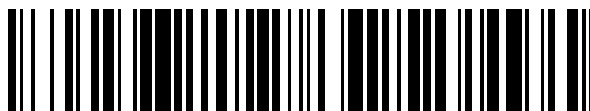


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 634**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2014 PCT/EP2014/063222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007464**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2014 E 14732874 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 3022313**

54 Título: **Escherichia coli como marcador de hipertrigliceridemia**

30 Prioridad:

18.07.2013 EP 13176965

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.07.2017

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**CHOU, CHIEH JASON;
DARIMONT-NICOLAU, CHRISTIAN y
MEMBREZ, MATHIEU**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 627 634 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Escherichia coli como marcador de hipertrigliceridemia

5 Antecedentes de la presente invención

10 La dislipidemia es un trastorno del metabolismo de las lipoproteínas que se caracteriza por la presencia de una proporción anormal de lípidos (p.ej. de colesterol y/o de grasa) en la sangre. La prevalencia de dislipidemias, en concreto de hiperlipidemias tales como hipertrigliceridemia (HTG), hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia o una combinación de ellas, es elevada en los países en desarrollo. Por ejemplo, en los Estados Unidos la prevalencia de la hipertrigliceridemia, definida como el nivel de triglicéridos en plasma superior a 1,2 mmoles/litro (150 mg/dl), es del 27,6% en las mujeres y del 35,1% en los hombres (Mozumdar and Liguori, Diabetes Care, 34(1):216-219 (2011); Ford y otros, JAMA, 287(3):356-359 (2002)).

15 La HTG puede ser el resultado de una mayor producción de triglicéridos, de un menor catabolismo de triglicéridos o incluso de ambas cosas. Los clásicos factores de riesgo de hipertrigliceridemia comprenden el consumo de comida grasa, la ingesta excesiva de alcohol, el estilo de vida sedentario, la edad, la obesidad y/o la existencia de una enfermedad metabólica. Otros factores de riesgo incluyen la diabetes de tipo 2, los trastornos genéticos (como p.ej. hipertrigliceridemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, disbetalipoproteinemia familiar), ciertos fármacos (p.ej. esteroides, bloqueadores beta y contraceptivos orales con alto contenido de estrógenos) y otras enfermedades (como p.ej. hipotiroidismo, hiperhomocisteinemia, enfermedad de Cushing, otras enfermedades endocrinas, renales o hepáticas y trastornos autoinmunes).

25 La HTG se diagnostica normalmente según categorías discretas basadas en los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) en ayunas. Por ejemplo, el sistema de clasificación de la Endocrine Society [*Sociedad de endocrinología*] define que el TG normal es < 1,7 mmoles/litro (< 150 mg/dl), la HTG leve es de 1,7-2,3 mmoles/litro (150-199 mg/dl), HTG moderada es de 2,3-11,2 mmoles/litro (200-900 mg/dl), la HTG grave es de 11,2-22,4 mmoles/litro (1000-1999 mg/dl) y la HTG muy grave es > 22,4 mmoles/litro (> 2000 mg/dl).

30 Se ha demostrado que la microbiota intestinal juega un papel en trastornos metabólicos tales como la obesidad y la diabetes, y en las enfermedades cardiovasculares. Con independencia de cualquier teoría particular, se cree que las bacterias intestinales son capaces de inducir una respuesta inmunológica innata en el individuo huésped por medio de lipopolisacáridos (LPS) existentes en la pared celular bacteriana, produciendo inflamación en el huésped y una cascada de otros episodios fisiológicos. Asimismo se piensa que los metabolitos bacterianos de los compuestos dietéticos pueden regular actividades biológicas en el huésped, contribuyendo a los trastornos metabólicos.

35 La patente WO 2008/009869 describe la correlación de los niveles elevados de endotoxina bacteriana (LPS) y los trastornos metabólicos, es decir, dislipidemia por triglicéridos elevados/colesterol tipo HDL disminuido, en muestras de suero o de sangre.

40 Los marcadores clásicos de HTG carecen de especificidad para valorar el nivel de riesgo de enfermar que tiene una persona. Por desgracia, actualmente no se dispone de métodos rápidos y exactos de diagnóstico para predecir el nivel de riesgo de una persona de desarrollar hipertrigliceridemia metabólica. La presente invención satisface esta necesidad y también aporta sus correspondientes ventajas.

45 Resumen de la presente invención

50 La presente invención está definida en su sentido más amplio por las reivindicaciones adjuntas. En una forma de ejecución la presente invención proporciona un método para predecir si un sujeto se halla en riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia. El método comprende las etapas de: a) transformar una muestra de heces obtenida del sujeto para detectar el nivel de *Escherichia coli* (*E. coli*) en la muestra, y b) determinar que un mayor nivel de *E. coli* en la muestra, respecto a una muestra de control, predice que el sujeto está en riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia.

55 En algunos aspectos la detección del nivel de *E. coli* implica llevar a cabo una amplificación de ácidos nucleicos. En otros aspectos la detección del nivel de *E. coli* incluye el recuento de colonias.

En algunos aspectos la muestra de control procede de un sujeto sano o de uno que no tiene el riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia.

60 En otra forma de ejecución la presente invención proporciona un método para diagnosticar hipertrigliceridemia en un sujeto, que consiste en a) transformar una muestra de heces obtenida del sujeto para detectar el nivel de *E. coli* en la muestra, y b) determinar que un mayor nivel de *E. coli* en la muestra, respecto a una muestra de control, indica un diagnóstico de hipertrigliceridemia en el sujeto.

65 En algunos aspectos la detección del nivel de *E. coli* implica llevar a cabo una amplificación de ácidos nucleicos. En algunos aspectos la amplificación de ácidos nucleicos se efectúa empleando oligonucleótidos cuyas secuencias

están descritas en SEQ ID nº 3 y 4. En otras formas de ejecución la amplificación de ácidos nucleicos consiste en una PCR de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas o en una PCR extragénica repetitiva.

5 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes para un especialista en la materia a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la presente invención

10 I. Introducción

10 La hipertrigliceridemia (HTG) es un estado en el cual los niveles séricos de triglicéridos (TG) en ayunas son elevados debido a la sobreproducción y/o a la deficiente eliminación de triglicéridos o de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos. Puede ser causada por defectos genéticos que producen un metabolismo desordenado de TG. O puede estar causada por otros estados lípidos y metabólicos, incluyendo una dieta alta en grasas, una ingesta excesiva de alcohol, ciertas medicaciones, diabetes mellitus, hipotiroidismo, resistencia a la insulina e hipertensión.

15 La predicción del riesgo de una persona de desarrollar HTG puede ser un reto debido a la falta de especificidad de los marcadores biológicos disponibles actualmente. Asimismo se ha recomendado que siempre debe evaluarse la presencia de niveles elevados de triglicéridos junto con otros factores de riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares, incluyendo causas secundarias de hiperlipidemia, historial familiar de dislipidemia y enfermedades cardiovasculares, obesidad, hipertensión, anomalías del metabolismo de glucosa, disfunción hepática, etc.

20 Se ha encontrado que un nivel elevado de *E. coli* en el sistema gastrointestinal de un individuo es predictivo del desarrollo de hipertrigliceridemia. La presente invención proporciona métodos para valorar el riesgo de una persona de tener hipertrigliceridemia, así como una terapia efectiva para el tratamiento del trastorno.

25 En ciertos aspectos la puesta en práctica de la presente invención se sirve de técnicas de biología molecular. Entre los textos básicos que revelan los métodos generales de uso en la presente invención cabe mencionar: Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y otros, eds., 1994).

30 II. Definiciones

35 Tal como se utilizan aquí, los siguientes términos tienen los significados adscritos a ellos, a no ser que se indique específicamente otra cosa.

40 “Dislipidemia” incluye cualquier estado definido como un aumento de colesterol o de triglicéridos (TG), o de ambos, en el plasma, o un bajo nivel de lipoproteína de alta densidad. La dislipidemia puede contribuir al desarrollo de la aterosclerosis, incrementando su riesgo. Hay distintas clases de dislipidemia que se diferencian por sus patrones de niveles elevados de lípidos y lipoproteínas. La clase I se define como de alto contenido de quilomicrones y TG; la clase IIa como de alto contenido de lipoproteína de baja densidad (LDL) y colesterol; la clase IIb como de alto contenido de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y LDL y elevado TG y colesterol; la clase III como de alto contenido de VLDL y restos de quilomicrones y elevado TG y colesterol; la clase IV como de alto contenido de VLDL y TGs, y la clase V como de alto contenido de quilomicrones y VLDL y elevados TGs y colesterol.

45 El término “hipertrigliceridemia” incluye una medición de triglicéridos plasmáticos (TG) en ayunas que es superior a cierto valor límite umbral o mayor o elevado respecto a un control sano de edad y sexo equivalentes. El diagnóstico se puede definir como el caso en que la concentración de TG en plasma supera un valor umbral como el 90º o 95º percentil de individuos del mismo sexo y edad.

50 Las dos fuentes principales de triglicéridos en el plasma son exógenas (procedentes de las grasas de la dieta), que son transportadas en quilomicrones, y endógenas (procedentes del hígado), que son transportadas en partículas lipoproteicas de muy baja densidad (VLDL).

55 El término “muestra” incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un individuo. Las muestras comprenden sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, heces, lágrimas, cualquier otro fluido corporal, muestras de tejidos (p.ej. biopsias) y extractos celulares de las mismas (p.ej. extracto eritrocitario). En la presente invención la muestra es de heces.

60 El término “individuo”, “sujeto” o “paciente” se refiere normalmente a humanos, pero también puede incluir otros animales, como p.ej. primates, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y análogos.

65 La frase “transformar la muestra” se refiere a un cambio físico o químico de la muestra para extraer y/u obtener un marcador (p.ej. *E. coli* u otras bacterias), tal como está definido aquí. Una extracción, una manipulación, una precipitación química, un ensayo ELISA, una inmunoeextracción, una modificación física o química de la muestra para

medir un marcador son todas ellas una transformación. Se trata de una transformación, siempre que la muestra no sea idéntica antes y después del cambio.

5 El término “clasificar” se refiere a “asociar” o “categorizar” una muestra en relación con un estado patológico. En ciertos casos la “clasificación” se basa en pruebas estadísticas, empíricas o ambas. En algunas formas de ejecución los métodos y sistemas de clasificación usan una denominada serie de muestras de entrenamiento correspondientes a estados patológicos conocidos. Una vez establecidos, los datos de entrenamiento sirven de base, modelo o patrón para compararlos con una muestra desconocida, a fin de clasificar su estado patológico ignorado. En ciertos casos clasificar la muestra es parecido a diagnosticar su estado patológico. En algunos otros casos clasificar la muestra es equivalente a diferenciar su estado patológico de otro.

15 El término “intervención dietética” se refiere a un tratamiento relacionado con una dieta o una ingesta dietética de un sujeto. El tratamiento comprende componentes, restricciones y recomendaciones en relación con la dieta, de cara a prevenir una deficiencia, tratar una enfermedad o estado médico de un sujeto o, de manera más general, reducir los síntomas, controlar el progreso de la enfermedad o proporcionar un beneficio nutricional, fisiológico o médico al individuo. Como ejemplos de intervenciones dietéticas cabe citar, sin limitarse a ellas, la reducción de los hidratos de carbono, la reducción de las grasas, el control del peso, la reducción del consumo de alcohol, el incremento de la actividad física y el mantenimiento de una dieta baja o muy baja en grasas.

20 El término “intervención nutricional” se refiere a un tratamiento relacionado con una ingesta nutricional de un sujeto. El tratamiento comprende componentes, suplementos y recomendaciones en relación con la nutrición, de cara a prevenir una deficiencia, tratar una enfermedad o estado médico de un sujeto o, de manera más general, reducir los síntomas, controlar el progreso de la enfermedad o proporcionar un beneficio nutricional, fisiológico o médico al individuo. Los ejemplos de intervenciones nutricionales incluyen, sin limitarse a ellos, ácidos grasos omega-3 (p.ej. aceite de pescado), fitoesteroles, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), taurina, probióticos (p.ej. *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, etc.), carbohidratos (p.ej. almidón resistente, β -ciclodextrano, etc.), proteínas (p.ej. proteína de soja, β -conglucina, glicina, etc.), fibra dietética (p.ej. psilio, pectina, β -glucano, fructo-oligosacáridos, inulina, etc.), fitonutrientes (p.ej. isoflavona, polifenoles de uva, resveratrol, punicalagina de granada, té verde, té oolong, etc.), eicosanoides, ácido palmítico y combinaciones de ellos.

30 La expresión “cantidad o dosis terapéuticamente efectiva” incluye una dosis de un fármaco capaz de conseguir un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco útil para tratar la hipertrigliceridemia puede ser la cantidad capaz de prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados a la hipertrigliceridemia. La cantidad exacta puede ser determinada por un especialista en la materia mediante el uso de técnicas conocidas (véase p.ej. Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

40 III. Descripción detallada de las formas de ejecución

Aquí se ofrece un método para predecir la hipertrigliceridemia (HTG) en un paciente, midiendo el nivel de *E. coli* (p.ej. *E. coli* entérica) en una muestra, es decir una muestra de heces del paciente. También se describe un método para tratar un paciente en riesgo o susceptible de desarrollar HTG. La presente invención proporciona por tanto una predicción diagnóstica exacta de HTG que es útil como guía para decidir los tratamientos.

45 A. Detección de *E. coli*

1. Preparación de muestras

50 El método aquí descrito se refiere a la medición de la cantidad de *E. coli* o de la cantidad de ADN o ARN específico de *E. coli* encontrada en tejido gastrointestinal de un individuo, es decir una muestra de heces, como medio para predecir si un sujeto tiene riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia o para diagnosticarla. De una muestra de heces obtenida de un individuo se extraen ácidos nucleicos.

