



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina
Programa de doctorado en Medicina (3139)

**Parasitación intestinal por unicelulares eucariotas
en una población con obesidad mórbida:
implicaciones clínico-metabólicas**

Documento de Tesis Doctoral

Jana Caudet Esteban

Directores:

Dra. María Trelis Villanueva

Dr. Juan Francisco Merino Torres

Valencia. Octubre 2022



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

La **Dra. María Trelis Villanueva**, Profesora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València y

El **Dr. Juan Francisco Merino Torres**, Profesor del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Parasitación intestinal por unicelulares eucariotas en una población con obesidad mórbida: implicaciones clínico-metabólicas**” corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por doña **Jana Caudet Esteban**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina, con el fin de optar al grado de Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente, en Valencia,
a

*“It has long been an axiom of mine
that the little things are infinitely the most important.”*

Sir Arthur Conan Doyle

Agradecimientos

Este documento es resultado de la colaboración de diferentes personas, a las que quiero agradecer su participación y apoyo a lo largo de los últimos años. En primer lugar, a mis directores de Tesis, el Dr. Juan Francisco Merino y la Dra. María Trelis: gracias por depositar en mí vuestra confianza y brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación. Os agradezco vuestra orientación y consejo, que contribuyeron a mejorar el contenido del trabajo que aquí se presenta.

En segundo lugar, gracias al Dr. José Miguel Soriano por tu implicación y tus recomendaciones en la redacción de artículos. Gracias a la Dra. Rosa Cámara, por tu accesibilidad y tu apoyo tanto durante la residencia como durante el doctorado; te considero un referente, aunque no pudieras firmar los documentos de compromiso doctoral.

Gracias a la Dra. Susana Cifre: tu consuelo emocional fue clave durante el desarrollo de la parte experimental de la investigación y recorrer aquel arduo camino sin tu ayuda hubiese sido demasiado agotador; gracias por tu envidiable animosidad y tu cariñosa compañía.

Gracias también a esas personas cuyo apoyo me ha sido fundamental durante los años de doctorado. A Bianca: eres un ejemplo que seguir en capacidad de trabajo, tenacidad y humildad; siempre tienes una sonrisa y palabras de ánimo para una amiga, y poder contar con eso es un tesoro. A Susana Rodrigo: con tu esfuerzo nos abriste camino a las que después hemos seguido tus pasos; gracias por tu paciencia conmigo, tu sentido del humor y tu cariño. A Estefanía: sabes que tu valor y tu fortaleza son una inspiración para mí; gracias por tu afecto, tu pragmatismo y tu fiel acompañamiento. A Ángeles: por trasmitirme tu filosofía y estar siempre dispuesta a ayudarme; admiro tu perseverancia, tu asertividad y la energía que desprendes. A Herminia: gracias por tu comprensión, tu buen juicio y por ayudarme a conservar el entusiasmo. Gracias a José Luís Balada por tu amable ayuda desinteresada y por hacerme todo un poco más sencillo.

Gracias a Mario, por escucharme pacientemente y tener ese don de trasmitirme sosiego cuando lo necesito. Me has acompañado en este camino y, desde la

experiencia, me infundiste constancia y seguridad en mí misma en los momentos más oscuros.

Y gracias por supuesto, a mi familia: lleváis toda mi vida haciéndome de psicólogos, de *coaches* y de paño de lágrimas. Cada uno de los pasos que he dado a lo largo de mi trayectoria ha sido gracias a vuestro apoyo incondicional y nunca podré agradeceréoslo lo suficiente. Me habéis enseñado a vivir me habéis convertido en la persona que soy. A vosotros, y particularmente a ti, mamá, os dedico este trabajo y todo lo bueno que se desprenda ahora y siempre de mi vida profesional.

Por último, gracias a los pacientes que altruistamente se prestaron a participar en este proyecto de investigación, regalándonos generosamente su tiempo aún pese a las circunstancias epidemiológicas que el 2020 trajo consigo. Sin vosotros nada de esto hubiese tenido sentido.

Resumen

La obesidad es una enfermedad grave y multidimensional que, en la actualidad, ha alcanzado dimensiones pandémicas. Muchos son los mecanismos fisiopatológicos propuestos para intentar explicar el marcado aumento de su incidencia, y que se han orientado a hallar nuevas dianas terapéuticas con las que combatirla. Clásicamente se han señalado los factores ambientales propios del estilo de vida occidental (como la alimentación hipercalórica y el sedentarismo) como relevantes en el desarrollo de esta enfermedad; sin embargo, nuevas evidencias apuntan hacia que también podrían jugar un papel importante elementos infecciosos del medio, con repercusiones tanto perjudiciales como protectoras sobre el metabolismo humano. Unos buenos candidatos a ejercer estos efectos son los protozoos parásitos intestinales, cuya presencia ha sido muy poco descrita en la población con obesidad.

La ubicación intestinal de los parásitos unicelulares eucariotas les otorga la capacidad de interactuar con las comunidades bacterianas intestinales, ampliamente descritas como factor determinante del desarrollo de la obesidad y de otras enfermedades metabólicas. Por otro lado, su colonización intestinal está asociada a modificaciones de la respuesta inmunitaria e inflamatoria del hospedador en el que habitan. Por lo tanto, resulta razonable argumentar que estos microorganismos pudieran tener un papel relevante en modular el desarrollo de los trastornos metabólicos del obeso, hecho no estudiado con anterioridad.

En este trabajo se describe la presencia de 3 microorganismos unicelulares eucariotas (*Blastocystis* sp., *Giardia intestinalis* y *Dientamoeba fragilis*) en una población de sujetos mayoritariamente con obesidad grado III, junto con algunos con obesidad grado II acompañada de comorbilidad metabólica. En función de la colonización o no por estos parásitos se compararon una serie de parámetros de interés: manifestaciones clínicas abdominales; situación metabólica; composición corporal (valorada mediante bioimpedanciometría); marcadores nutricionales analíticos; características cualitativas y cuantitativas de la dieta; diversidad bacteriana, frecuencia y abundancia relativa de los taxones del ecosistema bacteriano intestinal; y marcadores de respuesta inmunitaria, de inflamación y de estrés oxidativo.

Los resultados de este estudio revelan, por un lado, que la colonización por los parásitos intestinales descritos carece de efectos perjudiciales sobre el hospedador obeso, por lo que no habría argumentos para su erradicación indiscriminada. Es más, el subgrupo de pacientes colonizados mostró rasgos de un perfil metabólico más saludable, como fueron: menores índices de resistencia a la insulina (medido por el índice HOMA-R), tendencia a menos comorbilidades metabólicas, comunidades bacterianas intestinales más ricas y diversas y respuestas antioxidantes más hiperactivas. Llamativamente, en función de la especie parásita colonizadora se identificaron indicios que sugerían la existencia de un patrón diferencial en los efectos ejercidos sobre el hospedador, con repercusiones metabólicas beneficiosas asociadas a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*, pero perjudiciales en el caso de la colonización por *G. intestinalis*. No obstante, el pequeño tamaño de la muestra colonizada por esta última impidió establecer diferencias claras entre especies como para concluir con seguridad su patogenicidad.

