 (5.8%)	2(4%)	99.47

^a Se refiere a la frecuencia (y porcentaje) de cada género bacteriano único en el grupo de DM1 y el grupo de sanos.

"n" número de bandas secuenciadas e identificadas en cada grupo de estudio

N= 16 sujetos por grupo

Todas las bandas de los perfiles de todos los niños sanos y diabéticos del estudio fueron clonadas y secuenciados para identificar la microbiota dominante y las secuencias fueron analizadas mediante el software MicroSeqID v2.1.1. La identificación mostró que la mayoría de las bacterias presentadas en nuestros patrones de bandas correspondieron a 5 filos (Tabla 4).

La mayoría de las secuencias pertenecían a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y el resto estuvo distribuido entre los filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Proteobacteria*. Además, observamos importantes diferencias en el ratio de distribución de los diferentes géneros dentro de los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* entre

los niños sanos y diabéticos. De hecho, en los niños diabéticos encontramos un aumento en la frecuencia de aparición de *Clostridium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Eggerthella* y *Bacillus* así como una desaparición de *Prevotella* y *Bifidobacterium* en comparación con los niños sanos (Tabla 4).

Análisis cuantitativo de la microbiota intestinal entre niños diabéticos y sanos

Las diferencias en el tamaño de las poblaciones bacterianas fueron valoradas en las muestras de heces de ambos grupos. Los resultados obtenidos de los estudios realizados mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) se muestran en las tablas 5 y 6.

Se encontraron diferencias relevantes en el número de bacterias a nivel de filo entre los niños diabéticos y sanos. El número de *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* fueron significativamente diferente entre los 2 grupos, mientras que la cantidad de *Proteobacteria* y *Fusobacteria* fueron similares. En el grupo de niños diabéticos, el número de *Actinobacteria* y *Firmicutes* estuvieron significativamente disminuidos, mientras que los *Bacteroidetes* estuvieron significativamente aumentados respecto a los niños sanos. Además el cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* fue significativamente más bajo en los niños diabéticos que en los niños sanos.

Dentro de los *Firmicutes*, las cantidades de *Veillonella* y del grupo *Blautia coccoide-Eubacterium rectale* fueron significativamente más alta y más baja respectivamente en el grupo de niños diabéticos comparado con el grupo de niños sanos. No obstante, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de *Enterococcus* entre los dos grupos.

Dentro de los *Bacteroidetes*, la cantidad de *Bacteroides* fue significativamente más alta, mientras que el número de *Prevotella* fue significativamente más baja en los niños diabéticos al compararlos con los niños sanos. Finalmente dentro del filo *Actinobacteria*,

la cantidad de *Bifidobacterium* fue significativamente más baja en los niños diabéticos.

Tabla 5. Cuantificación mediante qPCR de los filos presentes en la microbiota de los niños sanos y los niños con DM1

	Niños Sanos	Niños con DM1	P*
<i>Proteobacteria</i>	7.74 ±0.64	7.97±1.12	0.481
<i>Actinobacteria</i>	6.32±0.45	5.47±0.93	0.003
<i>Fusobacteria</i>	6.61±1.19	6.99±1.28	0.391
<i>Firmicutes</i>	9.85±0.43	6.54±0.56	0.001
<i>Bacteroidetes</i>	9.98±0.74	10.92±0.83	0.002
<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	0.97±0.19	0.62±0.24	0.001

Los valores son representados como media ± SD and expresadas como log₁₀ copias/gramo of heces. N= 16 sujetos por grupo.

La relación entre ambos grupos fueron analizadas usando test de U Mann-Whitney U. Los valores fueron significativamente diferentes para *P <0.05

Tabla 6. Generos y grupos dentro de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* presentes en la microbiota de los niños sanos y niños con DM1

	Niños sanos	Niños diabéticos	P*
<i>Prevotella</i>	10.95 ± 0.57	9.03 ± 0.99	0.001
<i>Clostridium</i>	4.85 ± 0.34	6.87 ± 0.52	0.001
<i>B. Coccoides-E rectale</i>	8.64±0.72	6.99±0.47	0.001
<i>Enterococcus</i>	5.80 ± 1.35	5.94± 1.21	0.852
<i>Veillonella</i>	6.76±0.82	8.93±1.12	0.001
<i>Bifidobacterium</i>	5.65±1.14	3.12±0.97	0.001
<i>Lactobacillus</i>	4.23 ± 0.36	3.47 ± 0.43	0.001
<i>Bacteroides</i>	8.64 ±0.45	10.67 ± 0.63	0.001

Los valores son representados como media ± SD and expresadas como log₁₀ copias/gramo of heces. N= 16 sujetos por grupo.

La relación entre ambos grupos fueron analizadas usando test de U Mann-Whitney U. Los valores fueron significativamente diferentes para *P <0.05

Relación entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles de glucemia en niños con DM tipo 1

En los niños diabéticos, nosotros hemos encontrado una correlación univariante entre la cantidad de grupos bacterianos específicos y los niveles de glucosa plasmática.

(*Bifidobacteria* r=-0.797, P=0.008; *Lactobacillus* r=-0.698, P<0.05;

Firmicutes/Bacteroidetes r=-0.473, P<0.05; *Clostridium* r=0.676, P<0.05) y los

niveles HbA1c (*Firmicutes/Bacteroidetes* r=-0.765, P=0.012; *Bifidobacterium* r=-

0.573, P<0.05; *Firmicutes* r=-0.559, P<0.05; *Clostridium* r=0.452, P<0.05). Mediante,

un análisis de regresión múltiple que incluyó todos los grupos bacterianos analizados se encontró que solo la reducción en el número de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* estuvo asociado al aumento de los niveles de glucosa plasmáticos ($P < 0.05$, $\beta = -0.476$, $R^2 = 0.587$; y $P = 0.012$, $\beta = -0.687$, $R^2 = 0.539$, respectivamente) mientras que niveles más altos de HbA1c estuvieron asociados con una disminución del cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* ($P < 0.001$, $\beta = -1.047$, $R^2 = 0.781$) y un aumento en el número de *Clostridium* ($P = 0.016$, $\beta = 0.867$, $R^2 = 0.499$).