55 En algunas formas de ejecución se recoge una cantidad apropiada de una muestra, la cual se puede conservar de acuerdo con procedimientos estándar antes de continuar con su preparación.

60 En algunos casos la muestra se suspende en un tampón o medio de cultivo y luego se cultiva en placas a varias diluciones en un medio de cultivo semiselectivo o selectivo (p.ej. medio de cultivo Drigalski) para el enriquecimiento de bacterias.

65 El análisis del ADN o ARN de *E. coli* encontrado en una muestra del individuo según la presente invención puede realizarse con heces. Los métodos de preparación de muestras para la extracción de los ácidos nucleicos son bien conocidos entre los especialistas en la materia. Por ejemplo, una muestra del individuo debería tratarse en primer lugar para romper la membrana celular, con el fin de liberar los ácidos nucleicos contenidos en las células.

2. Extracción y cuantificación de los ácidos nucleicos

Los métodos de extracción de ARN o ADN de una muestra biológica son bien conocidos y se llevan a cabo de forma rutinaria en el campo de la biología molecular, véase p.ej. Sambrook and Russell, *supra*. La contaminación con ARN debe eliminarse para evitar interferencias con el análisis de ADN. Para extraer ácidos nucleicos bacterianos también se pueden usar kits comerciales, como p.ej. QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Germantown, MD), UltraClean Fecal DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA), MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA), PowerMicrobiome® RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA), Stool Nucleic Acid Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Ontario Canadá).

3. Detección y cuantificación de ácidos nucleicos

Los análisis que se pueden usar para determinar el nivel (cantidad) de ARN o ADN de *E. coli* (y por tanto el nivel de bacterias *E. coli*) en una muestra son, sin limitarse ellos, el análisis electroforético, el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, el análisis secuencial, el análisis de hibridación, el análisis de la ribotipia, el análisis de heterogeneidad del ADN ribosómico y el análisis por PCR, incluyendo la PCR cuantitativa (qPCR), la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante basada en PCR (PCR-DGGE), la PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (rep-PCR) y la PCR de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR). Estos ensayos están bien descritos y los métodos estándar son conocidos del estado técnico. Véase p.ej. Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. New York (1984-2008), capítulo 7 y suplemento 47; Theophilus y otros, "PCR Mutation Detection Protocols" Humana Press, (2002); Innis y otros, *PCR Protocols*, San Diego, Academic Press, Inc. (1990); Maniatis y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Nueva York, (1982); Ausubel y otros, *Current Protocols in Genetics and Genomics*, John Wiley & Sons, Inc. New York (1984-2008); y Ausubel y otros, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1994-2008).

En algunas formas de ejecución el nivel de *E. coli* en una muestra se cuantifica por medio de métodos estándar de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la PCR. En una forma de ejecución se emplea el siguiente par de cebadores oligonucleótidos: 5'-CATGCCGCGTGTATGAAGAA (SEQ ID NO:3) y 5'-CGGGTAACGTCAATGAGCAA (SEQ ID NO:4). Las condiciones de reacción pueden incluir las siguientes etapas: desnaturalización a 50°C durante 2 minutos, amplificación por PCR del modo siguiente: 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto para 40 ciclos. El producto de la amplificación se puede detectar y medir por métodos estándar conocidos del estado técnico.

En otra forma de ejecución se emplea una PCR específica del gen 16S de ARNr para detectar niveles de *E. coli*. Por ejemplo, las regiones hipervariables del 16S de ARNr bacteriano se pueden amplificar con cebadores específicos de región para generar amplicones.

La ERIC-PCR se refiere a un tipo de análisis PCR en el cual se genera un producto de amplificación con cebadores para secuencias repetitivas enterobacterianas específicas (véase p.ej. Dalla-Costa y otros, *J. Med. Microbiol.*, 47: 227-234 (1998). En una forma de ejecución de la presente invención, el nivel de ADN de *E. coli* en una muestra se determina por ERIC-PCR con el siguiente par de cebadores oligonucleótidos: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC (SEQ ID NO:29) y 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG (SEQ ID NO:30). Un ejemplo de mezcla de reacción de PCR puede incluir ADN molde, cebadores oligonucleótidos, dNTPs, tampón de amplificación y ADN polimerasa Taq. Un ejemplo de condiciones de reacción incluye desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, amplificación por PCR del modo siguiente: 95°C durante 45 segundos, 52°C durante 1 minuto, 70°C durante 10 minutos para 35 ciclos y extensión a 70°C durante 20 minutos. Los productos de amplificación se pueden separar por electroforesis en gel o por otros métodos conocidos del estado técnico.

El perfilado de ADN por rep-PCR se refiere a un tipo de análisis PCR en el cual se usa la amplificación de ADN entre dos elementos extragénicos repetitivos adyacentes para obtener huellas de ADN específicas de la cepa. En una forma de ejecución de la presente invención, la presencia de ADN de *E. coli* en una muestra se determina realizando una rep-PCR con el siguiente cebador oligonucleótido: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG (SEQ ID NO:31). En algunos casos se emplea una suspensión de células enteras como molde de amplificación. En algunas formas de ejecución las condiciones de reacción incluyen desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, amplificación por PCR del modo siguiente: 95°C durante 3 segundos, 92°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto, 65°C durante 8 minutos para 30 ciclos y extensión a 65°C durante 8 minutos. Los productos de amplificación se pueden analizar por electroforesis en gel. Las imágenes de gel de los productos de amplificación se pueden registrar digitalmente y se pueden comparar con imágenes de huellas de ADN estandarizadas, efectuando un análisis estadístico.

4. Detección y cuantificación de bacterias

Según algunos aspectos de la presente invención se pueden emplear métodos tales como un inmunoensayo para detectar el nivel de *E. coli* en una muestra. Los ejemplos no limitativos de inmunoensayo comprenden un ELISA, un inmunoensayo de fase sólida, un Western blot y una micromatriz proteica.

En algunos aspectos de la presente invención, el análisis de bacterias basado en cultivos se determina cultivando (en placas) bacterias en un medio, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, y cuantificando el número de colonias formadas. En una forma de ejecución la muestra se diluye en un medio (p.ej. medio de Ringer) y se cultiva en medios no selectivos tales como el medio TSS durante unas 24-48 horas a 37°C en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. El número de bacterias en la muestra es proporcional al número de colonias formadas respecto al tamaño de la muestra. Una descripción detallada del método se encuentra p.ej. en Schumann y otros, *Physiol. Genomics*, 23:235-245 (2005).

El contenido de enterobacteriáceas en una muestra se cuantifica por el método siguiente: 1) diluyendo la muestra en un medio (p.ej. medio de Ringer), agitando y centrifugando (p.ej. a 10.000 rpm durante 10 min); 2) resuspendiendo el sedimento en un medio (p.ej. medio de Ringer); 3) extendiendo las células en placas Drigalski y EMB e incubando a 37°C durante unas 18-24 horas en condiciones aeróbicas; y 4) cuantificando las colonias formadas. Una descripción detallada del método se encuentra p.ej. en Membrez y otros, *FASEB Jour.*, 22:2416-2426 (2008).

Según otra forma más de ejecución, después de lavar el sedimento celular bacteriano de la etapa 1) arriba descrita, la suspensión celular se inocular en un caldo de enriquecimiento para enterobacteriáceas (caldo E.E.; Oxoid LTD, Basingstoke, Inglaterra) durante 24 horas a 37°C y a continuación las células se extienden sobre EMB agar. Las enterobacteriáceas de las colonias se pueden identificar usando técnicas estándar tales como un ensayo API ID32E (Biomerieux, Durham, NC). Una descripción detallada del método se encuentra p.ej. en Murray y otros, *Manual of Clinical Microbiology*, 9ª Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (2003).

En algunas formas de ejecución, las bacterias asociadas a la hipertrigliceridemia se pueden detectar inoculando la muestra en un medio de detección que incluya sustratos particulares - específicos para una actividad metabólica como la de tipo enzimático - de la bacteria que se desea detectar. Mediante la elección de sustratos, dependiendo de si hay o no una reacción, se puede caracterizar la naturaleza de un microorganismo. Ejemplos de tales métodos se describen detalladamente p.ej. en la patente U.S. nº 8,334,112.

El nivel de enterobacteriáceas se puede detectar utilizando una molécula de fijación (p.ej. anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero, etc.) específica de las enterobacteriáceas de interés, es decir de *E.coli*.

En otras formas de ejecución el nivel de enterobacteriáceas se puede medir detectando una molécula (como p.ej. un péptido, una proteína, un enzima, un compuesto químico, etc.) específica de las enterobacteriáceas de interés, es decir de *E.coli*. En una forma de ejecución el método de detección del nivel de enterobacteriáceas, es decir de *E.coli*, en una muestra comprende las etapas de poner en contacto la muestra con un sustrato marcado para un enzima producido y/o secretado por la bacteria, detectable en las condiciones que causan la modificación del sustrato por el enzima, y detectar la presencia o ausencia de la modificación del sustrato. La modificación del sustrato indica la presencia de enterobacteriáceas en la muestra y la ausencia de modificación del sustrato indica la ausencia de la bacteria en la muestra. En la patente U.S. nº 8,377,651, p.ej., se describen en detalle ejemplos de tales métodos.

En la presente invención pueden resultar útiles los métodos de identificación de una cepa particular de *E.coli*. Estos métodos comprenden el ribotipado, la secuenciación (p.ej. la secuenciación del 16S de ARNr), la electroforesis en gel con gradiente desnaturante, el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminales, el análisis PCR del espaciador intergénico ribosómico, micromatriz de ADN, FISH, qPCR y qRT-PCR.

B. Predicción de la hipertrigliceridemia

En algunas formas de ejecución, si el nivel de *E.coli* en la muestra del individuo es mayor que el de la muestra de control (p.ej. una muestra de un control sano o de un individuo que no tiene hipertrigliceridemia) se determina que el individuo está en riesgo o es susceptible de desarrollar HTG. En alguna forma de ejecución se predice la HTG si el nivel de *E.coli* es al menos 2 veces (2x) mayor, p.ej. al menos 2x, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, aproximadamente, que el del control. En alguna forma de ejecución se predice la HTG si el nivel de *E.coli* es al menos 5 veces (5x) mayor, p.ej. 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x, 15x o más, aproximadamente, que el de control.

En algunas formas de ejecución, si el nivel de *E.coli* en la muestra es igual o menor que el de la muestra de control, el individuo no está en riesgo de desarrollar HTG o no tiene HTG.

En algunas formas de ejecución, si el nivel de *E.coli* en la muestra del individuo es mayor que el de la muestra de control (p.ej. una muestra de un control sano o de un individuo que no tiene hipertrigliceridemia) se diagnostica que el individuo tiene HTG. En algunos casos se diagnostica la HTG cuando el nivel de *E.coli* en la muestra es al menos 2 veces (2x) mayor, p.ej. al menos 2x, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, aproximadamente, que el del control. En alguna forma de ejecución se diagnostica la HTG cuando el nivel de *E.coli* es al menos 5 veces (5x) mayor, p.ej. 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x, 15x o más, aproximadamente, que el de control.

C. Administración Terapéutica de fármacos

- 5 Tal como se describe aquí, el método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco terapéutico, de un antibiótico, una intervención dietética, una intervención nutricional o combinaciones de ellas, para el tratamiento de la hipertrigliceridemia o de sus síntomas. En algunos casos se selecciona una cantidad terapéuticamente efectiva para reducir la cantidad total de enterobacterias, o la cantidad relativa de enterobacterias en el intestino.
- 10 Tal como se describe aquí, la cantidad relativa de enterobacterias respecto a la cantidad total de enterobacterias en el intestino se reduce o elimina aproximadamente un 1% hasta 100%, preferiblemente un 50% hasta 100%, con mayor preferencia un 75% hasta 100%. También se describe aquí que la cantidad relativa se reduce un 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. En algunos casos los porcentajes se calculan basándose en las unidades formadoras de colonias (ufc) de las especies bacterianas presentes en el intestino.
- 15 Tal como se describe aquí, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco terapéutico se administra sola. Tal como se describe aquí, el fármaco terapéutico se administra en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de una intervención nutricional.
- 20 Los fármacos que son útiles para tratar uno o más síntomas relacionados con la HTG o con un subtipo clínico de la misma incluyen, sin limitarse a ellos, un fibrato, incluyendo bezafibrato (Bezalip), ciprofibrato (Modalim), clofibrato, gemfibrozil (Lopid), fenofibrato (TriCor) y combinaciones de los mismos.
- 25 Para sus aplicaciones terapéuticas, el fármaco empleado en el tratamiento de la hipertrigliceridemia (HTG) se puede administrar solo o en combinación con uno o más fármacos adicionales de la HTG y/o con uno o más fármacos que disminuyen los efectos secundarios relacionados con el fármaco para la HTG.
- 30 El o los fármacos para el tratamiento de la HTG se pueden administrar con un excipiente farmacéutico adecuado, si es necesario, y por cualquiera de los modos de administración aceptados. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intra-articular, parenteral, intra-arterial, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal o inhalativa. "Coadministración" se refiere a la administración de un fármaco para la HTG al mismo tiempo, justo antes o justo después de la administración de un segundo fármaco (como p.ej. otro fármaco de la HTG que sirva para disminuir los efectos secundarios del fármaco de la HTG, etc.).
- 35 Una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco para la HTG se puede administrar repetidamente, p.ej. al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, o se puede administrar la misma dosis por infusión continua. La dosis puede estar en forma sólida, semisólida, de polvo liofilizado o en formas de dosificación líquida, por ejemplo tabletas, píldoras, gránulos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, ungüentos, lociones, geles, aerosoles, espumas o similares, preferiblemente en forma de dosis unitarias que sean adecuadas para una administración sencilla y precisa.
- 40 Tal como se usa aquí, la expresión "forma de dosificación unitaria" incluye unidades físicamente discretas que son adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada una de las cuales contiene una cantidad prefijada de un fármaco para la HTG, calculada para producir la acción deseada, tolerancia y/o efectos terapéuticos, junto con un excipiente farmacéutico adecuado (p.ej. una ampolla). Además pueden prepararse formas de dosificación más concentradas, a partir de las cuales se pueden producir luego unas formas de dosificación más diluidas. Por tanto las formas de dosificación más concentradas contendrán sustancialmente más de, p.ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces la cantidad del fármaco para la HTG.
- 45 Como ejemplos de excipientes adecuados cabe mencionar, sin limitarse a ellos: lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbita, manita, almidones, goma acacia, fosfato cálcico, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, suero fisiológico, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos tales como los Carbopoles, p.ej. Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden contener además agentes lubricantes tales como talco, estearato magnésico y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes suspensores, agentes conservantes tales como los hidroxibenzoatos de metilo, etilo y propilo (es decir, los parabenos); agentes reguladores del pH tales como ácidos y álcalis inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes y agentes saborizantes. Las formas de dosificación también pueden llevar microesferas poliméricas biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrinas.
- 50 La dosis terapéutica efectiva para la administración oral puede estar en forma de tabletas, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pastillas masticables, polvos y formulaciones de liberación continua. Los excipientes adecuados para la administración oral incluyen grados farmacéuticos de manita, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato magnésico y análogos.
- 55 Tal como se describe aquí, la dosis terapéutica efectiva toma la forma de una píldora, tableta o cápsula, y por tanto la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco para la HTG, cualquiera de los siguientes aditivos: un
- 60
- 65

diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y análogos; un disgregante tal como almidón o sus derivados; un lubricante tal como estearato magnésico y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma acacia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y sus derivados. Un fármaco para HTG también se puede formular como supositorio en un vehículo de, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