Con todo, los hallazgos de este trabajo sugieren que la colonización crónica por los microorganismos estudiados (y concretamente, por *Blastocystis* sp.) puede reportar beneficios al hospedador con obesidad, a través de la modificación de la composición de su ecosistema bacteriano intestinal o del tipo de respuesta inmunitaria que exhiben de manera predominante. Así, lejos de considerarlos parásitos patógenos, podrían contemplarse como elementos comensales dentro de la microbiota intestinal, y como biomarcadores de un ecosistema bacteriano intestinal saludable. Son necesarios sucesivos estudios que corroboren estos resultados en otras poblaciones, y que sean diseñados para poder establecer causalidad directa entre la presencia de parásitos intestinales y el mantenimiento de perfiles metabólicos más saludables en población con obesidad.

Palabras clave: obesidad; parásitos; *Blastocystis* sp.; *Giardia intestinalis*; *Dientamoeba fragilis*; resistencia insulínica; *lipoinflamación*; estrés oxidativo, microbiota intestinal; dieta.

Resum

L'obesitat és una malaltia greu i multidimensional que en l'actualitat ha assolit dimensions pandèmiques. Molts són els mecanismes fisiopatològics proposats per intentar explicar el marcat augment de la seva incidència, i que s'han orientat a trobar noves dianes terapèutiques amb les quals combatre-la. Clàssicament, s'han assenyalat com a rellevants en el desenvolupament d'aquest trastorn els factors ambientals propis de l'estil de vida occidental (com ara l'alimentació hipercalòrica i el sedentarisme); tanmateix, noves evidències apunten que també podrien jugar-hi un important paper elements infecciosos del medi, amb repercussions perjudicials o protectores sobre el metabolisme humà. Uns bons candidats a exercir aquests efectes són els protozous paràsits intestinals, la presència dels quals ha estat molt poc descrita en la població amb obesitat.

La ubicació intestinal dels paràsits unicel·lulars eucariotes els atorga la capacitat d'interaccionar amb les comunitats bacterianes intestinals, àmpliament descrites com a factor determinant en el desenvolupament de l'obesitat i altres malalties metabòliques. D'altra banda, la colonització intestinal està associada a modificacions de la resposta immunitària i inflamatòria de l'hoste en què habiten. Per tant, resulta raonable argumentar que aquests microorganismes puguen tenir un paper rellevant en modular el desenvolupament dels trastorns metabòlics de l'obés, fet no estudiat amb anterioritat.

En aquest treball es descriu la presència de 3 microorganismes unicel·lulars eucariotes (*Blastocystis* sp., *Giardia intestinalis* i *Dientamoeba fragilis*) en una població de subjectes majoritàriament amb obesitat grau III, juntament amb alguns amb obesitat grau II acompanyada de comorbiditat metabòlica. En funció de la colonització o no per aquests paràsits es van comparar una sèrie de paràmetres d'interès: manifestacions clíniques abdominals; situació metabòlica; composició corporal (valorada mitjançant bioimpedanciometria); marcadors nutricionals analítics; característiques qualitatives i quantitatives de la dieta; diversitat bacteriana, freqüència i abundància relativa dels tàxons de l'ecosistema bacterià intestinal; i marcadors de resposta immunitària, d'inflamació i d'estrès oxidatiu.

Els resultats d'aquest estudi revelen, d'una banda, que la colonització per aquests paràsits intestinals manca d'efectes perjudicials sobre l'hoste obés, per la qual cosa no hi hauria arguments per erradicar-los indiscriminadament. És més, el subgrup de pacients colonitzats va mostrar trets d'un perfil metabòlic més saludable, com van ser: menors índexs de resistència a la insulina (mesurat mitjançant l'índex HOMA-R), tendència a menys comorbilitats metabòliques, comunitats bacterianes intestinals més riques i diverses i respostes antioxidants més hiperactives. Notablement, en funció de l'espècie paràsita colonitzadora es van identificar indicis que suggerien l'existència d'un patró diferencial en els efectes exercits sobre l'hoste, amb repercussions metabòliques beneficioses associades a *Blastocystis* sp. i/o *D. fragilis*, però perjudicials en el cas de la colonització per *G. intestinalis*. No obstant això, el reduït tamany de la mostra colonitzada per aquesta última va impedir establir diferències clares entre espècies com per concloure amb seguretat la seva patogenicitat.

En conclusió, les troballes d'aquesta investigació suggerixen que la colonització crònica pels microorganismes estudiats (i concretament, per *Blastocystis* sp.) pot reportar beneficis a l'hoste amb obesitat, a través de la modificació de la composició del seu ecosistema bacterià o del tipus de resposta immunitària que exhibixen de manera predominant. Així, lluny de considerar-los paràsits patògens, podrien contemplar-se com a elements comensals dins de la microbiota intestinal, i com a biomarcadors d'un ecosistema bacterià intestinal saludable. Calen successius estudis que corroboren aquests resultats en altres poblacions, i que siguen dissenyats per poder establir causalitat directa entre la presència de paràsits intestinals i el manteniment de perfils metabòlics més saludables en població amb obesitat.

Paraules clau: obesitat; paràsits; *Blastocystis* sp.; *Giardia intestinalis*; *Dientamoeba fragilis*; resistència insulínica; *lipoinflamació*; estrés oxidatiu, microbiota intestinal; dieta.

Abstract

Obesity is a serious and multidimensional disease that has now reached pandemic dimensions. There are many pathophysiological mechanisms proposed to try to explain the marked increase in its incidence and oriented to find new therapeutic targets to fight against the development of this disease. Classically, the environmental factors of the Western lifestyle (such as hypercaloric foods and sedentarism) have been pointed out as relevant in the development of this disorder; however, new evidence suggests that infectious elements of the environment could also play an important role, with either harmful or protective repercussions on human metabolism. Good candidates to exert these effects are intestinal parasitic protozoa, whose presence has been very little described in the obese population.

The intestinal location of eukaryotic unicellular parasites gives them the ability to interact with the intestinal microbiota, widely described as a determining factor in the development of obesity and other metabolic diseases. Furthermore, the intestinal colonization is associated with subtle modifications of the immune and inflammatory response of the host harbouring them. Therefore, it is reasonable to argue that these microorganisms could have a relevant role in modulating the development of metabolic disorders of the obese, a fact not previously studied.

In this work, the presence of 3 eukaryotic unicellular microorganisms (*Blastocystis* sp., *Giardia intestinalis* and *Dientamoeba fragilis*) is described in a population of subjects mostly with grade III obesity, along with some with grade II obesity accompanied by metabolic comorbidity. Depending on the colonization or not by these parasites, a series of parameters of interest were compared: abdominal clinical manifestations; metabolic situation; body composition (assessed by bioimpedanciometry); analytical nutritional markers; qualitative and quantitative characteristics of the diet; bacterial diversity, frequency and relative abundance of the taxa within the intestinal bacterial ecosystem; and markers of immune response, inflammation and oxidative stress.