Diferencias de estrés oxidativo entre niños diabéticos y sanos

Tras el análisis de marcadores de estrés oxidativo como NEFA e isoprostano, hemos encontrado diferencias significativas en los valores de NEFA entre ambos grupos de estudio ($p = 0,03$), pero no en los niveles de isoprostano ($p = 0.65$) a pesar de que sus valores fueron más altos en el grupo de niños diabéticos. Tras realizar análisis de correlaciones, encontramos que en el grupo de diabéticos existe una correlación positiva entre los valores de NEFA y el número de enterococos ($r = 0,803$, $p = 0,0216$) y una negativa con la cantidad de *Bifidobacterias* ($r = -0,536$, $p = 0,040$). Con respecto a los valores de isoprostano, se encontraron correlaciones positivas con el número de *Firmicutes* ($r = 0,814$, $P = 0,014$), *Fusobacterias* ($r = 0,714$, $P = 0,028$) y *Bacteroides* ($r = 0,713$, $P = 0,047$) y negativa con el número de enterobacterias ($r = -0,714$, $p = 0,047$). En el grupo de niños sanos solo se encontró una correlación positiva entre los niveles de NEFA y el número de *Prevotella* ($r = 0,715$, $p = 0,046$).

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que demuestra que existen diferencias en la composición de la microbiota fecal entre sujetos sanos y sujetos con DM tipo 1. Actualmente no existe ningún estudio similar en niños con DM tipo 1 que haya

utilizado simultaneamente el análisis del perfil bacteriano mediante DGGE, el análisis de clusters mediante dendograma filogenético UPGMA, la secuenciación y el análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), para explicar estas diferencias. Para poder determinar las características de la microbiota intestinal basándonos únicamente en las características de la DM tipo 1, nosotros hemos excluido la influencia de factores fisiológicos como la edad, el género, los hábitos dietéticos y la raza. Además, hemos controlado el modo de parto y la duración de la lactancia materna. Debido a que estudios previos sobre la composición de la microbiota intestinal durante el primer año de vida y estudios epidemiológicos en humanos con riesgo genético de padecer DM tipo 1 han sugerido que una corta duración de lactancia materna y la alimentación precoz con proteínas de leche de vaca pueden modular el desarrollo de autoinmunidad a célula beta, clínica de DM tipo 1 o ambos (Stuebe A y col, 2009, Vaarala O y col, 2011, Knip M y col, 2011).

El análisis DGGE de la microbiota fecal predominante mostró que la diversidad bacteriana fue mayor en niños sanos respecto a niños con DM tipo 1, aunque la diferencia no fue significativa. Resultados similares fueron descritos por Wu et al en pacientes con DM tipo 2 comparados con sujetos sanos (Wu X y col, 2010). Además, en análisis fecal mediante DGGE reveló una diferencia significativa en el índice de similaridad intra-grupo en niños con DM tipo 1 con respecto a niños sanos.

Por otro lado, el índice de similaridad intra-grupo en ambos grupos fue significativamente más alto que el índice de similaridad inter-grupo. En otras palabras, los perfiles de DGGE de los pacientes sanos fueron más similares entre sí, que los de los niños diabéticos. Estos datos sugieren que el estado diabético puede influenciar grupos bacterianos específicos de la comunidad de la microbiota

intestinal.

Los resultados de la secuenciación de las bandas de DGGE previamente clonadas también revelaron diferencias en la composición de microbiota intestinal en los dos grupos de estudio. En estudios previos, Giongo y col, 2011, Wu y col, 2010 y Gill y col, 2006 mostrarón que la microbiota intestinal de sujetos sanos y sujetos diabéticos está compuesta predominantemente por *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Sin embargo, observaron grandes diferencias en la frecuencia de aparición de cada género de bacteria. Similarmente, nosotros encontramos en niños con DM1 un aumento en la frecuencia de aparición de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Bacillus* y *Eggerthella* y una desaparición de *Prevotella* y *Bifidobacterium* en comparación con los niños sanos. Estos resultados sugieren que los generos de la microbiota dominante son diferentes en niños con DM1 comparados con niños sanos. Recientemente, tres grupos sólidos, denominados "enterotipos", los cuales no son específicos de una nación o continente han sido identificados. La asignación del microbioma de un individuo a un enterotipo determinado se basa en el número de bacterias en el mismo de uno de estos tres géneros: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) o *Ruminococcus* (enterotipo 3) (Arumugam M y col, 2011). En este estudio, dentro de los *Bacteroidetes*, el género *Bacteroides* fue el más frecuente en el grupo de los diabéticos, mientras que el género *Prevotella* se asoció al grupo de los niños sanos. Por lo tanto, el microbioma intestinal de los niños diabéticos podría clasificarse como enterotipo 1 y el microbioma de los niños sanos podría clasificarse como enterotipo 2. No obstante, como la DGGE es considerada una herramienta semicuantitativa para la monitorización de la dinámica de las especies bacterianas predominantes en la microbiota intestinal, en nuestro estudio realizamos un análisis adicional mediante qPCR para obtener

una estimación cuantitativa de los cambios encontrados en la microbiota intestinal entre los niños diabéticos y sanos. Observando diferencias cuantitativas significativas entre los principales filos y generos microbianos presentes en las heces de los niños diabéticos y sanos. En contraste con la situación en niños sanos nosotros hemos encontrado un aumento significativo en la cantidad de *Bacteroidetes* y una disminución significativa en el número de *Firmicutes* y Actinobacteria en los niños con DM tipo 1. Sin embargo la mayor diferencia entre los dos grupos fue encontrada en el número de bacterias a nivel de género. El resultado más destacable fue el aumento significativo en el número de *Clostridium*, *Bacteroides* y *Veillonella* en el grupo de niños diabéticos, mientras que el número de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, el grupo *Blautia coccoides/Eubacterium rectale* y el genero *Prevotella* descendieron significativamente en los niños con DM tipo 1. Nuestros hallazgos con respecto a la microbiota intestinal en los niños diabéticos están acordes con las observaciones de otros estudios realizados en humanos y en animales. Roesch y col encontraron niveles más altos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en ratas BB-DR mientras que, los *Bacteroides* y *Clostridium* fueron más abundantes en ratas BB-DP. Además, los niveles de *Bifidobacterium* han sido previamente, relacionados con una mejoría en el metabolismo hidrocarbonado y la resistencia a la insulina asi como con bajo grado de inflamación (Philippe D y col, 2011 , Cani PD y col, 2009).