Las formas de dosificación líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando un fármaco para HTG y de modo opcional uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo tal como, por ejemplo, suero acuoso fisiológico (p.ej. al 0,9% p/v de cloruro sódico), dextrosa acuosa, glicerina, etanol y similares, con el fin de formar una solución o suspensión destinada p.ej. a la administración oral, tópica o intravenosa. Un fármaco para HTG también se puede formular como enema de retención.

Las soluciones inyectables se formulan preferiblemente a un pH comprendido aproximadamente entre 4,5 y 7,5.

La dosis terapéutica efectiva también se puede suministrar en forma liofilizada. Estas formas de dosificación pueden incluir un tampón, p.ej. bicarbonato para reconstituirla antes de la administración, o el tampón puede ir incluido en la dosis liofilizada para su reconstitución p.ej. con agua. La forma de dosificación liofilizada puede contener además un vasoconstrictor adecuado, p.ej. epinefrina. La forma de dosificación liofilizada se puede suministrar en una jeringa que opcionalmente puede ir empaquetada en combinación con el tampón de reconstitución, de manera que la forma de dosificación reconstituida se pueda administrar enseguida a un sujeto.

D. Intervenciones dietéticas

Tal como se describen aquí, las intervenciones dietéticas se administran a un individuo en riesgo de desarrollar HTG o diagnosticado de HTG. Estas intervenciones incluyen una dieta personalizada, un programa de control (pérdida) de peso, un aumento de la actividad física, una modificación de los hábitos y una restricción calórica. Tal como se describen aquí, las intervenciones dietéticas incluyen una limitación de los hidratos de carbono y/o de las grasas en la dieta.

Tal como se describe aquí, la intervención dietética es una dieta pobre en carbohidratos, en la cual los hidratos de carbono constituyen menos del 20% de la ingesta calórica diaria. Una dieta baja en carbohidratos puede ser aquella que reduzca la ingesta de hidratos de carbono a unos 20 hasta 60 gramos diarios.

Tal como se describe aquí, la intervención dietética es una dieta baja en grasas, en la cual la grasa constituye un 20-30% aproximadamente o menos de la ingesta calórica diaria.

E. Intervenciones nutricionales (suplementos dietéticos)

Tal como se describen aquí, las intervenciones nutricionales incluyen, por ejemplo, fitoesteroles tales como los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (p.ej. ácidos grasos poliinsaturados omega-3 tales como los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), ácidos grasos poliinsaturados omega-6 y ácido alfa-linolénico) y ácidos grasos monoinsaturados, taurina, productos fitoquímicos, fitoesteroles (p.ej. esteroides vegetales y estanoles vegetales), probióticos (p.ej. *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*), carbohidratos (p.ej. almidón resistente, beta-ciclodextrina), proteínas (p.ej. proteína de soja, beta-conglicina, glicinina), fibra dietética (p.ej. psilio, pectina, beta-glucano, inulina), fitonutrientes/productos fitoquímicos (p.ej. isoflavona, polifenoles de uva como flavonoides, flavonoles, antocianinas, taninos, y resveratrol, punicalaginas, catequinas), hierbas, especias y combinaciones de ellos. Además, las intervenciones nutricionales incluyen, sin limitarse a ellos, fructo-oligosacáridos (FOS), goma guar parcialmente hidrolizada (PHG6), una mezcla PHG6/FOS, aceite de pescado, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tales como los ácidos grasos n-6 y n-3, colina, niacina, almidón resistente, eicosanoides, ácido palmítico, prebióticos, levadura, antibióticos, productos de tipo alimenticio, productos bebibles y combinaciones de ellos.

Tal como se describen aquí, las intervenciones nutricionales son formulaciones destinadas a la alimentación enteral o suplementos de nutrición oral (p.ej. líquidos o sólidos). Tal como se describen aquí, las intervenciones nutricionales son productos alimenticios o bebidas.

La intervención nutricional se puede administrar mediante una formulación, a una dosis y durante un periodo, que resulten beneficiosos para reducir el nivel elevado de triglicéridos en un individuo afectado de hiperlipidemia, p.ej. de hipertrigliceridemia.

Tal como se describe aquí, la cantidad terapéutica efectiva de la intervención nutricional se administra sola. También se describe aquí que la intervención nutricional se administra en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco terapéutico. Como ejemplos no limitativos de fármaco terapéutico cabe citar un fibrato tal como, por ejemplo, bezafibrato (Bezalip), ciprofibrato (Modalim), clofibrato (Abitrate, Atromid-S), gemfibrozil (Lopid), fenofibrato (Lofibra, Antara, Lipofen, Triglide, TriCor) y sus combinaciones. Los fibratos incluyen cualquier agente derivado del ácido fibrico que pueda ser utilizado para rebajar los niveles de lípidos en el plasma.

Tal como se describe aquí, la intervención nutricional es una fuente de fitoesteroles. Los fitoesteroles comprenden esteroides vegetales y ésteres de estanol. Las formulaciones de la intervención nutricional pueden llevar cantidades limitadas de ácidos grasos saturados (p.ej. inferiores al 7% de la energía total de la intervención), colesterol (p.ej. menos de 200 mg) y ácidos grasos trans.

Tal como se describe aquí, la intervención nutricional es una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL). El suplemento nutricional puede ser de 2 a 4 gramos diarios de ácidos grasos omega-3 como EPA y DHA, o de ácidos grasos omega-3 de pescado marino. Tal como se describe aquí, el suplemento puede ser aceite de pescado a una dosis aproximada de 3 a 18 gramos diarios, por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 gramos diarios. La intervención puede ser una dieta rica (alta) en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 u omega-6.

En ciertos casos, sobre todo cuando el sujeto tiene niveles elevados de triglicéridos, se pueden proporcionar ácidos grasos n-3. En algunos casos se prefiere especialmente una mezcla PHG6/FOS.

Los prebióticos incluyen sustancias alimenticias previstas para promover el crecimiento de las bacterias probióticas en el intestino. Por ejemplo, un prebiótico puede ser una fibra dietética. El cuerpo humano no puede digerir fibras dietéticas. Los ejemplos no limitativos de fibras dietéticas comprenden fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, isomalto-sacáridos, oligosacáridos de soja, pirodextrinas, oligosacáridos transgalactosilados, lactulosa, beta-glucano, inulina, rafinosa, estaquiosa y sus combinaciones.

Los probióticos se refieren a preparaciones o componentes de células microbianas cuyo efecto es beneficioso para la salud del individuo huésped. Los ejemplos no limitativos de bacterias probióticas comprenden bifidobacterias, lactobacilos, lactococos, enterococos, estreptococos, ascomicetos, deuteromicetos, debaromicetos, kluiveromicetos, sacaromicetos, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170; NCC2705; CNCM I-2618), *Bifidobacterium lactis* (NCC2818; CNCM 1-3446; Bb12), *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225), *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB10415) y mezclas de ellos. En un estudio con sujetos diabéticos de tipo 2 y moderadamente hipercolesterolémicos, se ha demostrado que el consumo diario durante 6 semanas de un yogur probiótico con contenido de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* disminuía los niveles de colesterol LDL (Ejtahed y otros, J Dairy Sci, 94(7):3288-94 (2011)).

Los antibióticos comprenden una clase de antibióticos aminoglicósidos tales como, sin limitarse a ellos, neomicina, kanamicina, estreptomina; una clase de antibióticos polipeptídicos como la polimixina B, una clase de penicilinas betalactámicas como la ampicilina y una clase de antibióticos quinolónicos/fluoroquinolónicos como la ciprofloxacina y la norfloxacina. También se puede emplear un bacteriófago o combinaciones de diferentes bacteriófagos. El uso de bacteriófagos puede ser conveniente cuando hay resistencia a los antibióticos. Los bacteriófagos son virus que invaden las células bacterianas y, en el caso de los fagos líticos, interrumpen el metabolismo bacteriano produciendo la lisis de la bacteria. Los bacteriófagos se pueden emplear para tratar infecciones bacterianas patógenas. Como la mayor parte de los fagos son específicos para una especie de bacterias, se puede emplear un solo bacteriófago o combinaciones de diferentes bacteriófagos.

Tal como se describe aquí, la intervención nutricional es una fuente de proteínas. Se puede emplear, por ejemplo, cualquier proteína dietética adecuada, p.ej. proteínas animales (tales como proteínas lácteas, proteínas de carne y proteínas de huevo), proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante), aminoácidos libres (p.ej. taurina) o combinaciones de ellas.

Los efectos biológicos del consumo de proteína de soja con la disminución de los lípidos circulantes y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares están bien demostrados. Por ejemplo, se demostró que un suplemento de proteína de soja estaba relacionado significativamente con la reducción de los niveles de triglicéridos en plasma respecto a los hidratos de carbono (Wofford y otros, Eur J Clin Nutr, 66(4):419-25 (2012)) y con la reducción de los niveles de colesterol LDL (Anderson y otros, J Am Coll Nutr, 30(2):79-91 (2011)). Los componentes de la proteína de soja, incluyendo la isoflavona de soja, la beta-conglicina y la glicina también redujeron los TG en modelos animales (de Souza Ferreira y otros, J Func Foods, 2:275-283 (2010)).

Los datos resultantes de estudios con animales y humanos sugieren un efecto positivo de la taurina (ácido 2-amino-etanosulfónico) en los niveles de colesterol y posibles triglicéridos en plasma (Mizushima y otros, Adv Exp Med Biol, 403:615-22 (1996); Lombardini and Militante, Adv Exp Med Biol, 583, 251-254 (2006)).

Tal como se describe aquí, el agente nutricional es una fuente de hidratos de carbono. Los ejemplos no limitativos de hidratos de carbono incluyen: almidón resistente, β -ciclodextrina, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de ellos.

Almidón resistente - como el almidón de maíz con elevado contenido de amilosa - es cualquier almidón que no se digiere en el intestino delgado, sino que pasa al intestino grueso, donde es fermentado por la microbiota intestinal. Un estudio demostró que el almidón de maíz con alto contenido de amilosa reducía las concentraciones de TG en un modelo animal de hiperlipidemia (Liu y otros, *J Nutri Biochem*, 21(2):89-97 (2010)). En otro estudio, el suplemento de una dieta alta en colesterol con β -ciclodextrina redujo los niveles plasmáticos de TG en ratas (García-Mediavilla y otros, *Pharmacol Toxicol*, 92(2):94-9 (2003); Favier y otros, *Metabolism*, 44(2):200-6 (1995)).

Tal como se describe aquí, el agente nutricional es una fuente de fibra dietética. Las fibras dietéticas incluyen, sin limitarse a ellas, psilio, pectina, β -glucano de salvado de avena o de cebada, fructo-oligosacáridos (p.ej. inulina), goma guar, goma acacia, galacto-oligosacáridos, sialil-lactosa, oligosacáridos derivados de la leche y cualquier fibra dietética procedente de frutas, hortalizas, frutos secos y cereales, y combinaciones de ellas.

Las dietas bajas en grasas y altas en hidratos de carbono suelen aumentar las concentraciones de TG en el plasma; sin embargo las intervenciones que llevan fibra dietética pueden contrarrestar estos efectos. Por ejemplo, la adición de inulina a una dieta moderadamente alta en hidratos de carbono disminuyó la concentración plasmática de TG en sujetos sanos (Letexier y otros, *Am J Clin Nutr*, 77(3):559-64). Se ha demostrado que el consumo de psilio redujo los TG en sujetos con diabetes de tipo 2 diabetes (Sartore y otros, *Eur J Clin Nutr*, 63(10):1269-71 (2009)) y en sujetos adolescentes obesos (Moreno y otros, *J Physiol Biochem*, 59(3):235-42 (2003)). Además, un estudio meta-analítico demostró que el psilio producía una reducción del colesterol total y del colesterol LDL en el suero, dependiente del tiempo y de la dosis (Wei y otros, *Eur J Clin Nutr*, 63(7):821-7 (2009)). Un estudio epidemiológico con personas de 40 a 60 años de edad indicó que el consumo de pectina está inversamente relacionado con la concentración de TG en el suero (Wu y otros, *Am J Clin Nutr*, 78(6):1085-91 (2003)). Asimismo, un suplemento de fructo-oligosacáridos para una dieta de sacarosa mejoró las concentraciones plasmáticas de TG y ácidos grasos libres en un modelo de rata resistente a la insulina (Agheli y otros, *J Nutr*, 128(8):1283-8 (1998)).