The results of this study reveal, on the one hand, that colonization by the intestinal parasites described lacks harmful effects on the obese host, so there would be no arguments for their indiscriminate eradication. Moreover, the subgroup of colonized patients showed traits of a healthier metabolic profile, such as: lower rates of insulin resistance (measured by the HOMA-R index), tendency to fewer metabolic comorbidities, richer and more diverse intestinal bacterial communities, and more overactive antioxidant responses. Strikingly, depending on the colonizing parasitic species, we identified signs that suggested the existence of a differential pattern in the effects exerted on the host, with beneficial metabolic repercussions associated with *Blastocystis* sp. and/or *D. fragilis*, but harmful in the case of colonization by *G. intestinalis*. However, the small size of the sample colonized by the latter prevented clear differences between species from being established to safely conclude their pathogenicity.

In conclusion, the findings of this work suggest that chronic colonization by the microorganisms studied (and specifically, by *Blastocystis* sp.) can bring benefits to the host with obesity, through the modification of the composition of their intestinal bacterial ecosystem or the type of immune response they predominantly exhibit. Thus, far from considering them pathogenic parasites, they could be considered as commensal elements within the intestinal microbiota, and as biomarkers of a healthy intestinal bacterial ecosystem. Successive studies are needed to corroborate these results in other populations, and to be designed to establish direct causality between the presence of intestinal parasites and the maintenance of healthier metabolic profiles in the obese population.

Keywords: obesity; parasites; *Blastocystis* sp.; *Giardia intestinalis*; *Dientamoeba fragilis*; insulin-resistance; *lipoinflammation*; oxidative stress, intestinal microbiota; diet.

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del IMC adaptada del documento de 1998 de la OMS.....	1
Tabla 2. Criterios diagnósticos del síndrome metabólico según NCEP ATP-III (2001)	15
Tabla 3. Prevalencia de colonización intestinal general y colonización múltiple.	81
Tabla 4. Frecuencia de exposición a factores de riesgo parasitológico.....	82
Tabla 5. Exposición a factores de riesgo parasitológico en función de la colonización intestinal.....	83
Tabla 6. Información sobre las deposiciones y los síntomas abdominales.	84
Tabla 7. Frecuencia de síntomas gastrointestinales en función de la presencia de colonización.	85
Tabla 8. Descripción de las comorbilidades asociadas a la obesidad.	88
Tabla 9. Prevalencia de DT2 en función de la colonización intestinal por cada especie parásita.....	92
Tabla 10. Resultados antropométricos obtenidos por bioimpedanciometría estratificados por sexo y colonización (N=104).....	93
Tabla 11. Gradación de la esteatosis hepática por ecografía.....	94
Tabla 12. Aportes calóricos y de macronutrientes diarios.....	96
Tabla 13. Aporte de micronutrientes diario y cumplimiento de la ingesta diaria recomendada.....	97
Tabla 14. Resultados del cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea.....	97

Tabla 15. Ingesta diaria de nutrientes antioxidantes en función del estado de colonización.	98
Tabla 16. Parámetros redox en función del cumplimiento de la ingesta diaria recomendada de antioxidantes.....	99
Tabla 17. Parámetros metabólicos en función de la colonización por las distintas especies parásitas.	100
Tabla 18. Resultados metabólicos en función de la situación de colonización.	101
Tabla 19. Parámetros nutricionales en función de la colonización intestinal por las distintas especies parásitas.....	102
Tabla 20. Prevalencia de deficiencias de micronutrientes en la población de estudio.....	103
Tabla 21. Niveles plasmáticos de vitaminas en función del estado de colonización.....	103
Tabla 22. Variables epidemiológicas y clínicas e índice HOMA-IR en función de la colonización.	105
Tabla 23. Resultados antropométricos obtenidos por bioimpedancia eléctrica en función de la colonización intestinal por parásitos (n=97).	106
Tabla 24. Biomarcadores de inflamación en la población de estudio.....	107
Tabla 25. Biomarcadores de inflamación en función del tipo de obesidad y del estado de colonización.....	108
Tabla 26. Biomarcadores de inflamación en colonizados clasificados por la especie parásita.....	109
Tabla 27. Biomarcadores inflamatorios en función de algunas comorbilidades metabólicas.	110

Tabla 28. Recuento de la serie blanca y niveles de inmunoglobulinas en función del estado de colonización intestinal.	111
Tabla 29. Biomarcadores redox en función de la suficiencia plasmática para las vitaminas A y E.	113
Tabla 30. Biomarcadores redox en función del estado de colonización y de las especies intestinales parásitas.....	114
Tabla 31. Biomarcadores redox en función de la insulin-resistencia y la presencia de EHGNA.....	116
Tabla 32. Biomarcadores redox en función de la sensibilidad a la insulina y el estado de colonización.	116
Tabla 33. Correlación entre los marcadores redox y las mediciones bioquímicas y antropométricas.	118
Tabla 34. Comparación de las variables sociodemográficas, antropométricas y clínicas en función de la colonización intestinal.	119
Tabla 35. Número de lecturas en función de la colonización por parásitos intestinales eucariotas.	121
Tabla 36. Número de lecturas en función de la presencia de EHGNA.....	121
Tabla 37. Índices de diversidad alfa y beta a nivel de género categorizados por colonización y especies parásitas.....	123
Tabla 38. Índices de alfa diversidad a nivel de género categorizados por la presencia de síndrome metabólico y la colonización por <i>Blastocystis</i> y/o <i>D. fragilis</i>	131
Tabla 39. Índices de alfa diversidad a nivel de género categorizados por la presencia de EHGNA y la colonización por <i>Blastocystis</i> y/o <i>D. fragilis</i>	132

Tabla 40. Índices de beta diversidad a nivel de género en función de las comorbilidades metabólicas y la colonización por especies parásitas intestinales concretas.....	136
Tabla 41. Abundancia relativa (%) de los principales filos en función del estado de colonización intestinal.....	138
Tabla 42. Abundancia relativa (%) de géneros en función del estado de colonización y las especies parásitas.....	140
Tabla 43. Diferencias en las principales ratios en función del estado de colonización y las especies parásitas.....	141
Tabla 44. Diferencias en taxones bacterianos del ecosistema intestinal en función de la presencia de EHGNA.....	142
Tabla 45. Abundancia relativa (%) de taxones bacterianos del ecosistema intestinal en función de la situación del metabolismo hidrocarbonado.....	143
Tabla 46. Abundancia relativa (%) de taxones en función de la clínica abdominal.....	144

Índice de figuras

Figura 1. Sistema de estadiaje de la obesidad de Edmonton (EOSS).....	3
Figura 2. Propuesta de clasificación integral de la obesidad de Garvey y Mechanick en 4 dimensiones (ABCD)	4
Figura 3. Prevalencia de personas con sobrepeso y de obesidad en adultos de >20 años por región geográfica y por año (1980-2015).	6
Figura 4. Órganos endocrinos implicados en el control de la homeostasis energética.....	12
Figura 5. Asociación entre el IMC y la mortalidad por todas las causas estratificada por grupos de edad.....	17
Figura 6. Expansión del tejido adiposo blanco como consecuencia de la obesidad por la vía de la obesidad metabólicamente sana y por la vía de la obesidad metabólicamente enferma.....	23
Figura 7. Trofozoítos de <i>Giardia intestinalis</i>	33
Figura 8. Ejemplares de <i>Blastocystis</i> sp. en su forma vacuolar, muy frecuentemente hallados en heces humanas.	36
Figura 9. Representación de <i>Dientamoeba fragilis</i>	39
Figura 10. Dispositivo InBody 770 ©.	71
Figura 11. Comorbilidades metabólicas en función de la presencia de colonización intestinal por cualquier especies parásitas.	89
Figura 12. Comorbilidades metabólicas en no colonizados y colonizados por <i>Blastocystis</i> sp.....	90
Figura 13. Comorbilidades metabólicas en no colonizados y colonizados por <i>G. intestinalis</i>	90
Figura 14. Comorbilidades metabólicas en no colonizados y colonizados por por <i>D. fragilis</i>	91