La disminución significativa en el número de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* observada en los niños con DM tipo 1 en nuestro estudio estuvo relacionada con mayores niveles de glucosa plasmática, como lo indica la correlación negativa encontrada. Además, el análisis de regresión mostró que esta disminución en el número de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* podría estar asociada con los niveles de

glucosa plasmática en los niños diabéticos. En contraste con este hallazgo, Brown y col encontraron que los *Lactobacillus* y los *Bifidobacterium* fueron más abundantes en niños con DM tipo 1 que en sujetos sanos (Brown CT y col, 2011).

Ambos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tienen especies con características probióticas y éstos han sido asociados con efectos positivos para el huésped en el intestino grueso (Tzounis X y col, 2011). Los *Lactobacillus* actúan como barrera física, inhibiendo el paso de antígenos bacterianos, participando en la degradación de componentes tóxicos, liberando nutrientes y produciendo componentes anti-inflamatorios (Valladares R y col, 2010). Por otro lado, los *Bifidobacterium* disminuyen la endotoxemia intestinal y mejoran la función de barrera de la mucosa intestinal (Cani PD y col, 2009). Adicionalmente, ambos grupos bacterianos estimulan la producción de ácidos orgánicos beneficiosos e inhiben la colonización del epitelio intestinal por bacterias patógenas. Mediante la utilización de un modelo de monocapa epitelial se mostró que *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Lactobacillus casei DN-114-001* protegieron la función de la barrera intestinal contra la redistribución de las proteínas de la unión inducida por *Escherichia Coli* (Johnson-Henry KC y col, 2008). Además, Valladares y colaboradores determinaron que la administración de *Lactobacillus Johnsonii* aislados de ratas resistentes a la diabetes, retrasa o inhibe el inicio de DM tipo 1 en ratas BB susceptibles de desarrollar diabetes (Valladares R y col, 2010).

Las *Bifidobacterias* y los *Lactobacillus* tienen la capacidad de producir ácido láctico el cual es convertido en butirato por bacterias productoras de butirato en el intestino (Brown CT y col, 2011). Barcenilla y col. mostró que la mayoría de los aislados productores de butirato en muestras fecales humanas están relacionadas con el grupo *Blautia coccoides-Eubacterium rectale* (Barcenilla A y col, 2000).

Estudios previos han mostrado que el butirato induce síntesis de mucina (una glicoproteína producida por el huésped que ayuda a mantener la integridad del epitelio intestinal) (Burger-van Paassen N y col, 2009), disminuye el transporte bacteriano a través del epitelio y mejora la integridad intestinal mediante el aumento de ensamblaje de las uniones estrechas (Lewis K y col, 2010). Adicionalmente, el género *Prevotella* es responsable de la degradación de esta mucina.

De este modo, la disminución significativa en *Blautia coccooides-Eubacterium rectale* group y *Prevotella* que nosotros hemos encontrado en niños con DM tipo 1 comparado con niños sanos podría indicar una reducción en la síntesis de mucina por el huésped y una pérdida de esta mucina en la capa epitelial del intestino, lo cual podría dar lugar a una alteración significativa en la permeabilidad intestinal (Peng LY y col, 2009, Wright DP y col, 2000, Lin HV y col, 2012). Otros estudios han descrito una asociación entre DM tipo 1 y una alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal en humanos y en ratones diabéticos no obesos (NOD) y modelos ratas BB (Watts T y col, 2005, Lee AS y col, 2010, Mathis D y col, 2012).

No obstante, nosotros hemos observado un aumento significativo en el número de *Clostridium*, *Bacteroides* y *Veillonella* en los niños diabéticos con respecto a niños sanos. Estas bacterias son capaces de fermentar glucosa y lactato a propionato, acetato y succinato, pero estos ácidos grasos de cadena corta no inducen síntesis de mucina (Burger-van Paassen N y col, 2009). Esta situación podría reducir el ensamblaje de las proteínas de unión, generando un incremento en la permeabilidad intestinal en los niños con DM1 (Brown CT y col, 2011). Además, este aumento fue acompañado por una correlación positiva significativa entre los

niveles plasmáticos de glucosa y HbA1 y el número de Clostridium en los niños diabéticos.

También, hemos encontrado una diferencia a nivel de filo entre *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, con un significativo descenso en el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* en niños con DM tipo 1 comparado con niños sanos. Además, hallamos una correlación negativa entre este ratio y los niveles de glucosa y HbA1c en niños diabéticos, lo cual podría explicar el aumento significativo de los niveles de glucemia en este grupo. De acuerdo con esto, Giongo y col observaron que el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* en niños con DM tipo 1 fue cambiando durante los primeros 6 meses después del nacimiento antes de desarrollar el trastorno autoinmune. Estos autores mostraron una disminución sucesiva en *Firmicutes* y un incremento en el número de *Bacteroidetes* en la flora intestinal hasta que los niños fueron diabéticos (Giongo A y col, 2011). Además, en sujetos con DM2 comparados con sujetos sanos también se ha descrito una disminución en el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (Larsen N y col, 2010). Lo opuesto ocurre en la obesidad, donde el desbalance es debido al incremento del ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*, indicando que la obesidad y la diabetes se asocian con diferentes grupos de la microbiota intestinal (Willing B y col, 2009). Esta diferencia en el ratio que se encuentra entre sujetos diabéticos y obesos podría ser debido a la dieta baja en calorías utilizada en sujetos diabéticos. De hecho, la monitorización de la microbiota intestinal de voluntarios obesos que recibieron una dieta baja en calorías durante un año mostró que en los voluntarios que habían perdido peso la proporción de *Firmicutes* disminuyó mientras que la proporción de *Bacteroidetes* aumentó.

Finalmente, el posible mecanismo que podría explicar la relación encontrada por

nosotros en este estudio entre la microbiota intestinal presente en niños DM tipo 1 y los niveles glucémicos observados en estos pacientes, podría estar relacionado con el papel de los ácidos grasos de cadena corta (como el butirato y propionato) producidos por la microbiota intestinal en la regulación de los niveles de ciertas hormonas intestinales (como polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP), péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y la grelina), los cuales tienen un importante efecto sobre el metabolismo hidrocarbonado (Lin HV y col, 2012). Además, Hum et al. han demostrado previamente una alteración en los patrones de secreción de hormonas intestinales en niños con DM tipo 1 el cual influyó en el control metabólico de la diabetes en estos pacientes (Huml M y col, 2011). Más estudios serán necesarios para demostrar este mecanismo propuesto.