Otros agentes nutricionales que pueden utilizarse para reducir la cantidad de enterobacterias en el intestino pueden incluir productos fitoquímicos, por ejemplo fitonutrientes. Fitoquímicos se refiere a compuestos químicos procedentes de plantas o frutos, y fitonutrientes se refiere a compuestos fitoquímicos procedentes de plantas comestibles. Como fitonutrientes y fitoquímicos cabe citar, sin limitarse a ellos, fitonutrientes tales como isoflavona, polifenoles de uva tales como flavano, antocianina, quercetina, miricetina, kaempferol y resveratrol; fitoquímicos de granadas, tales como punicalagina, elagitaninos, perlagonidina, pelargonidina, punicalina, antocianinas, cianidina y ácido elágico; fitoquímicos procedentes de té verde, té oolong o café, tales como indol, polifenoles, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, flavonoides, taninos, teaflavina, ácido tánico, teofilina, teobromina, antocianinas y procianidina; fitoquímicos derivados del saborizante de la nuez de anacardo, como el (E)-2-hexenal; fitoquímicos del romero como el carnosol, el ácido carnósico o el ácido rosmarínico, y mezclas de ellos.

Tal como se describe aquí, la intervención nutricional comprende un producto alimenticio, incluyendo los productos a base de leche en polvo, bebidas instantáneas, formulaciones listas para beber, productos en polvo nutricionales; productos lácteos (p.ej. yogur o helados), productos de cereales, bebidas, agua, tés (p.ej. té verde o té oolong), café, bebidas expreso, bebidas de malta, bebidas con sabor de chocolate, productos culinarios y sopas. Tal como se describe aquí, el agente nutricional es una fórmula nutricionalmente completa.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración, pero no limitan la presente invención.

Ejemplo 1:

Cada vez hay más pruebas que corroboran el papel de los lipopolisacáridos (LPS) en la regulación de la sensibilidad a la insulina, pero se sabe poco acerca de la contribución relativa de los LPS intactos de las bacterias intestinales al metabolismo de glucosa del huésped. Este estudio demuestra que la abundancia de *Escherichia coli* (*E. coli*) es mayor en el íleon distal, en el ciego y en el colon de ratones ob/ob, en comparación con ratones C57BL/6J delgados, por un factor de 2,0, 3,1 y 2,9 log UFC/g, respectivamente. Para investigar si la sobreabundancia de *E. coli* no era solo el resultado de una deficiencia de leptina, sino que contribuía parcialmente a la obesidad y a la resistencia a la insulina de los ratones ob/ob, se aisló *E. coli* de las heces de ratones ob/ob y se administró a través del agua potable a ratones C57BL/6J alimentados con pienso convencional durante un periodo de 9 semanas. El suplemento con *E. coli* produjo un incremento persistente del recuento de fecal y cecal de *E. coli*, pero no tuvo ningún efecto en el peso corporal, ni en la composición corporal, ni en la tolerancia a la glucosa de los ratones. No obstante, se observó una tendencia al aumento de las concentraciones de triglicéridos en el plasma ($p = 0,07$) y en el hígado ($p = 0,051$) en los ratones tratados con *E. coli*. Lo más importante es que respecto a un tratamiento con vehículo, la administración de *E. coli* aminoró de manera significativa un 20% la aparición de triglicéridos en el plasma durante una prueba de tolerancia oral a los lípidos, y este efecto coincidió con un incremento del 31% del contenido de lípidos en el íleon. Los resultados demuestran en general que la *E. coli* residente juega un papel importante en el metabolismo intestinal de los lípidos y en la acumulación de lípidos en el intestino, independientemente de la obesidad. Estos resultados demuestran una conexión entre la microbiota intestinal y la regulación homeostática de los lípidos dietéticos.

Introducción

La diabetes de tipo 2 es un problema de salud pandémico y la Federación internacional de diabetes calcula que la prevalencia mundial de la enfermedad alcanzará los 371 millones al final de 2012 [1]. La inactividad física, el exceso de adiposidad y la resistencia a la insulina son probablemente los factores que contribuyen al rápido desarrollo de la diabetes de tipo 2, y se ha propuesto que aquellos que incluyen adipocinas, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial e inflamación crónica de baja intensidad influyen en la patogénesis de la diabetes de tipo 2 [2].

Los datos recientes indican que la microbiota intestinal puede contribuir al desarrollo de la diabetes de tipo 2. Varios grupos han referido que la diabetes de tipo 2 está relacionada con una microbiota intestinal alterada [3, 4] y que el metagenoma intestinal característico de la diabetes de tipo 2 está enriquecido en las vías implicadas en el transporte de azúcares y aminoácidos de cadena ramificada, en el metabolismo del metano, en la degradación de compuestos xenobióticos y en la reducción de sulfatos [5]. Apoyándose en la microbiota intestinal como causa de la diabetes de tipo 2, una línea de pruebas basada en la disminución de la microbiota intestinal demuestra que ratones criados en condiciones libres de gérmenes o ratones ob/ob y C57BL/6J insulino resistentes tratados con antibióticos tuvieron una tolerancia oral a la glucosa significativamente superior [6, 7]. Otra línea de pruebas centradas en la naturaleza proinflamatoria de los polisacáridos (LPS) localizados en la pared celular de bacterias gram-negativas demuestra que los LPS son parcialmente responsables de la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas [8]. La infusión crónica de LPS a los ratones produjo una obesidad leve, peor tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina hepática [8]. Estos efectos de los LPS fueron mitigados en ratones carentes de CD14 cuya señalización de LPS era deficiente [8], lo cual es indicio de conexiones patofisiológicas entre las respuestas inflamatorias a los LPS procedentes de las bacterias y la resistencia a la insulina.

En un estado fisiológico normal se puede hallar una pequeña cantidad de LPS circulante, pero se ha referido que la concentración de LPS es mayor en los sujetos con diabetes de tipo 2 que en los sujetos sanos [9, 10]. Sin embargo el mecanismo subyacente responsable de la absorción de LPS por las células epiteliales del intestino no está claro. Se ha propuesto tanto la vía transcelular como la vía paracelular [11]. Lo importante es que la grasa dietética es un factor nutricional crítico que facilita la absorción de los LPS [12]. Cani y otros demostraron en ratones que una alimentación alta en grasas aumenta los niveles de LPS circulante [8]. En los individuos sanos las concentraciones de LPS circulante están correlacionadas positivamente con la ingesta de energía [13] y en los individuos obesos el grado de hipertrigliceridemia tiene una relación positiva con las concentraciones de LPS en suero [14]. Amar y otros demostraron recientemente que la alimentación alta en grasas produce la adherencia de *E. coli* marcada con GFP a la mucosa del íleon [15], sugiriendo por lo tanto la adaptación dinámica de las bacterias intestinales gram-negativas como *E. coli* a la grasa dietética.

E. coli es la principal bacteria facultativa en el intestino humano. Las cepas residentes de *E. coli*, que normalmente son inofensivas en un entorno intestinal rico en nutrientes y en carbono, pueden resultar patógenas al pasar al tracto urinario rico en nitrógeno [16]. Otras cepas, como la *E. coli* enterotóxica, son patógenas y pueden provocar diarrea [17]. Al contrario que la *E. coli* patógena, la cepa Nissle 1917 de *E. coli* puede actuar como probiótico, por ejemplo mejorando el trastorno gastrointestinal [18]. Santacruz y otros han indicado hace poco que en la microbiota intestinal de mujeres gestantes con sobrepeso se halló un nivel de *E. coli* superior al de sus equivalentes de peso normal [19].

Para investigar el papel de la *E. coli* residente en la resistencia a la insulina, independientemente de la alimentación rica en grasas, se realizó una serie de ensayos, examinando primero la abundancia de *E. coli* en diferentes partes del intestino de ratones ob/ob resistentes a la insulina, alimentados con pienso corriente. Luego se aisló la *E. coli* de las heces de los ratones ob/ob y se administró a ratones C57BL/6J alimentados con pienso corriente. Se examinó el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en los ratones tratados y los datos se presentan aquí.

Materiales y métodos

Examen del contenido luminal en ratones ob/ob frente a ratones delgados

Se adquirieron ratones C57BL/6J y ob/ob de seis semanas de edad a los Laboratorios River (L'Arbresle, Francia). Los ratones se alojaron en grupos (5 ratones por jaula) y tuvieron acceso libre a pienso dietético (Kliba 3437, Provimi Kliba Nafag, Suiza) y agua, bajo un ciclo 12 h/12 h de luz/oscuridad. Tras 3 semanas de habituación se sacrificaron los ratones y se extrajo su tracto gastrointestinal para recortarlo en 9 segmentos de unos 2,5 cm de longitud, desde el estómago hasta el recto. Los segmentos se pesaron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para el análisis cuantitativo por PCR.

Colonización de los ratones por E. coli procedente de ratones ob/ob

La colonización de ratones delgados corrientes por *E. coli* procedente de ratones ob/ob se investigó en una serie de 3 protocolos. Para cada uno de ellos se adquirieron a los Laboratorios River (L'Arbresle, Francia) ratones C57BL/6J macho de 8 semanas de edad. Los ratones se enjaularon individualmente y tuvieron acceso libre a pienso dietético (Kliba 3437, Provimi Kliba Nafag, Suiza) y agua de Vittel, bajo un ciclo 12 h/12 h de luz/oscuridad. Tras 2 semanas de habituación los ratones se asignaron a uno de los dos grupos de peso igualado. El grupo 1 recibió agua de Vittel

y al grupo 2 se le añadieron 10⁸ UFC/ml de *E. coli* en el agua de beber durante 65 días. El peso corporal y la ingesta de agua y comida se registraron dos veces a la semana. La composición corporal se midió en estado de consciencia con un analizador EchoMRI TM 3-in-1 (Echo Medical Systems, Houston, TX) en la línea base (día 0) y hacia el final del periodo de suplementación (día 63). El recuento de enterobacterias en las heces se realizó a los días -3 y +3, y después cada dos semanas durante el periodo de tratamiento. Al final del tratamiento los ratones 1) se sacrificaron tras pasar la noche en ayunas o 2) se sometieron a una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) tras 6 horas de ayuno o 3) a una prueba de tolerancia oral a los lípidos (PTOL) tras pasar la noche en ayunas. Todos los ratones se sacrificaron el día 66. La glucosa en sangre se midió mediante una incisión en la cola antes de anestésarlos con isoflurano. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena cava en tubos recubiertos de EDTA y el plasma se recogió por centrifugación y se conservó a -40°C hasta el análisis. El contenido de los tejidos adiposos, del intestino y del ciego se pesó, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se conservó en el congelador a menos 80°C para su posterior análisis. Se llevaron a cabo dos ensayos independientes y se utilizaron en total 12 animales en cada grupo experimental.

15 *Aislamiento, preparación y detección de E. coli en las heces de ratones ob/ob*

Se cultivaron en placas heces de ratones ob/ob con medio Drigalski específico para enterobacterias. De cada ratón se eligieron una a dos colonias de enterobacterias y se analizaron con la galería API20E (Biomérieux, Francia). Los ADN procedente de las mismas colonias se compararon por PCR de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR; véase p.ej. Dalla-Costa y otros, J. Med. Microbiol., 47:227-234 (1998)) y por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (rep-PCR), a fin de comprobar la identidad genética [20, 21].

Se efectuó el recuento de una colonia escogida de *E. coli* en suspensiones aeróbicas preparadas con medio LB. Dos veces a la semana se preparó una suspensión fresca de *E. coli* a partir del cultivo congelado en glicerina, añadiendo el precultivo a 15 l de medio LB. El precultivo se dejó crecer durante 6-8 horas a 37°C. Luego se introdujeron 2,5 ml de la solución saturada del precultivo en dos matraces llenos de 250 ml de medio LB y los cultivos se dejaron crecer por la noche. A la mañana siguiente las soluciones bacterianas se centrifugaron durante 5 minutos a 5000xg (4°C) y el sedimento bacteriano se resuspendió en un volumen final de 2,5 l de agua de Vittel y luego se dio a los ratones. Para confirmar la colonización con *E. coli* se cuantificaron sus niveles en las heces, cultivando diferentes diluciones de una suspensión fresca de heces en un medio de cultivo semi-selectivo (medio de cultivo Drigalski), con el fin de enriquecerlas. Asimismo, la *E. coli* cecal se cuantificó por PCR cuantitativa con cebadores específicos de *E. coli* y se comparó con el contenido total de bacterias. Los cebadores y las condiciones de la PCR para la amplificación están representados en la tabla 1.