Figura 15. Resultados ecográficos en función de la colonización intestinal por especies parásitas..	95
Figura 16. Biomarcadores redox en función del estado de colonización y las especies parásitas.....	115
Figura 17. Biomarcadores redox en función de la sensibilidad a la insulina y el estado de colonización por parásitos intestinales.	117
Figura 18 Diagrama de cajas comparando los índices de diversidad alfa a nivel de género en sujetos no colonizados frente a colonizados por <i>Blastocystis</i> sp. y/o <i>D. fragilis</i>	124
Figura 19. Diagrama de cajas comparando los índices de diversidad alfa a nivel de género en sujetos no colonizados frente a colonizados por <i>G. intestinalis</i>	125
Figura 20. Diagrama de cajas comparando la alfa diversidad a nivel de género mediante el índice Chao1 estratificada en función de la adecuación a la ingesta diaria de macronutrientes y de la situación de colonización con parásitos intestinales.....	126
Figura 21. Representación en diagrama de cajas de los índices de diversidad beta en sujetos no colonizados frente a colonizados por <i>Blastocystis</i> sp. y/o <i>D. fragilis</i>	127
Figura 22. Representación en diagrama de cajas de los índices de diversidad beta en sujetos no colonizados frente a colonizados por <i>G. intestinalis</i>	128
Figura 23. PCoA de las comunidades bacterianas intestinales.....	129
Figura 24. Análisis PCoA de las comunidades bacterianas intestinales estratificada por la presencia y ausencia de colonización por <i>Blastocystis</i> sp./ <i>D. fragilis</i>	130
Figura 25. Diagrama de cajas mostrando los índices de alfa diversidad a nivel de género en función de la presencia de síndrome metabólico y de colonización por parásitos intestinales	133

Figura 26. Diagrama de cajas mostrando los índices de alfa diversidad a nivel de género en función de la presencia de EHGNA y de colonización por parásitos intestinales.....	134
Figura 27. Diagrama de cajas comparando la alfa diversidad a nivel de género mediante índice Chao1 entre sujetos con comorbilidad metabólica, en función de la colonización por parásitos intestinales.....	135
Figura 28. Abundancia relativa de filos en cada participante.....	137
Figura 29. Abundancia relativa de los principales filos agrupados por la colonización por <i>Blastocystis</i> sp.....	139

Listado de abreviaturas, acrónimos y siglas

AACE	Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASPEN	Sociedad Americana de Nutrición Parenteral y Enteral
BSS	Escala de Bristol de las deposiciones
DE	Desviación estándar
DT2	Diabetes mellitus tipo 2
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
HOMA-R	Homeostatic model assessment-resistance
IDR	Ingesta diaria recomendada
GFM	Ratones libres de gérmenes
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética
GPT	Glutamato-piruvato transaminasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HTA	Hipertensión arterial
IMC	Índice de masa corporal
IST	Índice de saturación de la transferrina
MDA	Malondialdeído
MHC	Metabolismo hidrocarbonado

NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III
NO	Óxido nítrico
NOX	Metabolitos del óxido nítrico (nitritos y nitratos del plasma)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR (-RT)	Reacción en cadena de la polimerasa (a tiempo real)
PCoA	Análisis de coordenadas principales
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SOD-3	Superóxido dismutasa
TAC	Capacidad antioxidante total del plasma

Índice de contenidos

1	Introducción	1
1.1	La obesidad: enfermedad multidimensional	1
1.1.1	Definición de obesidad y métodos de clasificación.....	1
1.1.2	Situación epidemiológica: la pandemia de la obesidad.....	6
1.1.3	Mecanismos etiopatogénicos de la obesidad.....	9
1.1.4	Comorbilidades asociadas a la obesidad.....	14
1.1.5	Valoración antropométrica del sujeto con obesidad.....	19
1.1.6	Lipoinflamación asociada a la obesidad.....	21
1.1.7	Estrés oxidativo asociado a la obesidad.....	26
1.1.8	Inmunopatología asociada a la obesidad.....	27
1.2	Colonización intestinal por organismos unicelulares eucariotas	30
1.2.1	Factores de riesgo de colonización intestinal.....	31
1.2.2	Parásitos intestinales eucariotas de interés.....	33
1.2.3	Implicaciones clínicas de la colonización intestinal por unicelulares eucariotas.....	41
1.2.4	Respuesta inmunitaria del hospedador frente a la colonización por unicelulares eucariotas.....	44
1.2.5	Estrés oxidativo e inflamación sistémica asociadas a la colonización intestinal por unicelulares eucariotas.....	48
1.2.6	Concepto de infectoobesidad.....	51
1.3	Microbiota intestinal humana	53
1.3.1	Definición y composición de la microbiota intestinal.....	53
1.3.2	Función de la microbiota intestinal como un nuevo órgano.....	55
1.3.3	Microbiota intestinal y obesidad.....	57
1.3.4	Trinomio microbiota intestinal, eucariotas unicelulares intestinales y obesidad.....	59
1.4	Hipótesis de trabajo	61

2	Objetivos	63
2.1	Objetivo principal	63
2.2	Objetivos específicos.....	63
3	Material y métodos	65
3.1	Diseño del estudio	65
3.2	Población de estudio	66
3.3	Valoración clínica y epidemiológica.....	67
3.4	Valoración dietética y nutricional.....	69
3.5	Valoración antropométrica y de composición corporal	70
3.6	Valoración de la enfermedad hepática.....	72
3.7	Análisis de las muestras fecales.....	73
3.8	Análisis de las muestras sanguíneas.....	77
3.9	Análisis estadístico	80
4	Resultados	81
4.1	Descripción de la población de estudio	81
4.2	Resultados parasitológicos.....	81
4.3	Resultados de la clínica gastrointestinal.....	84
4.4	Resultados de comorbilidades metabólicas.....	87
4.5	Resultados antropométricos.....	93
4.6	Resultados de la enfermedad hepática metabólica.....	94
4.7	Resultados dietéticos	96
4.8	Resultados generales de parámetros bioquímicos.....	100
4.9	Resultados de la situación de inflamación sistémica y el estrés oxidativo.....	104
4.10	Resultados del análisis metagenómico de la comunidad bacteriana intestinal	119