Por otra parte, en este estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de 8-isoprostano entre niños con DM tipo 1 y niños sanos. Elevada excreción urinaria de isoprostanos ha sido repetidamente asociada con DM, no tanto así la concentración plasmática de éstos. En la actualidad existen pocos estudios y han sido realizados en los últimos 15 años en los que se haya relacionado la formación de isoprostanos en la diabetes (Natarajan R y col, 1996). Existen estudios específicos que reflejan este aumento de isoprostanos en DM tipo 1. Se ha observado que la excreción de 8 isoprostano en pacientes adultos con DM tipo 1 y/o DM tipo 2 fue el doble de la que se observó en sujetos sanos de similar edad (Takahashi K y col, 1992). Esta observación similar en la excreción de 8 isoprostano en los pacientes con DM tipo 1 y DM tipo 2 implica a la hiperglucemia como principal alteración metabólica, debido a que ésta es la característica fundamental en ambas poblaciones de pacientes. Estos autores también observaron una correlación significativa entre los niveles de glucosa plasmática y

la concentración urinaria de isoprostanos, sugiriendo que la peroxidación lipídica está relacionada con el control glucémico. Además, la observación que el tratamiento intensivo con agentes hipoglucemiantes disminuye los niveles de glucosa y la excreción urinaria de isoprostanos, apoya la idea que la hiperglucemia es responsable de la formación de la mayor parte de isoprostanos (Sampson NK y col, 2002).

Otros investigadores como Gopaul et al, encontraron en 39 pacientes con DM tipo 2 un incremento tres veces mayor de isoprostanos esterificados comparado con sujetos controles, pero en este estudio no se observó una relación de los isoprostanos ni con el nivel de glucemia ni con el de lípidos (Gopaul y col, 1995). En otro estudio este mismo autor, describió un aumento agudo de los niveles de isoprostanos en el plasma de 27 pacientes con DM tipo 2 tras una sobrecarga oral de glucosa, aportando evidencia directa de la lesión oxidativa mediada por RLO (Gopaul y col, 2000). Catella- Lawson et al, describieron una tendencia hacia niveles aumentados de excreción urinaria de 8 isoprostanos en un grupo de 18 pacientes con DM, con una elevación estadísticamente significativa en pacientes con cetoacidosis diabética.(Catella-Lawson F y col, 1996). Vita et al, cuantificaron los niveles de isoprostanos esterificados en los lípidos plasmáticos. En los pacientes con DM las concentraciones de isoprostanos en plasma fueron significativamente elevadas comparado con las concentraciones medidas en los sujetos sin DM (Vita JA y col, 1998, John F. Keaney Jr y col, 2003). Sin embargo Vessby et al, utilizando la determinación de isoprostanos no pudieron demostrar que la mejoría del control glucémico esté asociado a una disminución del estrés oxidativo en pacientes con DM tipo 1 (Vessby J y col, 2001).

Además, en nuestro estudio se han observado diferencias significativas en los niveles de NEFA entre los niños diabéticos y los sanos. En estudios con DM y mal control metabólico se pueden encontrar niveles elevados de NEFA y no existiendo un aumento notable cuando existe un buen control metabólico (Groop LC y col, 1989) (Sørensen LP y col, 2011). Una clásica relación de feedback ha sido postulada entre la hormona de crecimiento (GH) y los NEFA. La GH tiene un efecto lipolítico directo en el tejido adiposo, apoyando la liberación de glicerol, NEFA y cuerpos cetónicos. (Vance, M.L. 1993). La reducción farmacológica de FFA está asociada con la liberación de GH. (Dieguez, C. & Casanueva, F y col, 1995). Coiro et al llevaron a cabo un estudio que evaluaba si el incremento de secreción de GH en pacientes con DM tipo 1 podría ser debido a una alteración en el mecanismo inhibitor debido a los FFA circulantes, ya que la hiperglucemia ejerce un efecto inhibitor habitualmente en la liberación de GH. La reducción de FFA con acipimox (un fármaco antilipolítico que inhibe la lipólisis y produce una reducción de FFA (Pontiroli A y col, 1990) es un estímulo para la secreción de GH en pacientes con DM tipo 1. La administración conjunta en este estudio de acipimox y GHRH produjo un marcado incremento de liberación de GH en sujetos con DM tipo 1 cuando los compararon con sujetos normales. Estos datos sugieren que los pacientes con DM tipo 1 tienen mayor capacidad secretora de GH que los sujetos normales pero los niveles endógenos de FFA ejercen un importante efecto inhibitor en los pacientes con DM tipo 1 (Coiro V y col, 1999). No existen referencias en la literatura que establezcan relación entre DM tipo 1, estrés oxidativo (isoprostano/NEFA) y microbiota intestinal. Nuestro estudio encontró una correlación negativa de los NEFA con la cantidad de Bifidobacterias en el grupo de sujetos con DM tipo 1. No obstante, solo existe una publicación que relaciona *Bifidobacterium* y NEFA en la literatura actual. En ella, leche de soja

fermetada por *Bifidobacterium breve* YIT 4065 fue administrada a ratas ooforectomizadas, las cuales mostraron un incremento en los niveles de HDL colesterol y una disminución en los niveles de VLDL y LDL colesterol así como, una disminución no significativa en los niveles de NEFA (Hiroko Kikuchi-Hayakawa y col, 1998). También en nuestro estudio se encontró en el grupo de diabetes correlaciones positivas de los valores de isoprostano con el número de *Firmicutes*. No existen datos publicados que relacionen directamente a *Firmicutes* e isoprostano en sujetos con DM tipo 1. Existen artículos que relacionan 8-isoprostano con enfermedades como diabetes y la aterosclerosis donde a través de la medición de F2 isoprostanos implican a los RLO en su patogénesis (Koenig W y col, 2006) (L. Flores y col, 2004).

En fumadores, que tienen un riesgo incrementado de desarrollar inflamación sistémica inducida a través de los radicales libres procedentes del tabaco, se ha realizado un ensayo clínico controlado, randomizado y doble ciego para la evaluación de parámetros de estrés oxidativo (F2 isoprostanos) y citoquinas inflamatorias tras la administración de un probiótico *Lactobacillus plantarum* strain 299 v durante 6 semanas evidenciando un descenso de 8 isoprostano entre otras parámetros inflamatorios (Naruszewicz M y col, 2002). Esta relación descrita entre isoprostano y NEFA con determinados filos de la microbiota intestinal abre un nuevo camino de estudio donde la microbiota se perfila como determinante ambiental implicado en su etiología.