35 Tabla 1. Secuencias de los cebadores y condiciones de PCR empleadas en la detección de las bacterias

Cepa	SEQ ID NO:	Secuencia de cebadores (5'-3')	Condiciones de PCR
Bacterias totales	SEQ ID NO:1	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT	50°C, 2 min (1x) / 95°C, 10 min (1x) / 95°C, 15 seg + 60°C, 1 min (40x)
	SEQ ID NO:2	R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
<i>Escherichia coli</i>	SEQ ID NO:3	F:CATGCCGCGTGTATGAAGAA	50°C, 2 min (1x) / 95°C, 10 min (1x) / 95°C, 15 seg + 60°C, 1 min (40x)
	SEQ ID NO:4	R: CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	
<i>Firmicutes</i>	SEQ ID NO:5	F: GGAG(CT)ATGTGGTTAATTCTGAAGCA	50°C, 2 min (1x) / 95°C, 10 min (1x) / 95°C, 15 seg + 60°C, 1 min (40x)
	SEQ ID NO:6	R: AGCTGACGACAACCATGCAC	
Lactobacilos	SEQ ID NO:7	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	95°C, 5 min (1x) / 95°C, 15 seg + 58°C, 20 seg + 72°C, 45 seg (35x) / 72°C, 5 seg (1x)
	SEQ ID NO:8	R:CACCGCTACACATGGAG	
<i>Bacteroidetes</i>	SEQ ID NO:9	F: GGA(AG)CATGTGGTTAATTCTGATGAT	50°C, 2 min (1x) / 95°C, 10 min (1x) / 95°C, 15 seg + 60°C, 1 min (40x)
	SEQ ID NO:10	R: AGCTGACGACAACCATGCAG	
<i>Bacteroidaceae-Prevotella-Porphyrromonas</i>	SEQ ID NO:11	F: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	95°C, 5 min (1x) / 95°C, 15 seg + 68°C, 20 seg + 72°C, 30 seg (35x) / 80°C, 30 seg (1x)
	SEQ ID NO:12	R: CGGA(CT)GTAAGGGCCGTGC	
Bífidobacterias	SEQ ID NO:13	F: CTCCTGGAACGGGTGG	94°C, 5 min (1x) / 94°C, 20 seg + 55°C, 20 seg + 72°C, 50 seg (40x) / 94°C, 15 seg (1x)
	SEQ ID NO:14	R:GGTGTCTTCCCGATATCTACA	
Enterobacterias	SEQ ID NO:15	F: TGCCGTAACCTCGGGAGAAGGCA	95°C, 15 min (1x) / 94°C, 20 seg + 60°C, 20 seg + 72°C, 50 seg (40x) / 95°C, 15 seg (1x)
	SEQ ID NO:16	R:TCAAGGCTCAATGTTTCAGTGTC	

"F" significa cebador directo. "R" significa cebador inverso.

Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)

Al final del tratamiento, tras 6 horas de privación de comida, se realizó una PTOG durante el ciclo de luz. Después de medir la concentración de glucosa en la sangre obtenida por incisión en la cola, usando un glucómetro Ascensia Elite XL (Bayer AG, Zurich, Suiza), se dio a los animales una solución de glucosa al 30% por sonda gástrica oral a una dosis de 2 g/kg (peso/peso corporal) en el tiempo 0. La glucosa en sangre se midió después de 15, 30, 60 y 120 minutos. También se recogió sangre en tubos recubiertos de EDTA a los 0, 15 y 60 minutos, para analizar la insulina (IBL; Hamburgo, Alemania).

Prueba de tolerancia oral a los lípidos (PTOL)

En un ensayo independiente, los ratones tratados con *E. coli* se sometieron a una PTOL tras una noche de ayuno (14 horas). Al igual que la PTOG, la PTOL se llevó a cabo al final del periodo de tratamiento. Los animales recibieron 6 mg/g (peso/peso corporal) de aceite de maíz por sonda gástrica oral en el tiempo 0. La sangre se recogió en tubos recubiertos de EDTA a los 0, 60, 120, 180 y 240 minutos, para analizar los triglicéridos (TG) y los ácidos grasos no esterificados (AGNE). Los TG y los AGNE se midieron con el empleo de kits comerciales de BioMérieux (Francia) y Wako Diagnostics (Richmond, VA), respectivamente.

Análisis de plasma y tejidos

El contenido de triglicéridos, colesterol total, ácidos grasos no esterificados (Wako Diagnostics, Richmond, VA) y β -hidroxibutirato (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemania) en plasma se midió mediante el analizador COBAS C111 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los niveles de insulina (IBL; Hamburgo, Alemania) y de proteína fijadora de LPS (ELISA-LBP; #CKM043; Cell Sciences, Inc.; Canton, MA) se midieron usando kits comerciales. La glucosa en sangre se midió por incisión en la cola, utilizando un glucómetro Ascensia Elite XL (Bayer AG, Zurich, Suiza). Los marcadores inflamatorios en el plasma se midieron en una placa del kit MSD Mouse TH1/TH2 9-Plex Ultra-Sensitive (MesoScale Discovery, Gaithersburg, Maryland). La detección se efectuó según las instrucciones del fabricante.

Los lípidos se extrajeron de 200 mg de hígado congelado, según Folch y otros [22]. El colesterol se midió usando un kit comercial (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero los TG se hidrolizaron en una solución básica (KOH 0,5 N en etanol) y luego se midieron usando un kit comercial de análisis enzimático de TG (BioMérieux, France), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de las expresiones del ARNm

Se prepararon los ARN totales a partir de 50 mg de cortes de hígado o de intestino, empleando el kit Agencourt RNAdvance tissue (Agencourt, Beckman Coulter, Alemania) según el protocolo facilitado por el fabricante. Se realizó una transcripción inversa de 1,5 mg de ARN total, utilizando el kit de síntesis de la 1ª cadena de ADNc para PCR en tiempo real (AMV; Roche Biomedical, Basel, Suiza) con oligo d(T)₁₅ como cebador. Los análisis por PCR en tiempo real de la transcripción inversa se efectuaron en un ciclador térmico con detector fluorescente (sistema de detección de secuencias GeneAmp® PCR 5700; Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores figuran en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores y condiciones de PCR para el análisis de expresión de ARN

Gen de interés	SEQ ID NO:	Secuencia de cebadores (5'-3')
NF κ B	SEQ ID NO:17	F: CGGACAGCCCTCCACCTT
	SEQ ID NO:18	R: CAGCCCCACATTTCAACAAGA
Il-6	SEQ ID NO:19	F: GAAATGATGGATGCTACCAAACCTG
	SEQ ID NO:20	R: CCAGAAGACCAGAGGAAATTTTCA
TNF α	SEQ ID NO:21	F: ACCGTCAGCCGATTTGCTAT
	SEQ ID NO:22	R: TTGACGGCAGAGAGGAGGTT
ACC2	SEQ ID NO:23	F: AGCGGGACTCTGTCTCCTCAAG
	SEQ ID NO:23	R: CCATGATGACCTCTGGATGTTCT
PPAR α	SEQ ID NO:25	F: ACCATCCAGATGACACCTTCCT
	SEQ ID NO:26	R: GCCGAAGGTCCACCATTTTT
MTTP	SEQ ID NO:27	F: CACCTCAGCCAGAAAGCGATA
	SEQ ID NO:28	R: AGGGAACCCACGGGAATC

"F" significa cebador directo. "R" significa cebador inverso.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como mediana \pm error estándar de la mediana. Los resultados obtenidos en un único intervalo de tiempo se evaluaron mediante pruebas de Wilcoxon, y para comparar el grupo de tratamiento con el grupo de control se usaron pruebas no paramétricas aplicadas a dos muestras independientes (pruebas de Mann-Whitney). Para analizar el efecto de la *E. coli* en el peso corporal y en el aumento del mismo se aplicó el modelado de efectos mixtos (mediciones repetidas).

Resultados

Los niveles de *E. coli* están incrementados en la parte distal y en las heces de los ratones genéticamente obesos (*ob/ob*). Se examinaron los contenidos lumbales de ratones *ob/ob* y ratones de tipo natural mediante una técnica de PCR cuantitativa, tomando una referencia de C57BL/6J, y los resultados probaron que el número total de bacterias era similar en los ratones de tipo *ob/ob* y de tipo natural (tabla 3), aunque la proporción de *E. coli* en la parte distal del intestino (es decir ciego, colon y heces) fue mayor en los ratones *ob/ob* que en sus homólogos delgados por un factor de 2,0, 3,1 y 2,9 log UFC/g, respectivamente. Para valorar si la cepa sobrerrepresentada podía estar asociada funcionalmente a la obesidad se aisló la *E. coli* de estos ratones. Para ello se agregaron heces de 8 ratones *ob/ob* diferentes a un medio de cultivo selectivo de enterobacterias y se desarrollaron en condiciones selectivas. Todas las colonias en crecimiento fueron identificadas como *E. coli* por análisis con la galería API20E. La identidad genética de todos los clones se comparó por medio de ERIC- y REP-PCR, y los resultados demostraron que todas las colonias tenían las mismas firmas moleculares. Como estas técnicas no pusieron de manifiesto ninguna diferencia entre los distintos aislados, para los siguientes ensayos se eligió una sola colonia del ratón que presentó el peso corporal más alto.

Tabla 3. Recuento de bacterias totales y *E. coli* en el tracto gastrointestinal de ratones *ob/ob* y ratones de control de tipo natural

		Log (células/g de tejido)	
		tipo natural	<i>ob/ob</i>
Bacterias totales	Duodeno	7,65 ± 0,48	7,50 ± 0,33
	Yeyuno	9,48 ± 0,71	8,55 ± 0,62
	Ileon	10,21 ± 0,22	9,96 ± 0,35
	Ciego	10,56 ± 0,26	10,91 ± 0,53
	Colon	10,16 ± 0,51	10,30 ± 0,69
	Heces	11,43 ± 0,10	11,32 ± 0,10
Escherichia coli	Duodeno	5,07 ± 0,00	5,07 ± 0,00
	Yeyuno	5,09 ± 0,00	5,09 ± 0,00
	Ileon	5,03 ± 0,00	5,03 ± 0,29
	Ciego	4,84 ± 0,36	7,10 ± 0,97*
	Colon	4,86 ± 0,00	6,85 ± 1,03*
	Heces	5,49 ± 0,00	7,89 ± 0,27**

Los datos están expresados como mediana ± error estándar de la mediana. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (prueba de Wilcoxon), $n = 5$ ratones por grupo.

Para comprobar los posibles impactos fisiológicos de la cepa de *E. coli* aislada de ratones *ob/ob*, a ratones de tipo natural alimentados con pienso corriente se les dio libre acceso durante 65 días a agua que contenía 10^8 UFC/ml de *E. coli*. La ingesta de agua se midió dos veces a la semana y no se halló ninguna diferencia con la suplementación de *E. coli* (tabla 4).

Tabla 4. Agua acumulada e ingesta/eficiencia de la comida

	Control	Tratados
Ingesta de agua acumulada (g)	88,1 ± 3,2	77,9 ± 3,9
Ingesta de comida acumulada (Kcal)	1380 ± 121	1536 ± 279
Eficiencia de la comida (mg/Kcal)	4,04 ± 0,42	3,95 ± 0,43
Los datos están expresados como mediana ± error estándar de la mediana, $n = 11-12$		

Basado en el consumo de agua, la ingesta media de *E. coli* fue aproximadamente de $8,6 \pm 0,2$ log UFC/día. El éxito de la colonización se controló por recuento de la *E. coli* cultivada a partir de las heces de ratones tratados con *E. coli* a diferentes intervalos de tiempo durante el estudio. Tal como indica la tabla 5, los ratones tratados presentaron un aumento del recuento de *E. coli* fecal y este mayor recuento persistió durante el curso del ensayo (hasta el día 62).

Tabla 5. Recuento de *E. coli* en heces después del tratamiento

		Días	Control	Tratados
log <i>E. coli</i> fecal (log ufc/g)		-6	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
		2	4,5 ± 0,2	8,0 ± 0,0
		8	5,0 ± 0,1	7,5 ± 0,1
		15	5,0 ± 0,1	7,9 ± 0,1
		32	4,9 ± 0,1	7,3 ± 0,2
		50	5,2 ± 0,2	7,6 ± 0,1
		57	5,0 ± 0,2	7,6 ± 0,1
		62	4,5 ± 0,2	6,8 ± 0,1

Los datos están expresados como mediana ± error estándar de la mediana. ** p < 0,01, *** p < 0,001 (prueba de Mann-Whitney), n = 11-12 ratones por grupo.

5 El incremento de la colonización por *E. coli* fue específico. La cantidad total de bacterias fecales, de los grupos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, Enterobacterias, *Bacteroidetes-Prevotella-Porphyrmona*, Bífidobacterias y Lactobacilos se determinó mediante una técnica de PCR cuantitativa y todos los grupos, excepto las enterobacterias (la familia a la cual pertenece la *E. coli*), no fueron alterados por la suplementación con *E. coli* (tabla 6).

Tabla 6. Cantidad de grupos bacterianos al inicio y al final del estudio

Log (células/g)	Control		Tratados		Límite de detección
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Bacterias totales	10,8 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,7 ± 0,1	10,6 ± 0,1	6,021
<i>Firmicutes</i>	10,5 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	6,224
<i>Bacteroidetes</i>	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	5,890
Enterobacterias	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	9,1 ± 0,1	6,993
<i>Bacteroidetes-Prevotella-Porphyrmona</i>	9,7 ± 0,1	9,9 ± 0,2	9,9 ± 0,1	9,9 ± 0,1	7,958
Bífidobacterias	8,6 ± 0,2	7,0 ± 0,0	9,6 ± 0,4	8,6 ± 0,2	8,306
Lactobacilos	9,5 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	6,175
Las unidades son log células/g. Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 11-12					

10 Se ha referido que los niveles plasmáticos de proteína fijadora de LPS (LBP) están relacionados con la cantidad de LPS en el plasma [23]. Por tanto la LBP se usó como un marcador sustitutivo para la exposición sistémica a los LPS. La LBP se encontró en ambos grupos, pero las concentraciones de *E. coli* en los animales tratados fueron altas en comparación con los animales de control (tabla 7). Así, la administración de *E. coli* en el agua de beber aumentó la población de *E. coli* en los ratones receptores, lo cual demuestra la colonización exitosa y persistente de *E. coli* en estos ratones.

Tabla 7. Recuento de *E. coli* cecal y concentración de proteína fijadora de lipopolisacáridos en ratones tratados y no tratados

	Control	Tratados
<i>E. coli</i> cecal (log UFC/g)	6,41 ± 0,018	8,15 ± 0,01***
LBP en plasma (µg/ml)	5,04 ± 0,15	7,95 ± 0,39**
Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana. ** p < 0,01, *** p < 0,001 (prueba de Mann-Whitney), n = 11-12 ratones por grupo		

20 Se midieron las citocinas proinflamatorias en el plasma de los ratones, y entre los ratones tratados con *E. coli* y los ratones de control no se halló ninguna diferencia en los parámetros (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, KC-GRO, IL-10, IL-12-p70 y TNFα) tras una noche de ayuno (tabla 8). También se midieron las expresiones en el yeyuno del ARNm de NF-κB, IL-6 y TNFα y no se encontró ninguna diferencia entre los dos grupos (tabla 8 y 9).