5	Discusión	147
5.1	Discusión conjunta de resultados.....	147
5.1.1	Colonización por eucariotas unicelulares intestinales en población obesa	148
5.1.2	Manifestaciones clínicas de los eucariotas unicelulares intestinales	150
5.1.3	Implicaciones nutricionales de los eucariotas unicelulares intestinales	152
5.1.4	Implicaciones metabólicas de los eucariotas unicelulares intestinales	154
5.1.5	Hallazgos obtenidos a partir de la valoración nutricional	157
5.1.6	Hallazgos obtenidos sobre el ecosistema bacteriano intestinal.....	161
5.1.7	Implicaciones inmunológicas de los eucariotas unicelulares intestinales	172
5.1.8	Implicaciones sobre el estado inflamatorio de los eucariotas unicelulares intestinales.....	175
5.1.9	Implicaciones sobre el estrés oxidativo de los eucariotas unicelulares intestinales	177
5.1.10	Interpretación conjunta de los resultados	180
5.2	Limitaciones del estudio	183
5.3	Líneas de investigación futuras	185
6	Conclusiones	187
7	Bibliografía	189
	Anexos	225
	Anexo A. Producción científica de la doctoranda.....	225
	A1. Artículos científicos publicados en revistas indexadas	225
	A2. Otras publicaciones.....	231
	A3. Enlace a las páginas web de las publicaciones en revistas indexadas.....	232

Anexo B. Documentos de aprobación del comité ético del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.....	233
Anexo C. Documento de información al paciente.....	237
Anexo D. Documento de consentimiento informado	242
Anexo E. Cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea	245
Anexo F. Documento de registro dietético.....	247

1 *Introducción*

1.1 La obesidad: enfermedad multidimensional

1.1.1 *Definición de obesidad y métodos de clasificación*

La obesidad es una enfermedad crónica definida como la presencia de un exceso de masa grasa corporal. Si bien lo que determina este diagnóstico es la cantidad de grasa de un organismo, por simplicidad metodológica tradicionalmente se ha recurrido al índice de masa corporal (IMC) como principal herramienta para catalogar a los individuos como obesos. De hecho, este es el método empleado por la mayoría de los estudios epidemiológicos, que permite comparar las diferentes series entre sí.

El IMC, que se calcula como el cociente entre los kg de peso total entre la altura (en cm) al cuadrado, permite clasificar a los individuos en diferentes categorías, tal y como se definió inicialmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). Esta clasificación, que se muestra en la Tabla 1, cataloga a un individuo como con obesidad a partir de un IMC mayor de 30 kg/m², y establece tres estadios de gravedad, de la siguiente manera: obesidad grado I ante un IMC entre 30-34,9 kg/m², obesidad grado II ante un IMC entre 35-39,9 kg/m², obesidad grado III ante un IMC superior a 40 kg/m². El término obesidad mórbida se acuñó inicialmente para indicar aquella que generaba morbilidad y aumento de mortalidad al sujeto, aunque en la actualidad se usa de manera equivalente al de obesidad grado III.

Tabla 1. Clasificación del IMC adaptada del documento de 1998 de la OMS

Situación ponderal	IMC (kg/m ²)
<i>Bajo peso</i>	<18,5
<i>Normopeso</i>	18,5-24,9
<i>Sobrepeso</i>	25,0-29,9
<i>Obesidad</i>	≥30
<i>Tipo I</i>	30,0-34,9
<i>Tipo II</i>	35,0-39,9
<i>Tipo III</i>	≥40

Por su sencillez y universalidad, la clasificación por grados de obesidad de la OMS sigue en vigor en la actualidad, pero se encuentra muy limitada, por varios motivos. Por un lado, los valores de referencia deben adecuarse a la etnia del sujeto que es evaluado, dado que la relación entre IMC y grasa corporal no es constante entre las distintas poblaciones. Por otro lado, el IMC es un cálculo que no contempla la cantidad de masa magra y de masa grasa del individuo, incurriendo en diagnósticos de obesidad erróneos en sujetos con elevada masa muscular, retención hídrica o gestación. Del mismo modo, tampoco tiene capacidad para discriminar el tipo de adiposidad ni la distribución de ésta en el paciente.

Actualmente, es bien sabido que la distribución de la grasa corporal es un factor determinante en el desarrollo de resistencia a la insulina, y que la ubicación visceral se asocia con peores perfiles metabólicos y más eventos cardiovasculares (2,3). Esta ubicación se corresponde con la denominada obesidad androide, en oposición a la ginoide, que presenta una distribución adiposa de predominio subcutáneo e infraumbilical. Una medida antropométrica útil y reproducible para estimar en el sujeto con sobrepeso u obesidad la adiposidad abdominal (visceral) es el perímetro abdominal, que por este motivo se suele usar de manera conjunta con el IMC. Esta determinación ha demostrado estar correlacionada directamente con el riesgo metabólico (4), y supone una alternativa a los más complejos sistemas de análisis de composición corporal por compartimentos. Se han establecido puntos de corte de esta medición, a partir de los cuales la acumulación de grasa visceral confiere un exceso de riesgo cardio-metabólico al sujeto que la padece. Si bien diversas sociedades científicas han señalado que estos puntos de corte deberían ser específicos para cada grupo étnico, en general la obesidad abdominal se suele equiparar con unos perímetros abdominales de > 102 cm en varones y > 88 cm en mujeres (1). En general, no se considera útil esta medicación en sujetos con un $IMC > 35$ kg/m², puesto que ya tienen un riesgo metabólico intrínsecamente muy elevado.

Asimismo, el IMC por sí solo tampoco refleja la presencia ni la gravedad de las patologías asociadas a la obesidad, ni permite predecir el riesgo de mortalidad individual, dado que no existe una relación lineal entre ambas variables. Con el fin de catalogar a los pacientes con obesidad en función de

su comorbilidad, y para optimizar el consumo de recursos sanitarios, se han desarrollado sistemas de clasificación complementarios al IMC. Éstos tienen en cuenta el estado de salud general y las esferas psicológica y funcional de los sujetos obesos, tal como el score EOSS, publicado en 2009 (5) (Figura 1). La Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE) también incorporaba un estadiaje de estas características en sus guías emitidas en el 2016 (6); esta estrategia está orientada a realizar una valoración lo más multidimensional posible del paciente con obesidad, teniendo en cuenta trastornos que habitualmente no se contemplan, para de este modo ajustar el seguimiento y los tratamientos disponibles de forma personalizada a las características del paciente, priorizando medidas más intensivas en los estadios de obesidad más graves.

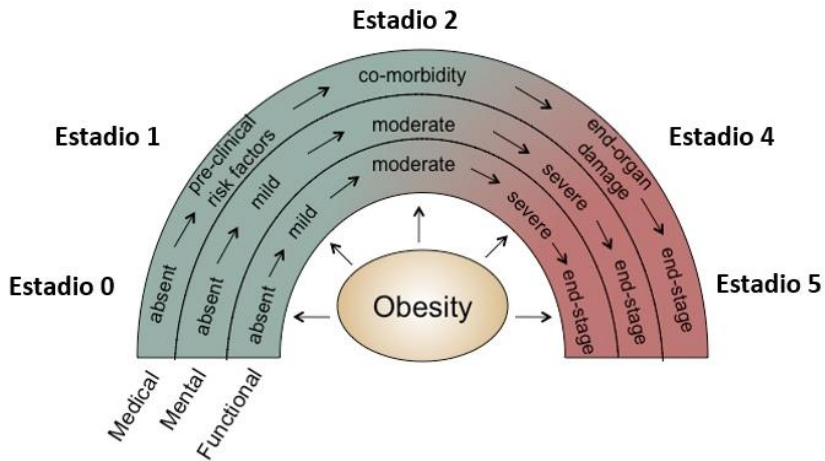


Figura 1. Sistema de estadiaje de la obesidad de Edmonton (EOSS). Adaptado de Sharma et al. (2009) (5).