CONCLUSIONES

1º Los resultados muestran que la microbiota encontrada en niños con DM tipo 1 difiere significativamente de la encontrada en niños sanos

2º La microbiota intestinal en niños diabéticos fue menos diversa que la microbiota

intestinal en niños sanos, la cual fue más diversa.

3° Existen diferencias significativas entre diabéticos y sanos en número de *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* y *Clostridium* y ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* que podrían estar implicadas en el nivel glucémico de niños diabéticos.

4° Además, la cantidad de bacterias productoras de ácido láctico, productoras de butirato y bacterias degradadoras de mucina, esenciales para mantener la integridad intestinal, fueron significativamente más bajas en diabéticos que en niños sanos. Estas diferencias bacterianas podrían ser responsables de la alteración de la permeabilidad intestinal previamente descrita en sujetos con DM tipo 1.

5° Es el primer estudio que evalúa simultáneamente la asociación de marcadores de estrés oxidativo con microbiota intestinal en relación a DM tipo 1. Se necesitan más estudios que nos permitan conocer el rol que juega la microbiota intestinal en el estrés oxidativo o viceversa.

6° Estos hallazgos podrían ser útiles para desarrollar estrategias de control de desarrollo de DM tipo 1 a través de la modificación de la microbiota intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-787
- Adlerberth, I., and Wold, A.E. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009;98:229-238
- Akira S, Takeda K. Toll like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499-511
- Alpan O, Bachelder E, Isil E, et al. Educated dendritic cells act as messengers from minor to naive T helper cells. *Nat Immunology* 2004; 5:615-622

- Amar J, Burcelin R, Ruidavets J, Cani P, Fauvel J, Alessi M, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219–23
- Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermudez-Humaran LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med* 2011;3:559–72
- Anderson AF, Lindberg M, Jakobson H, Bachhed F, Nyren P et al. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing, *PLoS ONE* 2008; 3(7):e2836
- Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part III: Biomarkers of oxidative stress and angiogenic growth factors. *Circulation* 2006; 113: e289-e292
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011, 473:174-180.
- Awney, Hala A. Effect of bifidobacterium on the lipid profile and oxidative stress biomarkers of male rats fed thermally oxidized soybean oil . *Biomarkers*, 2011; 16:445-452
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15718–23

- Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:979–84
- Bakewell L, Burdge GC, Calder PC. Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *Br J Nutr* 2006;96:93–99
- Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ: Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(4):1654-1661
- Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ: Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(4):1654-1661
- Basu, A., Basu, R., Shah, P., Vella, A., Rizza, R.A. & Jensen, M.D. (2001) Systemic and regional free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)*, 280, E1000–E1006
- Beck-Nielsen H, Vaag A, Poulsen P, Gaster M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects—experiences from relatives and twin studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:445–67
- Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287:2570-81
- Bell RA, Mayer-Davis EJ, Beyer JW, et al. Diabetes in non-Hispanic White youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diab Care* 2009;32(Supp. 2):S102-S111
- Benson, A.K., Kelly, S.A., Legge, R., Ma, F., Low, S.J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P.L., Nehrenberg, D., Hua, K., et al. Individuality in gut microbiota composition is a

complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010;107:18933–18938

- Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. PLoS One. 2010 May 17;5(5):e10667. Erratum in: PLoS One 2010;5

- Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance and disease. Gastroenterology 2004;127:300-309

- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen , HLA-A2. Nature 1987; 329:506-512

- Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. PLoS One 2011;6(10):e25792

- Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW: Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. PLoS One 2011;6(10):e25792

- Brugman S, Klatter FA, Visser JT, Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Rozing J, Bos NA: Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat: is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 49:2105–2108, 2006

- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E834–42
- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E834–42
- Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, van Goudoever JB, van Seuningen I, Renes IB: The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J* 2009;420(2):211–219
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., and Thomas, T. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108:14288–14293
- Buschard K, Pedersen C, Hansen SV, Hageman I, Aaen K, Bendtzen K. Anti-diabetogenic effect of fusidic acid in diabetes prone BB rats. *Autoimmunity* 14:101–104, 1992
- Calcinaro FDS, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S, Corneli RB, Ferretti E, Gulino A, Grasso F, De Simone C, Di Mario U, Falorni A, Boirivant M, Dotta F: Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Diabetologia* 48:1565–1575, 2005
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–72

- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waaget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470–81
- Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 2009;15(13):1546-58.
- Cani PD, Possemiers S, et al. “Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability”. *Gut* 2009;58(8):1091–103
- Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM: Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2- driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58(8):1091–1103
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Costello, E.K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.* 2011; 12, R50
- Catella-Lawson F, FitzGerald GA. Oxidative stress and platelet activation in diabetes mellitus. *Diabetes Res.Clin Pract.*1996;13-8
- Charkaluk ML, Czernichow P, Levy Marchal C. Incidence data of childhood onset type 1 diabetes in France during 1988 -1997: the case for a shift toward younger age at onset. *Pediatr Res* 2002; 52(6):859-862
- Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of beta cell specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004; 53(9):2330-2337
- Chow, J., Lee, S.M., Shen, Y., Khosravi, A., and Mazmanian, S.K. Hostbacterial symbiosis in health and disease. *Adv. Immunol.* 2010;107:243–274

- Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011;108 (Suppl 1): 4586–4591
- Clemente Postigo M, Queipo Ortuño MI, Murri M, Boto Ordoñez M, Pérez Martínez P, Andres Lacueva C, Cardona F, Tinahones Madueño FJ. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res* 2012 May;53(5):973-8
- Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005;206:277-295
- Coiro, V., Volpi, R., Capretti, L., Speroni, G., Caffarri, G., Marchesi, C. & Chiodera, P. (1999) Enhancement of the GH responsiveness to GH releasing stimuli by lysine vasopressin in type 1 diabetic subjects. *Clinical Endocrinology*, 51, 487–495
- Colman PG, Mc Nair Gellert S, et al. Development of autoantibodies to islet antigens during childhood: implications for preclinical type 1 diabetes screening. *Pediatr Diabetes* 2002; 3(3):144-148
- Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., and Knight, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694–1697
- Cutfield WS. Escher's stairs and type 1 diabetes incidence in childhood. *Pediatr Diabetes* 2008; 9 (3 Pt 1): 175-177
- DERI Study Group: Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes Epidemiology Research International Group. Diabetes* 1990;39:858-864

DERI Study Group: Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes Epidemiology Research International Group. Diabetes* 1990;39:858-864

Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006;21:517–23. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1035S

- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., and Relman, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008; 6:e280

- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.*2000; 655-73

- DiaMond Project Group. Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med* 2006;23(8):857 866

- Dieguez, C. & Casanueva, F.F. (1995) Influence of metabolic substrates and obesity on growth hormone secretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 6, 55–59

- Dokheel TM. An epidemic of childhood diabetes in the United States? Evidence from Alleghen County, Pennsylvania, Pittsburgh Diabetes Epidemiology Research Group. *Diab Care* 1993;16(12):1606-1611

- Dole VP. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest* 1956;35:150–154

- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107:11971–11975

- Eaton RP, Berman M, Steinberg D. Kinetic studies of plasma free fatty acid and triglyceride metabolism in man. *J Clin Invest* 1969;48:1560–1579
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-1638
- EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000; 355 (9207):873-876
- Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 2002;298:1414-1427
- Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation- a review. *Curr. Med Chem.* 2003;1723-40
- Furlanos S, Varney MD, TaitBD, et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases by lower risk human leukocyte antigen genotypes. *Diab Care* 2008;31(8):1546-1549.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:13780-13785
- Frayn KN, Williams CM, Arner P. Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci (Lond)* 1996;90:243–253
- Fredrik Karpe, Julian R. Dickmann,¹ and Keith N. Frayn¹ Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes* 2011;60:2441-249

- Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanism of action. Am. J Med 1994;5S-13S
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science 2006;312(5778):1355-1359
- Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. Isme J 2011;5(1):82–91
- Gopaul NK, Zacharowski K, Halliwell B, Anggård EE. Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F(2)-isoprostane levels. Free Radic Biol Med. 2000 Mar 1;28(5):806-14
- Gopaul, E.E. Änggård, A.I. Mallet, D.J. Betteridge, S.P. Wolff, J. Nourooz-Zadeh, Plasma 8-epi-PGF2 α levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus, FEBS Letters, Volume 368, Issue 2, 17 July 1995
- Gordon RS Jr. Unesterified fatty acid in human blood plasma. II. The transport function of unesterified fatty acid. J Clin Invest 1957;36:810–815
- Graser RT, et al. Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. J Immunol 2000; 164 : 3913-3918
- Green A, Patterson CC, The EURODIAB TIGER Study Group. Europe and Diabetes. Trends in the incidence of childhood -onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia* 2001;44 (suppl 8):B9-B16

- Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hobert AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB, Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med* 2000; 505-13
- Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 1989;84:205-213
- Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K: 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. *Lett Appl Microbiol* 2008;47(5):367-373
- Hao WL, Lee YK Microflora of the gastrointestinal tract. A review. *Methods Mol Biol* 2004;268:491-502
- Haynes, M., and Rohwer, F. The human virome. In *Metagenomics of the Human Body*, K.E. Nelson, ed. (New York: Springer) 2011:63-78
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-7. Shoelson S, Lee J, Goldfine A. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207-14 Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):215-21

- Huml M, Kobr J, Siala K, Varvařovská J, Pomahačová R, Karlíková M, Sýkora J: Gut peptide hormones and pediatric type 1 diabetes mellitus. *Physiol Res* 2011, 60:647-658
- Huurre, A., Kalliomaki, M., Rautava, S., Rinne, M., Salminen, S., and Isolauri, E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* 2008;93:236–240
- Hypponen E, Virtanen SM, Kenward MG, Knip M, Akerblom HK. Obesity, increased ñomear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diab Care* 2000;23 (12):1755-1760
- Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, Harewood L, Walters RG, Kutalik Z, et al. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 2011;478:97–102
- Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium . *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:6110-6115
- Jarret RJ. Type 2 [non-insulindependent] diabetes mellitus and coronary heart disease-chicken, egg or neither?. *Diabetologia* 1984; 26:99-102
- Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C., and Jansson, J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.*2007;1:56–66
- John F. Keaney Jr, Martin G. Larson, Ramachandran S. Vasan, Peter W.F. Wilson, Izabella Lipinska, Diane Corey, Joseph M. Massaro, Patrice Sutherland, Joseph A. Vita, Emelia J. Benjamin. Atherosclerosis and Lipoproteins. Obesity and Systemic Oxidative Stress. Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*2003; 23: 434-439

- Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM: Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infect Immun 2008;76(4):1340–1348
- Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM: Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infect Immun 2008;76(4):1340–1348
- Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. Am J Clin Nutr. 2008 Mar;87(3):534-8
- Kato Y, Yoshida A, Naito M, Kawai Y, Tsuji K et al. Identification and quantification of N(épsilon)-(Hexanoyl)lysine in human urine by liquid chromatography/tándem mass spectrometry. Free Radic Biol Med 2004; 37:1864-1874.
- Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. Cell 1993,74:1089-1100
- Knip M, Virtanen SM, Becker D, Dupré J, Krischer JP, Åkerblom HK; TRIGR Study Group: Early feeding and risk of type 1 diabetes: experiences from the Trial to Reduce Insulin-dependent diabetes mellitus in the Genetically at Risk (TRIGR). Am J Clin Nutr 2011;94(6):1814-1820
- Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1586

- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., and Ley, R.E. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108 (Suppl 1), 4578–4585.
- Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:197-209
- Kostraba JN, Gay EC, Cai Y, et al. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Colorado. *Epidemiology* 1992;3(3):232-238
- Kunapuli P, Lawson JA, Rodach J, FitzGerald GA. Functional characterization of the ocular prostaglandin f2alpha (PGG2alpha) receptor. Activation by the isoprostane, 12 -iso-PGF2alpha. *J Biol. Chem.* 1997;271:47-54
- L. Flores, M. Vidal, J. Abian, A. Casest, J. Ma Campistol, J. Clarias, S. Larios and E. Esmaties. The effects of smoking and its cessation on 8 - epi- PGF2 and transforming growth factor beta 1 in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Medicine* 2004; 21:285-289
- Lai KK, Lorca GL, Gonzalez CF. Biochemical properties of two .Cinnamoyl esterases purified from a lactobacillus johnsonii strain isolated from stool samples of diabetes resistant rats. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:5018-5024
- Lanning DK, Rhee KJ. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005;26:419-425
- LaPorte RE, Orchard TJ, Kuller LH, et al. The Pittsburgh Insulin Dependent Diabetes Mellitus Registry: the relationship of insulin dependent diabetes mellitus incidence to social class. *Am J Epidemiol* 1981;114(3):379-384
- Larsen N, Vogensen FK, van den Beg FWL, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M: Gut microbiota in human

adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010, 5:e9085

- Lee AS, Gibson DL, Zhang Y, Sham HP, Vallance BA, Dutz JP: Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia* 2010, 53:741–748