Tabla 8. Citocinas en plasma tras una noche de ayuno

pg/ml	Control	Tratados
IFN-γ	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2
IL-1β	9,2 ± 0,4	6,1 ± 0,7
IL-2	9,6 ± 0,7	8,0 ± 1,4
IL-4	3,6 ± 0,9	2,5 ± 0,8
IL-5	6,8 ± 0,6	8,5 ± 0,4
KC-GRO	54,2 ± 4,7	55,3 ± 7,7
IL-10	35,7 ± 3,4	23,2 ± 2,2
IL12-p70	1083,4 ± 75,6	1211,5 ± 142,5
TNFα	490,8 ± 36,0	295,5 ± 30,5
Las unidades son pg/ml. Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 11-12		

Tabla 9. Expresión de TNFα en el yeyuno tras una noche de ayuno

Relativa a RPLP0	Control	Tratados
NF-κB	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2
IL-6	3,6 ± 0,9	2,5 ± 0,8
TNFα	490,8 ± 36,0	295,5 ± 30,5
Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 12		

30 Al comienzo del ensayo ambos grupos presentaron el mismo peso corporal (25,2 ± 0,3 g en los ratones tratados con *E. coli* frente a 25,3 ± 0,3 g en los ratones de control) y la ganancia de peso durante el estudio no fue afectada por el tratamiento con *E. coli* (tabla 10).

Tabla 10. Pesos corporales de los ratones de control y los ratones tratados

Peso corporal (g)	Días	Control	Tratados
	-5	24,3 ± 0,5	24,0 ± 0,5
1	25,5 ± 0,4	25,5 ± 0,4	
4	25,7 ± 0,5	25,9 ± 0,4	
8	26,0 ± 0,5	25,9 ± 0,5	
11	26,8 ± 0,6	26,3 ± 0,6	
15	26,4 ± 0,4	26,2 ± 0,6	
18	26,9 ± 0,5	26,5 ± 0,4	
22	26,8 ± 0,5	26,8 ± 0,5	
25	27,3 ± 0,6	27,0 ± 0,5	
29	27,1 ± 0,6	27,4 ± 0,4	
32	27,0 ± 0,7	27,1 ± 0,5	
36	27,7 ± 0,7	28,1 ± 0,6	
39	27,8 ± 0,8	28,2 ± 0,5	
43	28,5 ± 0,8	28,7 ± 0,5	
50	29,2 ± 0,9	29,3 ± 0,5	
53	30,0 ± 0,9	30,2 ± 0,5	
57	30,3 ± 1,0	29,6 ± 0,6	
60	30,2 ± 0,9	30,3 ± 0,6	
63	30,5 ± 0,9	30,4 ± 0,6	

Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 9-12 ratones por grupo

- 5 La composición corporal se midió antes y después del tratamiento y los resultados no revelaron ninguna diferencia de masa magra y masa grasa entre los animales tratados con *E. coli* y los respectivos controles (tabla 11). Los ratones tratados con *E. coli* presentaron un peso corporal normal y tolerancia a la glucosa.

Tabla 11. Composición corporal de los ratones tratados y no tratados

Días	Control		Tratados	
	Masa magra (%)	Masa grasa (%)	Masa magra (%)	Masa grasa (%)
-5	87,0 ± 0,8	10,0 ± 0,3	87,1 ± 0,9	11,0 ± 0,7
63	77,7 ± 1,6	15,4 ± 1,5	75,1 ± 0,7	18,1 ± 1,1

Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 9-12 ratones por grupo

- 10 Al final del estudio se administró a los ratones una carga oral de glucosa. Tal como muestra la tabla 12, la glucemia en ayunas fue casi idéntica en ambos grupos y las curvas de tolerancia a la glucosa no mostraron ninguna diferencia entre los ratones tratados y los ratones de control. De acuerdo con los datos de glucosa, los valores de insulina en el plasma durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) no revelaron ninguna diferencia entre los animales tratados y los animales no tratados (tabla 12); esto indica que el tratamiento de la glucosa en los ratones C57BL/6J alimentados con pienso no fue afectada por la elevada cantidad de *E. coli* en el intestino.

Tabla 12. Glucosa en sangre, insulina en plasma y área bajo la curva de ambos parámetros durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa

Tiempo (min)	Glucosa (mmoles/l)		Insulina (ng/l)	
	Control	Tratados	Control	Tratados
0	7,0 ± 0,3	7,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
15	16,1 ± 0,9	16,7 ± 0,7	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3
30	16,4 ± 1,8	16,1 ± 1,2		
60	12,3 ± 1,0	12,1 ± 1,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2
120	9,1 ± 0,6	9,1 ± 0,4		
ABC	1481 ± 128	1482 ± 87	80,2 ± 14,3	88,6 ± 16,0

Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 9-12 ratones por grupo. ABC significa área bajo la curva.

- 20 Perfil de lípidos alterado en el plasma y en el hígado de ratones tratados con *E. coli*. Se compararon los pesos de los órganos de los ratones tratados y no tratados al sacrificarlos tras 6 horas de privación de comida y no se encontró ninguna diferencia entre los dos grupos (tabla 13).

- 25

Tabla 13. Peso del cuerpo y de los tejidos tras el sacrificio

	Control	Tratados
Peso corporal (g)	27,2 ± 0,5	27,2 ± 0,4
Tejido adiposo epididimal (g)	0,647 ± 0,078	0,681 ± 0,043
Tejido adiposo retroperitoneal (g)	0,166 ± 0,025	0,164 ± 0,012
Tejido adiposo mesentérico (g)	0,216 ± 0,022	0,232 ± 0,018
Panículo adiposo total (g)	1,028 ± 0,121	1,077 ± 0,072
Tejido adiposo pardo (g)	0,076 ± 0,007	0,067 ± 0,003
Gastrocnemio (g)	0,332 ± 0,011	0,322 ± 0,006
Hígado (g)	1,085 ± 0,023	1,046 ± 0,018
Ciego (g)	0,272 ± 0,015	0,248 ± 0,011
Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana, n = 12		

No obstante, se observó una tendencia a mayores valores plasmáticos de triglicéridos (TG) en el grupo de ratones tratados con *E. coli* ($p = 0,07$, tabla 14), mientras que el contenido de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en el plasma no varió con el tratamiento. Además de los cambios en los TG, el cuerpo cetónico circulante β -hidroxibutirato (β -HB) tendió a subir en el grupo tratado respecto al no tratado ($p = 0,07$). En el intestino, la expresión de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos del yeyuno (MTTP), un gen responsable de la secreción de lipoproteínas que contienen triglicéridos) siguió los niveles plasmáticos de TG y mostró una tendencia al aumento (+37%) en los ratones tratados, respecto a los ratones de control ($10,8 \times 10^{-2}$ vs. $8,6 \times 10^{-2}$, respectivamente, referido a la GAPDH, $p = 0,069$). Las concentraciones de TG en el hígado aumentaron análogamente en los ratones tratados con *E. coli* por un factor del 24% ($p = 0,051$, tabla 14). Como la proporción de β -HB refleja el grado de oxidación de los ácidos grasos se examinó la expresión del ARNm de varios genes de oxidación de lípidos en el hígado. La acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2) es un enzima regulador en la síntesis del malonil-CoA citosólico [24] y la concentración de malonil-CoA citosólico regula negativamente la oxidación de los lípidos, inhibiendo el transportador mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga CPT1a. La expresión del ARNm de la ACC2 disminuyó en el grupo del tratamiento (tabla 14), lo cual sugiere el aumento de la absorción de ácidos grasos por las mitocondrias, para oxidarlos. Además, el receptor α activado mediante proliferadores peroxisómicos (PPAR α), gen responsable de accionar el programa de oxidación de lípidos [25], mostró una tendencia a una mayor expresión en los ratones tratados con *E. coli* (tabla 14).

Tabla 14. Perfil alterado de lípidos en el plasma y el hígado de ratones tratados con *E. coli*

		Control	Tratados
Plasma	TG (mmoles/l)	0,56 ± 0,03	0,63 ± 0,02 ^a
	AGNE (mmoles/l)	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,02
	β -HB (μ moles/l)	420 ± 84	724 ± 164 ^a
Hígado	TG (mg/g de tejido)	34,3 ± 0,03	47,8 ± 1,5 ^b
	ACC2 (expresión relativa)	8,1E-04 ± 0,5E-04	4,1E-04 ± 0,3E-04*
	(expresión relativa)	9,4E-02 ± 0,2E-02	1,1E-04 ± 0,2E-02 ^c

Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana. * $p < 0,05$ (prueba de Mann-Whitney),
^a $p = 0,07$, ^b $p = 0,05$, ^c $p = 0,08$, $n = 11-12$ ratones por grupo. TG, triglicéridos; AGNE, ácido graso no esterificado; β -HB, β -hidroxibutirato; ACC2, acetil-CoA carboxilasa 2; PPAR α , receptor activado por proliferadores peroxisómicos.

Por consiguiente el tratamiento con *E. coli* afectó selectivamente al metabolismo hepático de lípidos promoviendo la β -oxidación de los ácidos grasos hepáticos en un estado de 6 horas en ayunas, sin alterar la composición corporal ni la tolerancia a la glucosa oral de los ratones, pero lo pareció. Sin embargo este efecto de la *E. coli* fue sensible al ayuno prolongado, pues los niveles plasmáticos de TG, β -HB y AGNE, así como el contenido de lípidos en el hígado, fueron comparables entre los ratones tratados con *E. coli* y los ratones no tratados después de 14 horas de ayuno por la noche (tabla 15).

Tabla 15. Lípidos medidos tras 14 horas de ayuno por la noche

	Control	Tratados
Plasma		
Triglicéridos (mmoles/l)	1,02 ± 0,08	1,05 ± 0,07
AGNE (mmoles/l)	0,60 ± 0,02	0,60 ± 0,05
β -hidroxibutirato (μ moles/l)	2200 ± 133	2200 ± 167
Hígado		
Triglicéridos (mg/g seco)	438,8 ± 11,6	429,6 ± 15,1
Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana		

Para seguir estudiando los cambios inducidos por *E. coli* en el metabolismo de los lípidos, los ratones se sometieron a una prueba de tolerancia oral a los lípidos (PTOL). Para ello se administró a los ratones una carga de lípidos por sonda gástrica oral después de 14 horas de ayuno y se midieron las concentraciones plasmáticas de TG durante un periodo de 4 horas. Tal como se esperaba, los niveles plasmáticos de TG subieron durante la PTOL en los ratones de control, alcanzando un máximo a los 60 minutos después de la administración (tabla 16). En cambio los ratones tratados con *E. coli* no mostraron el aumento esperado de TG en el plasma y las concentraciones de TG quedaron cerca de la línea base durante las 4 horas de observación. Por otro lado las concentraciones de AGNE disminuyeron tras la administración de lípidos por sonda gástrica oral y el grado de eliminación fue prácticamente idéntico en los ratones tratados y en los ratones de control (tabla 16).

Tabla 16. Concentraciones de triglicéridos y ácidos grasos no esterificados durante una carga oral de lípidos

Tiempo (min)	TG (mmoles/l)		AGNE (mmoles/l)	
	Control	Tratados	Control	Tratados
0	1,05 ± 0,06	1,02 ± 0,04	1,56 ± 0,08	1,66 ± 0,08
60	1,22 ± 0,08	1,02 ± 0,07	1,20 ± 0,06	1,09 ± 0,12
120	1,23 ± 0,08	0,94 ± 0,04*	1,31 ± 0,07	1,13 ± 0,11
180	1,18 ± 0,12	0,90 ± 0,05**	1,27 ± 0,07	1,21 ± 0,09
240	1,09 ± 0,06	0,94 ± 0,06	1,32 ± 0,04	1,38 ± 0,10
ABC	287 ± 11	230 ± 11**		

Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana. * p < 0,05 comparado con el grupo de control; ** p < 0,01 comparado con el grupo de control. (Prueba de Mann-Whitney), n = 11-12 ratones por grupo.

Los parámetros plasmáticos tras la PTOL indicaron que este efecto era específico de los TG, ya que otras clases de lípidos como los AGNE o el colesterol no fueron afectados por el tratamiento (tabla 17). Tras la PTOL se encontró una cantidad importante de lípidos en el ciego, pero estas cantidades fueron similares en los dos grupos de animales (tabla 18). Sin embargo se encontró que los TG en el íleon eran significativamente elevados en los ratones tratados con *E. coli* (tabla 18), lo cual sugiere que la retención de los TG por el intestino es la causa de la aparente falta de respuesta de los ratones tratados con una carga oral de lípidos. Los ratones tratados con *E. coli* se caracterizan por una respuesta anómala a una carga oral de lípidos y por la acumulación de lípidos en el íleon.

Tabla 17. Lípidos en plasma medidos tras la PTOL

	Control	Tratados
Triglicéridos (mmoles/l)	1,59 ± 0,10	1,18 ± 0,08*
AGNE (mmoles/l)	0,60 ± 0,05	0,65 ± 0,05
Colesterol (mmoles/l)	2,28 ± 0,10	2,35 ± 0,02
β-hidroxibutirato (μmoles/l)	3125 ± 138	3145 ± 188

Tabla 18. Concentraciones de triglicéridos en el contenido cecal y el íleon

	Control	Tratados
TG en el ciego (mg/g seco)	372,2 ± 8,8	319,5 ± 16,0
TG en el íleon (mg/g húmedo)	21,6 ± 2,9	28,2 ± 2,3*

Los datos están expresados como mediana ± error estándar de la mediana. * p < 0,05 comparado con el grupo de control; ** p < 0,01 comparado con el grupo de control. (Prueba de Mann-Whitney), n = 11-12 ratones por grupo.