Por su parte, la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) reconoce la importancia de la adiposidad por encima del exceso de peso en el diagnóstico de la obesidad, y por ello ha recogido como criterios diagnósticos de esta enfermedad los siguientes porcentajes de masa grasa: >25% en hombres y >33% en mujeres (7). Recomienda su determinación directa mediante sistemas de análisis de la composición corporal o, en su defecto, mediante estimaciones a partir de fórmulas antropométricas.

Finalmente, existen otros criterios de clasificación que persiguen encuadrar al síndrome clínico de la obesidad en función de su etiología (primaria o esencial; secundaria a patología hormonal, medicamentosa...) o su momento de aparición en la vida del sujeto (infantil, juvenil, gestacional, perimenopáusica...), que pueden emplearse para complementar la información anteriormente indicada. Así, la Asociación Europea para el Estudio de la Obesidad elaboró una clasificación tridimensional muy completa, en la cual se hacía referencia a la etiología de la obesidad, al grado de adiposidad y al impacto de ésta sobre la salud de la persona. La última clasificación propuesta por Garvey y Mechanick en 2020 (8) es también multidimensional (dimensiones A, B, C y D), y permite la valoración integral del sujeto con obesidad, analizando tanto factores etiopatogénicos, como antropométricos y de comorbilidad, así como el grado de gravedad de éstas (Figura 2).

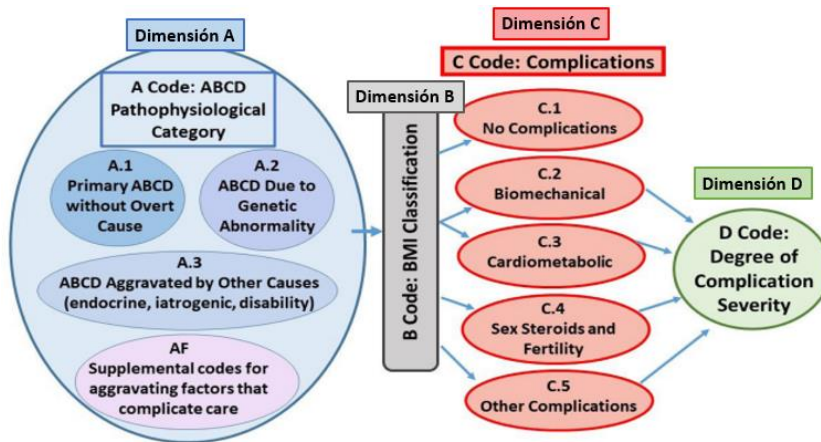


Figura 2. Propuesta de clasificación integral de la obesidad de Garvey y Mechanick en 4 dimensiones (ABCD). Adaptado de Garvey et al. (2020) (8).

En conclusión, en la actualidad disponemos de múltiples sistemas de clasificación de la obesidad, que la han convertido en un síndrome clínico muy complejo. Asimismo, sabemos que la aproximación al sujeto con obesidad basada exclusivamente en el IMC es imprecisa, tanto en su diagnóstico como en su seguimiento, y las decisiones clínicas individualizadas no deberían basarse en este parámetro. Es más recomendable hacer uso de alguno de los

múltiples sistemas de clasificación de los que disponemos, que permiten ubicar a cada paciente dentro del espectro clínico de la enfermedad y determinar el impacto sobre su situación global.

1.1.2 Situación epidemiológica: la pandemia de la obesidad

La prevalencia mundial de obesidad ha alcanzado ya dimensiones tales que se la considera una de las epidemias del siglo XXI, también denominada *globesidad* (9). Según los datos publicados por la OMS en 2016, su prevalencia en población adulta a nivel mundial (basada en el IMC) se situaba en un 13%, con un 39% de personas con sobrepeso; esto suponía 1900 millones de personas en el mundo con sobrepeso y 650 millones de personas con obesidad. Desde la década de 1980 la cantidad de población con sobrepeso y obesidad se ha duplicado (Figura 3), hasta el punto de que prácticamente un tercio de la población mundial presenta estos trastornos en la actualidad (10).

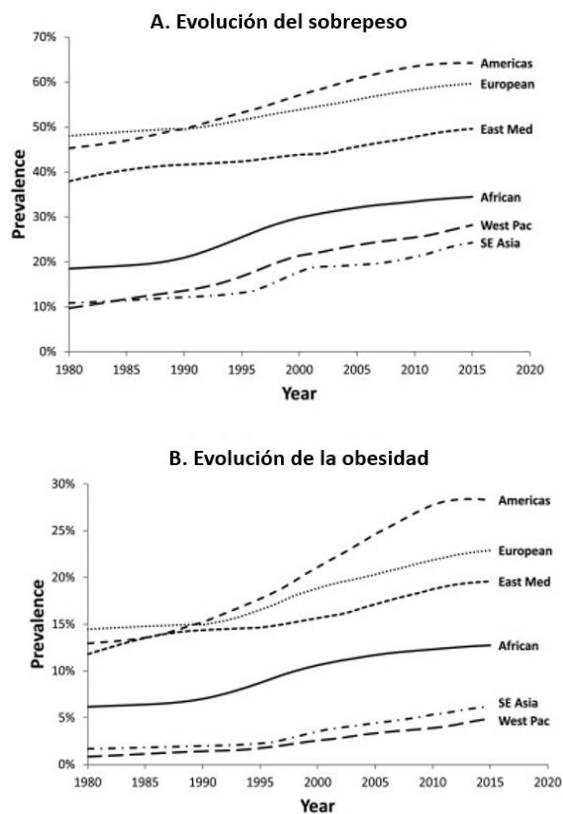


Figura 3. Prevalencia de personas con sobrepeso (A) y de obesidad (B) en adultos de >20 años por región geográfica y por año (1980-2015). Adaptado de Chooi et al. (2019) (10).

En general, se trata de una enfermedad que afecta a ambos sexos y a todos los estratos sociales, pero en los países de alta renta lo hace con más intensidad en aquellos con menor capacidad adquisitiva, mientras que en los más desfavorecidos ocurre el fenómeno opuesto (11). En el momento actual, los países con una prevalencia de obesidad más alta en población adulta son Estados Unidos, Arabia Saudí y México.