- Lee KH, Wucherpfenning KW, Wiley DC. Structure of a human insulin peptide-HLA DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2001;2:501-507

- Lernmark A, Ott J. Something is hot sometimes it's not. *Nat Genet* 1998;19(3):213-214

- Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Soderholm JD, Sherman PM, McKay DM: Enhanced Translocation of Bacteria Across Metabolically Stressed Epithelia is Reduced by Butyrate. *Inflamm Bowel Dis* 2010, 16:1138–1148

- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:11070–11075

- Libman IM, LaPorte RE. Changing trends in epidemiology of type 1 diabetes mellitus throughout the world: how far have we come and where do we go from here. *Pediatr Diabetes* 2005;6(3):119-121

- Like AA, Guberski DL, Butler L: Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor rats. *Diabetes* 40:259 –262, 1991

- Lim EL, Tomita AV, Thilly WG, Polz MF. Combination of competitive quantitative PCR and constant denaturant capillary electrophoresis for high resolution detection and enumeration of microbial cells. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:3897-3903

- Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ Jr, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, Hubert JA, Szeto D, Yao X, Forrest G, Marsh DJ: Butyrate and propionate protect against diet-Induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* 2012, 7:e35240
- Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ Jr, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, Hubert JA, Szeto D, Yao X, Forrest G, Marsh DJ: Butyrate and propionate protect against diet-Induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* 2012, 7:e35240
- Lopez-siguero JP, Del pino-de la fuente, A. Martínez-Aedo M.J., Moreno-molina, JA. Increased Incidence of Type 1 Diabetes in the South of Spain. *Diabetes Care*, 2002, 25 : 1099
- Lorenz RG, Chaplin DD, Mc Donald KG, et al. Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin sufficient B lymphocytes, lymphotoxin sufficient B lymphocytes, lymphotoxin in beta receptro, and TNF receptor I function. *J O,,impñ* 2003; 170:5475-5482
- Mathis D, Benoist C: The influence of the microbiota on type-1 diabetes : on the threshold of a leap forward in our understanding. *Immunol Rev* 2012, 245:239-249
- Matsuzaki T, Nagata Y, Kado S,et al. Prevention of onset in an insulin dependent diabetes mellitus model , NOD mice, by oral feeding of Lactobacillus casei. *APMIS* 1997;105:637-642
- Mayer-Davis EJ, Bell RA, Dabaelea D, et al. The many faces of diabetes in American youth:type 1 and type 2 diabetes in five race and ethnic population: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diab Care* 2009;32 (Supl. 2): S99S101

- Medici F, Hawa M, Ianari A, Pyke DA, Leslie RD. Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia* 1999;42:146–50
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106:255-258
- Mente A, Yusuf S, Islam S, McQueen MJ, Tanomsup S, Onen CL, et al. Metabolic syndrome and risk of acute myocardial infarction a case-control study of 26,903 subjects from 52 countries. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2390-8
- Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond).* 2012 Jun;36(6):817-25
- Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S.A., Wu, G.D., Lewis, J.D., and Bushman, F.D. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 2011; 21:1616–1625
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a noncyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 1990;9383-7
- Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometric quantification of F₂-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* 1999; 3-12
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded?. *Diabetes Care* 2010;33(10):2277-2284

- Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 2001;1:59-67
- Naruszewicz, M.; Johansson, M.L.; Zapolska-Downar, D.; Bukowska, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76, 1249–1255
- Natarajan R, Lanting L, Gonzales N, Nadler J. Formation of an F2-isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am.J Physiol* 1996; H159-H165
- Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004;113:1582–1588
- Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 2003;290(13):1713-1720
- Nystrom L, Dahlquist G, Rewers M, Wall S. The Swedish childhood diabetes study. An analysis of the temporal variation in diabetes incidence 1978-1987. *Int J Epidemiol* 1990;19:141-146
- O'Hara, A.M., and Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO* 2006 *Rep.* 7:688–693
- Onkamo P, Vaanane S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes –the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 1999; 42 (12) : 1395-1403
- Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial- Type 1. *Diab Care* 2009; 32 (12): 2269-2274.

- Padaiga Z, Tuomilehto J, Karvonen M, et al. Seasonal variation in the incidence of type 1 diabetes mellitus during 1983 to 1992 in the countries around the Baltic Sea. *Diabetes Med* 1999;16 (9):736-743
- Palmer C, Bik EM, Di Giulio DB, et al. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5:1556-1573
- Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009;373(9680):2027-2033
- Patterson KY, Bhagwat SA, Williams JR, Howe JC, Holden JM, USDA database for the choline content of common foods:release two. January 2008(<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place>)
- Penders J, Thijs C, Vink C et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota the composition of the intestinal microbiota during the first year of life. *Pediatrics* 2006;118:511-521
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118(2):511-521. 20.
- Peng LY, Li Z, Green RS, Holzman IR, Lin J: Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 2009, 139:1619-1625
- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C., et al; NIH HMP Working Group. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.*2009; 19:2317-2323
- Philippe D, Favre L, Foata F, Adolfsson O, Perruisseau-Carrier G, Vidal K, Reuteler

G, Dayer-Schneider J, Mueller C, Blum S: Bifidobacterium lactis attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. *World J Gastroenterol* 2011;17(4):459-469

- Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;41:1241-8

- Pitkaniemi J, Onkamo P, Tuomilehto J, Arjas E. Increasing incidence of type 1 diabetes-role for genes? *BMC Genet* 2004,5(1):5

- Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 2007;50:1267-76

- Pontiroli, A.E., Lanzi, R., Monti, L.D. & Pozza, C. (1990) Effect of acipimox, a lipid lowering drug on growth hormone (GH) response to GH- releasing hormone in normal subjects. *Journal of Endocrinological Investigation*, 13, 539-542

- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):59-65

- Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang

- A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55-60
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al; MetaHIT Consortium. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59–65
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S., McCulle, S.L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C.O., et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;108:Suppl 1, 4680–4687
- Rayfield EJ, Seto Y. Viruses and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes* 1978;27 (11):1126-1140
- RB, Ferretti E, Gulino A, Grasso F, De Simone C, Di Mario U, Falorni A, Rewers M, La Porte , Wlczak M, Dmochowski K, Bogaczynska E. Aparent epidemic of insulin-dependent diabetes mellitus in midwestern Poland. *Diabetes* 1987;36:106-113
- Robert D. Hoeldtke . Kimberly D. Bryner, Daniel R. McNeill et al.Oxidative Stress and Insuline Requierements in Patients with recent onset Type 1 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolis*. 2003;1624-16
- Robinson, C.J., Bohannon, B.J., and Young, V.B. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010;74:453–476
- Roesch LF, Casella G, Simell O, Krischer J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Neu J, Triplett EW: Influence of sample storage on bacterial community diversity in

fecal samples. *Open Microbiol J* 2009; 3:40–46

- Rokach J, Khanpure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins* 1997;823-51.

- Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation and the gut. *Gut* 2005;54:317-320

- Sampson NK, Gopaul N, Davies IR, Hugues DA, Carrier MJ. Plasma isoprostanes: direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;537-41

- Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006;55:1443-1449

- Schober E, Rami B, Waldhoer T. Steep increase of incidence of childhood diabetes since 1999 in Austria. Time trend analysis 1979-2005. A nationwide study. *Eur J Pediatr* 2008; 167(3): 293-297

- Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, et al. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165:294-300.

- Serino M, Fernández-Real JM, Fuentes EG, Queipo-Ortuño M, Moreno-Navarrete JM, Sánchez A, Burcelin R, Tinahones F. The gut microbiota profile is associated with insulin action in humans. *Acta Diabetol.* 2012

- Sherman LA, Savage DC,. Lipotechoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:302-304

- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J Med* 1991; 31S-8S

- Snart J, Babiloni R, Grayson T, et al. Supplementation of the diet with with high viscosity beta glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *App Environ Microbiol* 2006 ;72:1925-1931
- Sodergren E, Vessby B, Basu S. Radioimmunological measurement of F(2)-isoprostanes after hydrolysis of lipids in tissues. *Prostaglandins Leikot. Essent. Fatty Acids* 2000;149-52
- Sørensen LP, Andersen IR, Søndergaard E, et al. Basal and insulin mediated VLDL-triglyceride kinetics in type 2 diabetic men. *Diabetes* 2011;60: 88–96
- Stefan N, Kantartzis K, Celebi N, et al. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* 2010;33:405–407
- Stuebe A. The Risks of Not Breastfeeding for Mothers and Infants. *Rev Obstet Gynecol* 2009;2(4):222–231. 34.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16 S r RNA from complex communities reveals manyo el molecular species within the human gut. *App Environ Microbiol* 199;65:4799-4807
- Sullivan, A., Edlund, C., and Nord, C.E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* 2001;1:101–114.
- Tabuchi M, Ozaki M; Tamura A, et al. Antidiabetic effect of Lactobacillus GG in streptozotocin induced diaabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:1421-1424
- Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, HooverRL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel

prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* 1992;136-41

- Turnbaugh P, Ridaura V, Faith J, Rey F, Knight R, Gordon J. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009;1:6-14

- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4

- Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L., and Gordon, J.I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008;3:213-223

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I. The human microbiome project. *Nature* 2007;449:804-810

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027-1031

- Turnbaugh, P.J., Quince, C., Faith, J.J., McHardy, A.C., Yatsunencko, T., Niazi, F., Affourtit, J., Egholm, M., Henrissat, B., Knight, R., and Gordon, J.I. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107:7503-7508

- Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP: Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr* 2011;93(1):62-72

- Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The Perfect Storm for type 1 diabetes. The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability and mucosal immunity. *Diabetes* 2008;57:2555-2562

Vaarala O: The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18(4):241-247

- Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Lai KK et al. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP Rats. *Plos One* 2010 5(5): e10507

- Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Lai KK, Abdelgeliel AS, Gonzalez CF, Wasserfall CH, Larkin J, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW, Neu J, Lorca GL: *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS One* 2010;5(5):e10507

- Vance, M.L. (1993) Metabolic status and growth hormone secretion in man. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 6, 3-4.

- Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, et al. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diab Care* 2008;31(7):1392-1396

- Vehik k., Hamman RF, Lezotte D, et al. Increasing incidence of type 1 diabetes in 0- 17 year old Colorado youth. *Diab Care* 2007;30(3):503-509

- Verdaguer J, et al. Acceleration of spontaneous diabetes in TCR β transgenic non obese diabetic mice by β cell cytotoxic CD8 T cells expressing identical endogenous TCR α chains. *J Immunol* 1996; 157:4726-4735

- Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Intern.Med* 2001;69-76

- Vita JA, Keaney JF, Jr., Raby KE, Morrow JD, Freedmna JE, Lynch S, Koulouris SN, Hankin BR, Frei B. Low plasma ascorbic acid independently predicts the presence of an unstable coronary syndorme. *J Am.Coll. Cardiol.*1998;980-6
- W.H. Wilson Tang, M.D., Zeneng Wang, Ph.D., Bruce S. Levison, Ph.D., Robert A. Koeth, B.S., Earl B. Britt, M.D., Xiaoming Fu, M.S., Yuping Wu, Ph.D., and Stanley L. Hazen, M.D., Ph.D. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* 2013;368:1575-84
- Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012 Feb;6(2):320-9
- Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A: Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000;113:4435-4440
- Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, Fasano A: Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102:2916–2921
- Wen L , Ruth E. Ley , Pavel Yu. Volchkov et al . Innate immunity and intestinal microbiota in the development of the type 1 diabetes. *Nature* 455: 1109-1113,2008
- Wenlau JM, Moua O, Sarkar SA et al. SIC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1150:256-259.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998 USA 95:6578–6583
- Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated

microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009, 15:653-660

- Wright DP, Knight CG, Parker SG, Christie DL, Robertson AM: Cloning of a mucin-desulfating sulfatase gene from *Prevotella* strain RS2 and its expression using a *Bacteroides* recombinant system. *J Bacteriol* 2000, 182:3002–3007

- Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J: Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010;61(1):69-78. 37

- Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J: Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010;61(1):69-78

- Xavier RJ, Podolsky DK. Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-434

- Yadav H, Jain S, Sinha PR. Oral administration of Dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin induced diabetes in rats. *J Dairy Res* 2008;75:189-195

Yan F, Polk DB. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20:565-571

- Zhang, H., DiBaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran P., Crowell, M.D., Wing, R., Rittmann, B.E., and Krajmalnik-Brown, R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009;106:2365–2370

- Ziegler AG, Schmidt S, Huber D, Humel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes –associated autoantibodies. *JAMA* 2003;23(12):1755-1760