Para determinar si la correlación entre el aumento de triglicéridos en el plasma y una abundancia de *E. coli* intestinal observada en el estudio con ratones (tabla 3 y tabla 4) también era cierta en sujetos humanos con diabetes de tipo 2 se midió la concentración de TG en el plasma y el recuento de *E. coli* en las heces de pacientes con sobrepeso, de pacientes diabéticos con sobrepeso y de pacientes no diabéticos. Los sujetos diabéticos mostraron un incremento estadísticamente significativo de los niveles de TG en plasma y del recuento de *E. coli* (tabla 19). Los datos indican que la detección de un mayor nivel (p.ej. concentración) de *E. coli* intestinal puede ser predictiva de un aumento de TG en el plasma y/o de diabetes en un sujeto con sobrepeso.

Tabla 19. Concentración de triglicéridos en plasma y recuento de *E. coli* de sujetos humanos diabéticos con sobrepeso y no diabéticos con sobrepeso

	Diabéticos con sobrepeso	No diabéticos con sobrepeso
Triglicéridos en plasma (mmoles/l)	1,54 ± 0,21***	0,99 ± 0,10
<i>E. coli</i> en heces (células/g)	7,48 ± 0,27***	7,06 ± 0,22

Datos expresados como mediana ± error estándar de la mediana. *** p < 0,001 comparado con el grupo no diabético con sobrepeso. (Prueba de Mann-Whitney), n = 21-25 por grupo.

Discusión

La naturaleza proinflamatoria de los LPS ha sido bien documentada como causa de la resistencia a la insulina. Sin embargo no es tan sabido que el aumento de la cantidad luminal de LPS por aporte de *E. coli* viable pueda perturbar la sensibilidad a la insulina. Por tanto se aisló *E. coli* de ratones *ob/ob* y se dio como suplemento a ratones C57BL/6J corrientes. En contraste con recientes publicaciones sobre los LPS, no se observó ningún cambio importante en el peso corporal ni en la tolerancia a la glucosa oral de los ratones después del tratamiento. En cambio el metabolismo intestinal de los lípidos se alteró llamativamente en respuesta a una carga oral de lípidos.

Se ha demostrado que los lipopolisacáridos (LPS) existentes en la membrana externa de bacterias gram-negativas participan en la etiología de los trastornos metabólicos [8]. En este estudio se observaron mayores niveles de *E. coli* gram-negativa en el íleon distal, en el ciego y en el colon de los ratones *ob/ob* respecto a los ratones de tipo natural. Presuntamente los LPS existentes en la superficie de *E. coli* residente pueden entrar en la circulación general debido al deterioro de la función de barrera intestinal mediada por GLP-2 en los ratones *ob/ob* [26], pues se ha demostrado que los ratones *ob/ob* tienen mayores concentraciones de LPS circulantes que el control de tipo natural [27]. En vez de medir los LPS se ha propuesto la LBP como marcador alternativo de LPS, ya que las concentraciones de LBP y LPS en el plasma son ambas mayores en los ratones *ob/ob* que en los ratones de control [23]. En este estudio los niveles de LBP en los ratones tratados con *E. coli* fueron superiores en un estado post-absortivo, así como después de la carga oral de lípidos, lo cual indica un estado proinflamatorio en estos ratones. Sin embargo la medición de las citocinas circulantes tras una noche de ayuno (tabla 8) no dio resultados distintos en los ratones tratados y en los no tratados, lo cual es indicio de una respuesta inflamatoria inapreciable a la suplementación con *E. coli*. Previamente se demostró que un tratamiento con antibiótico mejoraba la tolerancia a la glucosa de los ratones *ob/ob* y disminuía la expresión intestinal del ARNm de TNF α [6]. En el presente estudio la ausencia de variación de la tolerancia a la glucosa coincidió con un aumento similar de la expresión intestinal del ARNm de TNF α , corroborando el hecho de que el tratamiento con *E. coli* no produjo una respuesta inflamatoria auténtica en los ratones no obesos alimentados con pienso. En cambio una combinación del tratamiento con *E. coli* y una dieta alimenticia rica en grasas afectó a la función de barrera y produjo respuestas proinflamatorias y resistencia a la insulina en los ratones.

El hallazgo más inesperado fue ver cómo el tratamiento con *E. coli* redistribuía los lípidos en dos grupos diferentes. Durante una prueba de carga de lípidos los ratones tratados con *E. coli* presentaron un menor contenido de TG en el plasma. Tras la PTOL los lípidos cecales fueron similares, tanto en el grupo tratado como en el grupo no tratado, lo cual sugiere que la malabsorción intestinal de lípidos era improbable, debido a la supresión de TG en el plasma. En un estado post-absortivo (6 h de privación de comida en un ciclo de luz) los ratones tratados con *E. coli* mostraron un incremento de TG en el plasma, pero este efecto desapareció tras el ayuno nocturno. Basándose en los datos, se formula la hipótesis de que la colonización excesiva de *E. coli* en el intestino provoca la retención de los TG de la dieta en el intestino y retarda la liberación de TG a la circulación. Apoyando esta idea, tanto la expresión del ARNm de MTTP, un gen involucrado en la secreción intestinal de lipoproteínas, como la concentración de TG en el plasma fueron altas en los ratones tratados durante el estado post-absortivo. Recientemente, Robertson y otros demostraron que los lípidos pueden estar almacenados en enterocitos y ser liberados al cabo de varias horas como respuesta a una carga de glucosa [28]. Como también han demostrado recientemente Fielding y otros, una parte de los lípidos procedentes de una primera comida se hallaron en quilomicrones de la siguiente comida [29]. Estos datos indican que la cantidad de *E. coli* intestinal tiene importancia clínica en la regulación de la cinética de entrada a la circulación general de las grasas dietéticas.

La acumulación ectópica de grasa es una de las características de la resistencia a la insulina y las observaciones de acumulación excesiva de grasa en el hígado y en el músculo esquelético de las personas y animales resistentes a la insulina confirman este argumento. Sin embargo el intestino no ha sido del todo reconocido como reserva transitoria de lípidos. Recientemente, Zhu y otros aplicaron una técnica de microscopía de dispersión coherente Raman anti-Stokes y observaron que los enterocitos tienen la capacidad de almacenar lípidos en forma de gotitas después de una carga de grasa [30]. Posteriormente Uchida y otros demostraron una secreción intestinal de TG reducida como respuesta a una carga dietética de grasa en ratones obesos frente a ratones delgados [31]. Análogamente Douglass y otros refirieron que ratones *ob/ob* acumulaban TG en el intestino durante la alimentación y después de una carga oral de lípidos [32]. En el presente estudio, la administración de *E. coli* aislada de las heces de ratones *ob/ob* a los ratones alimentados de pienso redujo la presencia de TG en la circulación y aumentó el contenido de lípidos medido en el íleon tras una carga oral de lípidos, lo cual recuerda los hallazgos en ratones *ob/ob* publicados por Douglass y otros. Estos datos sugieren que la desregulación del metabolismo intestinal de los lípidos en los ratones *ob/ob* puede imitarse administrando a los ratones un suplemento de la *E. coli* aislada de las heces de ratones *ob/ob*. En cambio, otras irregularidades resultantes de la mutación de leptina, tales como la hiperfagia, la obesidad y la resistencia a la insulina medida por la prueba de tolerancia a la glucosa oral, no fueron afectadas por el tratamiento con *E. coli*.

Otra reserva ectópica de lípidos es el hígado, y la acumulación de grasa en el hígado está relacionada con muchos estados patógenos, tales como la enfermedad del hígado graso no alcohólico y alcohólico, y la esteatohepatitis no alcohólica. Se ha supuesto que la disbiosis de la microbiota intestinal causa NAFLD and NASH [33]. En el presente estudio, las concentraciones hepáticas de TG medidas en el estado post-absortivo fueron mayores en los ratones tratados con *E. coli* que en los ratones no tratados. El análisis de la expresión genética y las mediciones de cuerpos cetónicos en plasma indicaron un aumento compensatorio de la oxidación de ácidos grasos en los ratones tratados,

un fenómeno encontrado frecuentemente en la NAFLD [34]. Los datos indican una relación causal entre la *E. coli* intestinal y el desarrollo de NAFLD. Es interesante que tanto la grasa hepática como los TG en la circulación tras un estado de ayuno nocturno no fueron afectados por el tratamiento con *E. coli*.

5 Resumidamente, este ejemplo demuestra que la *E. coli* residente juega un papel importante en la regulación del metabolismo de lípidos del huésped, variando la distribución de los TG en el intestino, en el hígado y en el plasma. No obstante, el peso corporal y la tolerancia a la glucosa oral no fueron afectados por la suplementación con *E. coli*. En total los datos extienden el conocimiento de la *E. coli* residente, más allá de la patogénesis de las enfermedades infecciosas, a su papel en la regulación homeostática de los lípidos de la dieta.

10

Ejemplo 2:

En el intestino delgado, los lípidos de la dieta son digeridos antes de ser absorbidos por los enterocitos. Una vez dentro de las células, los lípidos dietéticos pasan por varias etapas de síntesis y transporte antes de ser liberados a la circulación linfática a través de quilomicrones. Con el fin de determinar los efectos del tratamiento con *E. coli* sobre el metabolismo de los lípidos en el intestino de los ratones, analizamos la expresión de los genes y de las proteínas que son importantes para las vías de síntesis y transporte de los lípidos. En primer lugar examinamos la expresión de la proteína 4 transportadora de ácidos grasos (FATP4), el principal transportador que interviene en la absorción de los lípidos de la dieta. Nuestros resultados indicaron que las expresiones del ARNm de FATP4 no eran afectadas por el tratamiento con *E. coli*, ni por la prueba de tolerancia a la glucosa oral. Sin embargo los niveles de la proteína FATP4 no mostraron el mismo patrón de expresión que el ARNm de FATP4. En los ratones de control la carga oral de lípidos incrementó 2 veces los niveles de la proteína FATP4, mientras que en los ratones tratados con *E. coli* la expresión de FATP4 no cambió tras la carga de lípidos. En segundo lugar examinamos la expresión del ARNm y la expresión proteica de monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT) en el intestino. En los enterocitos la MGAT es uno de los enzimas responsables de la esterificación de los ácidos grasos para formar los triglicéridos. Al nivel del ARNm el tratamiento con *E. coli* y la carga de lípidos no tuvieron ningún efecto en la expresión del MGAT, un resultado similar al de la FATP4. A nivel proteico la expresión del MGAT fue elevada por la carga de lípidos en los ratones de control, pero no en los ratones tratados con *E. coli*, un resultado también similar al de la FATP4. En tercer lugar medimos el ARNm y la proteína de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTTP) en el intestino. La MTTP es crítica para la síntesis de las vesículas de transporte de los prequilomicrones ricos en triglicéridos dentro del retículo endoplasmático (RE), por fusión en gotitas lípidas de las partículas ricas en el fosfolípidos y apoB48 (35). Nuestros resultados indicaron que la carga de lípidos inducía en similar medida la expresión del ARNm de MTTP, tanto en los ratones no tratados como en los ratones tratados con *E. coli*. Bajo las mismas condiciones de carga de lípidos, las concentraciones de proteína MTTP fueron elevadas en los ratones no tratados, pero no en los ratones tratados con *E. coli*. Por último medimos los niveles de la proteína SEC24c. La proteína SEC24c se encuentra en las vesículas de transporte de los prequilomicrones y es importante para el transporte de vesículas de prequilomicrones del RE al aparato de Golgi de los enterocitos intestinales (36). En los ratones no tratados, los niveles de la proteína SEC24c fueron mayores tras la carga de lípidos que antes de ella. En los ratones tratados con *E. coli* las concentraciones de proteína SEC24c no fueron afectadas por la carga de lípidos.

40

En todos los genes que medimos, las expresiones del ARNm no siempre correspondieron a los niveles de proteína. La discrepancia entre las concentraciones de ARNm y proteína sugiere que la presencia de *E. coli* puede afectar a la síntesis o a la degradación proteica, lo cual da como resultado una regulación a la baja de las proteínas celulares que son necesarias para la síntesis y el transporte de lípidos. En los enterocitos, el RE es un orgánulo importante para la síntesis/degradación proteica y la síntesis/transporte de lípidos. La acumulación de proteínas no plegadas en el RE produce estrés en el mismo y se ha demostrado que esta tensión afecta a la lipogénesis y al mantenimiento del metabolismo de lípidos a través de dos vías de estrés del RE, PERK-eIF2 α -ATF4 y IRE1 α -XBP1 (37). Además se ha demostrado que la *E. coli* produce estrés en el intestino (38, 39). Basándonos en la evidencia de la literatura formulamos la hipótesis de que el estrés en el RE es elevado en los ratones tratados con *E. coli*. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con *E. coli* aumentaba los niveles del ARNm de *xbpl* independientemente de la carga oral de lípidos. El tratamiento con *E. coli* también aumentó el ARNm de *atf4* y *chop* en comparación con los ratones no tratados, pero las diferencias fueron importantes en el estado correspondiente a la carga de lípidos.

En conclusión nuestros datos indican que el tratamiento con *E. coli* suprimió la expresión inducida por los lípidos de la dieta de aquellas proteínas que son necesarias para la síntesis y el transporte de los triglicéridos en el intestino. En particular, la falta de aumento de respuesta de las proteínas MTTP y SEC24c puede limitar el transporte de las vesículas de prequilomicrones del RE al aparato de Golgi, lo cual explica la retención de lípidos en el intestino de los ratones tratados con *E. coli*. Aunque quedan por identificar los mecanismos moleculares, el estrés elevado del RE en el intestino puede contribuir a la desregulación del metabolismo intestinal de los lípidos causada por el tratamiento con *E. coli*.