En España, la evolución de la prevalencia de obesidad se puede estimar a partir de los resultados de los estudios epidemiológicos llevados a cabo durante las últimas décadas. El estudio SEEDO 2000 (12) analizó a individuos adultos de distintas Comunidades Autónomas muestreados aleatoriamente entre la década de 1990 y 2000, y obtuvo una prevalencia de 39% de sobrepeso y de 14,5% de obesidad. Posteriormente, el estudio ENRICA (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España) (13), llevado a cabo entre 2008 y 2010, obtuvo una prevalencia de obesidad del 22,9%, con un 36% de sujetos con obesidad abdominal, y con una tendencia a incrementar su prevalencia con la edad. En 2010 el estudio Di@bet.es (14) arrojaba una prevalencia de obesidad más preocupante, de 28,3%, muy similar al 28,7% obtenido por el estudio DARIOS (15), que recogió datos de pacientes entre los años 2000 y 2010. La prevalencia de sobrepeso en estos dos últimos estudios fue de 39,5% y 51%, respectivamente. Finalmente, el estudio ENPE (Estudio Nutricional de la Población Española, realizado entre 2014-2015) (16) mostraba una prevalencia de obesidad en adultos del 21,6%, con un 33,4% de sujetos con obesidad abdominal y 39,3% con sobrepeso. Era destacable un aumento de la prevalencia con la edad y una distribución heterogénea entre Comunidades Autónomas.

En base a los datos expuestos no es de extrañar que el gasto sanitario asociado a esta patología sea francamente elevado, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (17). Éste se manifiesta en forma de múltiples complicaciones médicas, necesidad de ingresos hospitalarios y de tratamientos farmacológicos crónicos, aparición de diferentes grados de discapacidad funcional e importante cantidad de años de vida potencialmente perdidos. Por todo ello, la obesidad es un problema sanitario de primera magnitud. Por si fuera poco, la prevalencia se encuentra en continuo aumento durante las

últimas décadas (18) y se estima que, si nada cambia, esta tendencia se prolongue en los próximos años hasta alcanzar cifras récord de obesidad mundial. En un trabajo de la década pasada (19) Kelly et al. indicaban que la alarmante proyección era de 573 millones de individuos obesos a nivel mundial para el año 2030. Por supuesto, esta circunstancia se asociaría a un aumento paralelo de las complicaciones médicas, de la mortalidad y del gasto sanitario.

La imponente magnitud de este problema contrasta con la ausencia de tratamientos eficaces que lo combatan. Las principales guías de la práctica clínica (6,20,21) sitúan el ejercicio físico y las recomendaciones dietéticas y psico-conductuales como las principales herramientas terapéuticas, pero demasiado a menudo no obtienen los resultados esperados. La cirugía bariátrica es actualmente el tratamiento más efectivo de la obesidad mórbida a largo plazo en términos de pérdida de peso, mejoría de las comorbilidades, de la calidad de vida y de disminución de la mortalidad. No obstante, fundamenta su eficacia en la creación de profundos cambios en la fisiología del tránsito intestinal y conlleva malabsorción de por vida de micro e incluso macronutrientes.

Con todo, en la actualidad existe una urgente necesidad de desarrollar medidas preventivas eficaces contra esta enfermedad crónica, que deberían ser promovidas desde Salud Pública. De lograrse, ayudarían a limitar esta preocupante tendencia y con ello mejorarían la salud de la población y se ahorrarían recursos económicos. Con la esperanza de poder arrojar nueva luz en las estrategias de prevención y tratamiento de esta devastadora enfermedad, la investigación en el campo de la fisiopatología de la obesidad es actualmente muy intensa.

1.1.3 Mecanismos etiopatogénicos de la obesidad

Las causas que subyacen al aumento de prevalencia de obesidad en todo el mundo son muy numerosas y debatidas. Es comúnmente aceptado que un papel fundamental lo ejerce el cambio acontecido en el último medio siglo en los hábitos dietéticos de la población, hacia una alimentación mucho más hipercalórica y de bajo valor nutricional, que facilita el sobreconsumo energético (11). Esto resulta de la incorporación en la dieta habitual de productos procesados, baratos y por ello accesibles a toda la población, consecuencia de la globalización en su producción (9). Así, la dieta conocida como de patrón occidental se caracteriza por una ingesta elevada de grasa (>35% del valor calórico total aportado en forma de lípidos), con un consumo insuficiente de frutas, verduras, cereales y granos integrales, con un excesivo aporte de cereales refinados y de azúcares simples. Este patrón dietético se aleja de la tan promovida dieta mediterránea, la única que hasta la fecha ha demostrado tener efectos de protección cardiovascular (22). Adicionalmente, en las sociedades occidentales, al factor dietético se le añade la instauración de hábitos de vida cada vez más sedentarios, que favorecen todavía más el balance energético positivo en su población.

La participación de la genética individual está reconocida en la actualidad como un importante determinante del desarrollo de esta devastadora enfermedad. Este efecto se ejerce a través de polimorfismos que modulan las diferentes rutas metabólicas y las respuestas orexigénicas y anorexigénicas, y que se estudian por la disciplina de la nutrigenética. Por otro lado, recientemente se ha desarrollado la nutrigenómica, rama del conocimiento que persigue descifrar cómo los nutrientes ingeridos pueden modular la expresión génica de cada individuo, y quizá condicionar el desarrollo de obesidad.

Por otro lado, en la mayoría de los sujetos con obesidad es también destacable el papel de la psicopatología en la génesis y perpetuación de las conductas anómalas hacia la alimentación, que a menudo dificulta o incluso imposibilita la adherencia a las recomendaciones dietéticas y de estilo de vida.

No obstante, a la predisposición genética individual y al ambiente obesogénico en el que habitamos se añaden muchos otros factores, todavía no bien dilucidados, que modulan el balance energético y determinan la aparición de

sobrepeso y obesidad. Algunos de los elementos etiopatogénicos que se han reportado como influyentes son (7): cambios en la programación fetal (epigenética), cronodisrupción, exposición a disruptores endocrinos ambientales, trastornos del sistema nervioso central que alteran las señales orexígenas y anorexígenas del organismo, situaciones de estrés crónico, enfermedades psiquiátricas y endocrinas, tratamientos farmacológicos o alteraciones de la microbiota intestinal.

En la última década nuevas hipótesis etiopatogénicas se han abierto paso para intentar justificar, más allá de la sobreingesta calórica, la creciente prevalencia de esta enfermedad metabólica. Actualmente sabemos que el control de la homeostasis energética es llevado a cabo mediante un altamente complejo sistema de retroalimentación, que se establece entre el sistema nervioso central y las señales neurohormonales periféricas. Así, multitud de mediadores participan en esta regulación, modulando tanto la ingesta calórica como el gasto metabólico basal del organismo -revisado en (23)-. En este sentido, se ha investigado mucho sobre el funcionamiento de las estructuras cerebrales de control energético, tales como los núcleos del hipotálamo y los circuitos cerebrales de recompensa (24-26), y se han identificado multitud de mediadores reguladores de este sistema. No obstante, la complejidad de la interrelación entre estas estructuras y las señales provenientes del resto del organismo limitan todavía su abordaje como posibles dianas terapéuticas.

Por otro lado, muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en desentrañar la manera en que se articula el amplio sistema de señales orexígenas y anorexígenas provenientes de los diferentes tejidos periféricos. Entre estos, uno de los más relevantes es, por supuesto, el tejido adiposo, órgano con notables funciones endocrinas (27). En su estructura encontramos tanto adipocitos como células del sistema inmunitario, todas ellas capaces de liberar moléculas de señalización que actúan sobre diferentes tejidos a distancia, denominadas adipocinas, y con capacidad de regular el desarrollo de la obesidad y de sus complicaciones metabólicas (28). El número de moléculas secretadas por el tejido adiposo que ejercen efectos de señalización celular a distancia no deja de aumentar, conforme la comunidad científica profundiza en su investigación. No obstante, son más bien pocas las adipocinas que hayan

sido estudiadas en profundidad y de las que conozcamos su perfil de regulación, sus efectos moleculares y las funciones tisulares que ejercen.