60

Referencias

1. IDF. International Diabetes Federation diabetes Atlas. 2012; disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas/>.
2. Qatanani, M. y M.A. Lazar, Mecanismo de la resistencia a la insulina asociado a la obesidad: muchas opciones en el menú. *Genes Dev*, 2007. 21(12): p. 1443-55.

65

3. Larsen, N. y otros, La microbiota intestinal en los adultos humanos con diabetes de tipo 2 difiere de la de los adultos no diabéticos. *PLoS One*, 2010. 5(2): p. e9085.
4. Wu, X. y otros, Caracterización molecular de la microbiota fecal en pacientes con diabetes de tipo II. *Curr Microbiol*, 2010. 61(1): p. 69-78.
5. Qin, J. y otros, Estudio de la amplia relación del metagenoma y la microbiota intestinal en la diabetes de tipo 2. *Nature*, 2012. 490(7418): p. 55-60.
6. Membrez, M. y otros, La modulación de la microbiota intestinal con norfloxacina y ampicilina incrementa la tolerancia a la glucosa en los ratones. *FASEB J*, 2008. 22(7): p. 2416-26.
7. Rabot, S. y otros, Los ratones C57BL/6J libres de gérmenes son insensibles a la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas y tienen alterado el metabolismo del colesterol. *FASEB J*, 2010. 24(12): p. 4948-59.
8. Cani, P.D. y otros, La endotoxemia metabólica inicia la obesidad y la resistencia a la insulina. *Diabetes*, 2007. 56(7): p. 1761-72.
9. Lassenius, M.I. y otros, La actividad de endotoxinas bacterianas en el suero humano está relacionada con dislipidemia, resistencia a la insulina, obesidad e inflamación crónica. *Diabetes Care*, 2011. 34(8): p. 1809-15.
10. Pussinen, P.J. y otros, La endotoxemia está relacionada con un mayor riesgo de incidencia de diabetes. *Diabetes Care*, 2011. 34(2): p. 392-7.
11. Harris, K. y otros, ¿Es la microbiota intestinal un nuevo factor que contribuye a la obesidad y a sus trastornos metabólicos? *J Obes*, 2012. 2012: p. 879151.
12. Moreira, A.P. y otros, Influencia de una dieta rica en grasas en la microbiota intestinal, en la permeabilidad intestinal y en la endotoxemia metabólica. *Br J Nutr*, 2012. 108(5): p. 801-9.
13. Amar, J. y otros, La ingesta de energía está asociada con la endotoxemia en hombres aparentemente sanos. *Am J Clin Nutr*, 2008. 87(5): p. 1219-23.
14. Clemente-Postigo, M. y otros, El aumento de endotoxinas tras una sobrecarga de grasa está relacionado con la hipertrigliceridemia en pacientes mórbidamente obesos. *J Lipid Res*, 2012. 53(5): p. 973-8.
15. Amar, J. y otros, Adherencia de la mucosa intestinal y translocación de las bacterias comensales en la fase inicial de la diabetes de tipo 2: mecanismos moleculares y tratamiento probiótico. *EMBO Mol Med*, 2011. 3(9): p. 559-72.
16. Alteri, C.J. y H.L. Mobley, La fisiología y el metabolismo de la *Escherichia coli* determinan la adaptación a diversos microambientes del huésped. *Curr Opin Microbiol*, 2012. 15(1): p. 3-9.
17. Qadri, F. y otros, *Escherichia coli* enterotoxigena en los países en desarrollo: epidemiología, microbiología, características clínicas, tratamiento y prevención. *Clin Microbiol Rev*, 2005. 18(3): p. 465-83.
18. Schultz, M. Uso clínico de la *E. coli* Nissle 1917 en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. 14(7): p. 1012-8.
19. Santacruz, A. y otros, La composición de la microbiota intestinal está relacionada con el peso corporal, con la ganancia de peso y con parámetros bioquímicos en las mujeres gestantes. *Br J Nutr*, 2010. 104(1): p. 83-92.
20. Carson, C.A. y otros, Comparación de ribotipado y PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos para la identificación de *Escherichia coli* fecal de humanos y animales. *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(3): p. 1836-9.
21. Dombek, P.E. y otros, Uso de secuencias de ADN repetitivas y PCR para diferenciar aislados de *Escherichia coli* procedentes de fuentes humanas y animales. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66(6): p. 2572-7.
22. Folch, J. M. Lees y G.H. Sloane Stanley, Método sencillo para aislar y purificar los lípidos totales de tejidos animales. *J Biol Chem*, 1957. 226(1): p. 497-509.
23. Naito, E. y otros, Efecto beneficioso de la administración oral de la cepa Shirota de *Lactobacillus casei* sobre la resistencia a la insulina en ratones con obesidad inducida por la dieta. *J Appl Microbiol*, 2011. 110(3): p. 650-7.
24. Abu-Elheiga, L. y otros, Oxidación continua de ácidos grasos y reducción de la grasa almacenada en ratones carentes de acetil-CoA carboxilasa 2. *Science*, 2001. 291(5513): p. 2613-6.
25. Aoyama, T. y otros, Alteración de la expresión constitutiva de enzimas metabolizadores de ácidos grasos en ratones carentes del receptor alfa receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARalfa). *J Biol Chem*, 1998. 273(10): p. 5678-84.
26. Cani, P.D. y otros, Cambios en la microbiota intestinal para el control de la inflamación en ratones obesos, mediante un mecanismo que incluye la mejora de la permeabilidad intestinal activada por GLP-2. *Gut*, 2009. 58(8): p. 1091-103.
27. Cani, P.D. y otros, Cambios en la microbiota intestinal para el control de la inflamación provocada por la endotoxemia metabólica en ratones con obesidad y diabetes inducida por una dieta rica en grasas. *Diabetes*, 2008. 57(6): p. 1470-81.
28. Robertson, M.D. y otros, Movilización por glucosa oral en humanos de la grasa almacenada en enterocitos. *Gut*, 2003. 52(6): p. 834-9.
29. Fielding, B.A. y otros, Lipemia postprandial: origen de un pico anticipado estudiado mediante la ingesta de una dieta específica de ácidos grasos durante comidas seguidas. *Am J Clin Nutr*, 1996. 63(1): p. 36-41.
30. Zhu, J. y otros, Acumulación de triacilglicerol citoplasmático en los enterocitos revelado por microscopía de dispersión coherente Raman anti-Stokes ex vivo e in vivo. *J Lipid Res*, 2009. 50(6): p. 1080-9.
31. Uchida, A. y otros, Secreción reducida de triglicéridos como respuesta a una carga aguda de grasa dietética en ratones obesos, respecto a ratones delgados. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 26.
32. Douglass, J.D. y otros, Acumulación de triacilglicerol en la mucosa intestinal a consecuencia de una menor secreción de lípidos en ratones obesos y ratones con alimentación rica en grasa. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 25.

33. Abu-Shanab, A. y E.M. Quigley, El papel de la microbiota intestinal en la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010. 7(12): p. 691-701.
34. Begriche, K, y otros, Adaptaciones y disfunciones mitocondriales en la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *Hepatology*, 2013.
- 5 35. Sylvie Demignot, Frauke Beilstein, Etienne Morel. Lipoproteínas ricas en triglicéridos y gotitas de lípidos citosólicos en enterocitos: actores principales en la fisiología intestinal y en los trastornos metabólicos. *Biochimie* 96 (2014) 48-55.
36. Xiaoyue Pan y M. Mahmood Hussain. Producción de triglicéridos intestinales. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821(5): 727-735.
- 10 37. Xue-Qun Zhang, Cheng-Fu Xu, Chao-Hui Yu, Wei-Xing Chen, You-Ming Li. El papel del estrés del retículo endoplasmático en la patogénesis de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *World J Gastroenterol* 2014; 20(7):1768-1776.
38. Nathalie Rolhion, Nicolas Barnich, Marie-Agne's Bringer, Anne-Lise Glasser, Julien Ranc, Xavier He'buterne, Paul Hofman, Arlette Darfeuille-Michaud. La chaperona Gp96 anormalmente expresada como respuesta al estrés del RE en CD favorece la invasión adherente-invasiva de *Escherichia coli*. *Gut* 2010; 59:1355-1362.
- 15 39. Nathalie Rolhion, Paul Hofman y Arlette Darfeuille-Michaud. La respuesta de la chaperona Gp96 al estrés del retículo endoplasmático, un receptor del huésped para la *Escherichia coli* adherente-invasiva asociada a la enfermedad de Crohn. *Gut Microbes* 2011; 2(2):115-119.
- 20 Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle, de modo ilustrativo y con ejemplos en aras de una clara comprensión, el especialista en la materia apreciará que se pueden realizar algunos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Chou, Chieh Jason
Darimont, Christian
Membrez, Mathieu
- 30 <120> E.coli como marcador de hipertrigliceridemia
- <130> 13102-PCT
- <160> 31
- 35 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
<211> 19
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
45 <223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de bacterias totales
- <400> 1
tcctacggga ggcagcagt 19
- <210> 2
50 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
55 <223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de bacterias totales
- <400> 2
ggactaccag ggtatctaata cctgtt 26
- 60 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

ES 2 627 634 T3

<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Escherichia coli

<400> 3
catgccgcgt gtagaaga 20

5

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Escherichia coli

<400> 4
cgggtaacgt caatgagca a 21

15

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Firmicutes

25

<400> 5
ggagyatgtg gtttaattcg aagca 25

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Firmicutes

35

<400> 6
agctgacgac aacctgcac 20

40

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Lactobacilos

<400> 7
agcagtaggg aatctcca 19

50

<210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Lactobacilos

<400> 8
caccgtaca catggag 17

60

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 627 634 T3

<220>
<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Bacteroidetes

5 <400> 9
ggarcatgtg gtttaattcg atgat 25

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Bacteroidetes

15 <400> 10
agctgacgac aacctgcag 20

<210> 11
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Bacteroidaceae-Prevotella-Porphyromonas

25 <400> 11
ggtgtcggct taagtccat 20

<210> 12
<211> 18
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Bacteroidaceae-Prevotella-Porphyromonas

35 <400> 12
cggaygtaag ggccgtgc 18

<210> 13
<211> 17
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Bífidobacterias

45 <400> 13
ctcctgaaa cgggtgg 17

50 <210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Bífidobacterias

60 <400> 14
ggtgttcttc ccgatatcta ca 22

<210> 15
<211> 23
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 627 634 T3

<220>
<223> Cebador directo de la PCR sintética para la detección de Enterobacterias

5 <400> 15
tgccgtaact tcgggagaag gca 23

<210> 16
<211> 22
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la PCR sintética para la detección de Enterobacterias

15 <400> 16
tcaaggctca atgttcagtg tc 22

<210> 17
<211> 18
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de NFkB

25 <400> 17
cggacagccc tccacctt 18

<210> 18
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de NFkB

35 <400> 18
cagccccaca ttcaacaag a 21

40 <210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de IL-6

50 <400> 19
gaaatgatgg atgctaccaa actg 24

<210> 20
<211> 24
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de IL-6

60 <400> 20
ccagaagacc agaggaaatt ttca 24

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 627 634 T3

<220>
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de TNF-alfa

5 <400> 21
accgtcagcc gatttgctat 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de TNF-alfa

15 <400> 22
ttgacggcag agaggagggtt 20

<210> 23
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de ACC2

25 <400> 23
agcgggactc tgcctcaag 20

<210> 24
30 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de ACC2

35 <400> 24
ccatgatgac ctctggatgt tct 23

40 <210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de NFkB

<400> 25
50 accatccaga tgacaccttc ct 22

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de NFkB

60 <400> 26
gccgaaggtc caccatthtt 20

<210> 27
<211> 21
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 627 634 T3

<220>
<223> Cebador directo de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de MTTP

5 <400> 27
cacctcagcc agaaagcgat a 21

<210> 28
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de la RT-PCR sintética para detectar la expresión del ARNm de MTTP

15 <400> 28
agggaaccca cggaatc 18

<210> 29
<211> 22
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de la ERIC-PCR sintética

25 <400> 29
atgtaagctc ctgggattc ac 22

<210> 30
<211> 22
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de la ERIC-PCR sintética

35 <400> 30
aagtaagtga ctggggtgag cg 22

40 <210> 31
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador de la rep-PCR sintética

<400> 31
50 ctacggcaag gcgacgctga cg 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para predecir si un sujeto se halla en riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia, el cual comprende las etapas de:
- a) transformar una muestra de heces obtenida del sujeto para detectar el nivel de Escherichia coli (E. coli) en la muestra, y
 - b) determinar que un mayor nivel de E. coli en la muestra, respecto a una muestra de control, predice que el sujeto está en riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el cual la detección del nivel de E. coli comprende la realización de una amplificación de ácidos nucleicos.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el cual la detección del nivel de E. coli comprende la realización de un recuento de colonias.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el cual la muestra de referencia es de un sujeto de control sano o de un sujeto que no está en riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia.
- 25 5. Método para diagnosticar la hipertrigliceridemia en un sujeto, el cual consiste en:
- a) transformar una muestra de heces obtenida del sujeto para detectar el nivel de E. coli en la muestra, y
 - b) determinar que un mayor nivel de E. coli en la muestra, respecto a una muestra de control, es indicativo de un diagnóstico de hipertrigliceridemia en el sujeto.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el cual la detección del nivel de E. coli comprende la realización de una amplificación de ácidos nucleicos.
7. El método de la reivindicación 6, en el cual la amplificación de ácidos nucleicos se efectúa mediante el uso de oligonucleótidos cuyas secuencias están descritas en SEQ ID nº 3 y 4.
8. El método de la reivindicación 6, en el cual la amplificación de ácidos nucleicos incluye la PCR de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas o la PCR extragénica repetitiva.