La leptina es probablemente la adipocina más conocida en la actualidad. Caracterizada por tener una liberación pulsátil y proporcional a la cantidad de lípidos almacenada en el tejido adiposo blanco, es más abundantemente secretada por el adipocito blanco subcutáneo que por el visceral. Su producción tiene una fina regulación sujeta a múltiples factores, y ejerce efectos hormonales muy diversos, tanto sobre receptores centrales como periféricos: a nivel hipotalámico es anorexígena (funcionando como lipostato) y procatabólica sobre la homeostasis energética; sobre tejidos periféricos es lipolítica e influye en el metabolismo glucémico, el sistema inmunitario, la salud ósea y otros ejes hormonales, como el gonadal o el tiroideo (29). Por su parte, la obesidad es una situación clínica que característicamente cursa con resistencia a la leptina y aumento de sus niveles circulantes (30) sin estar completamente esclarecido el mecanismo molecular por el que esto tiene lugar. No obstante, se considera que la resistencia a la leptina promueve la disminución del gasto metabólico y la progresión de la propia obesidad y de sus complicaciones metabólicas, por lo que su reversión farmacológica también constituiría un objetivo terapéutico.

Por su parte, la adiponectina es otra de las adipocinas que ha sido objeto de mayor investigación. Producida mayoritariamente por el tejido adiposo subcutáneo en sus capas profundas, está también sometida a diferentes estímulos regulatorios (31). Es conocida fundamentalmente por sus efectos insulín-sensibilizadores y por existir una correlación directa entre unos bajos niveles de esta hormona y el desarrollo de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, aunque a través de mecanismos moleculares complejos, y todavía por terminar de aclarar (32). Adicionalmente, se le atribuyen efectos antiinflamatorios y antioxidantes (28), por lo que globalmente es considerada metabólicamente beneficiosa.

Continuando con el papel del tejido adiposo en el desarrollo de la obesidad, el fenómeno de marronización del adipocito blanco también ha suscitado un creciente interés (33-35), dado que su manipulación podría contemplarse como herramienta contra la obesidad. Finalmente, cabe destacar la existencia de otros órganos con conocida capacidad de regulación del balance energético,

mediante la liberación de mediadores neuroendocrinos. Entre ellos se hallan la glándula tiroides, el tejido gastro-entero-pancreático (mediante la síntesis de una gran variedad de péptidos o enterohormonas (36,37)), el hígado, o el tejido muscular (38). Las interrelaciones establecidas entre todos estos elementos de señalización celular suman un grado más de complejidad a la regulación de la homeostasis energética humana, siendo un campo de investigación todavía por continuar explorando (Figura 4).

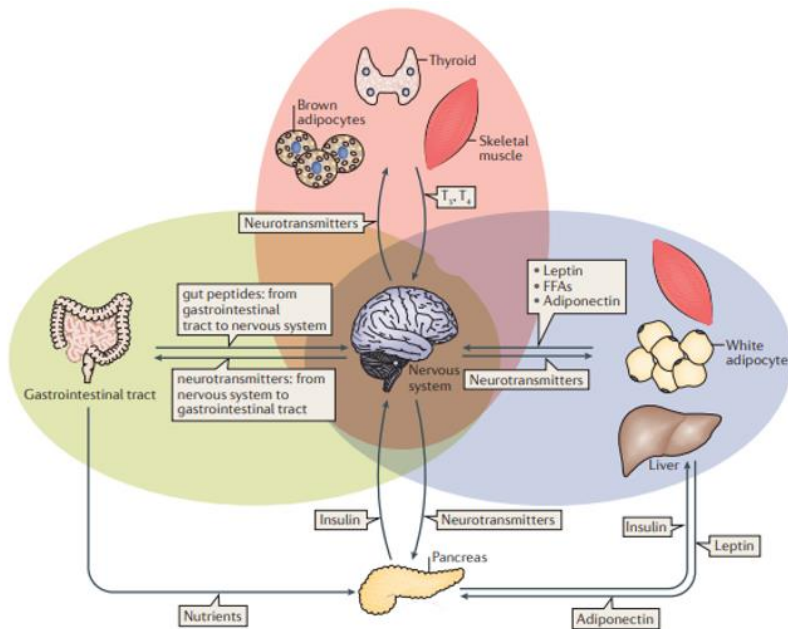


Figura 4. Órganos endocrinos implicados en el control de la homeostasis energética. Adaptado de Nadal et al. (2017) (39).

En otro orden de cosas, recientemente hemos presenciado un aumento exponencial del número de publicaciones que se han interesado por estudiar la composición, función y efectos endocrino-metabólicos de la microbiota intestinal, establecida ya como un factor etiopatogénico de la obesidad (40-43), y secundariamente, como una posible diana terapéutica (43-45). Actualmente se considera que el mantenimiento de la homeostasis entre la comunidad

bacteriana intestinal y el resto del organismo es crucial para conservar la salud (46), y su desequilibrio (o disbiosis) es contemplado como causa de múltiples patologías de la esfera endocrina, inmunitaria, o incluso neurológica. Todavía están por esclarecer los mecanismos por los que la disbiosis intestinal afectaría a la homeostasis energética y metabólica del hospedador, pero se postula que participarían el fenómeno de endotoxemia metabólica (47) e incluso la translocación bacteriana desde la luz intestinal hasta el tejido adiposo blanco (48).

En conclusión, si bien múltiples factores participan en favorecer y perpetuar el ambiente obesogénico que conduce a la obesidad de la población, actualmente ya no se la considera como el resultado un mero desequilibrio energético, dada la participación de innumerables elementos internos de regulación (49). En consecuencia, y para aumentar las probabilidades de resultar eficaces, las estrategias orientadas a combatir esta enfermedad deben ser igualmente multidisciplinarias y sinérgicas.

1.1.4 Comorbilidades asociadas a la obesidad

Lejos han quedado los tiempos en que se contemplaba a la obesidad como una mera alteración estética o funcional de algunos individuos, puesto que hoy en día es bien sabido que se trata de una enfermedad multidimensional, que afecta de manera transversal a la práctica totalidad de tejidos y sistemas del organismo. Aunque clásicamente contemplada como un trastorno puramente metabólico, en la actualidad se le atribuyen repercusiones endocrinas, cardiovasculares, inmunitarias e incluso oncológicas, y es conocido que ejerce un importante papel en determinar la estructura y función de la microbiota intestinal humana. Por sus características crónicas, este trastorno acarrea una extensa morbilidad que aparece de manera progresiva, y que también conduce a un incremento notable de la mortalidad por todas las causas.

La principal comorbilidad asociada a la obesidad es el síndrome metabólico, situación clínica en la que coexisten un conjunto de trastornos metabólicos diversos y en cuyo eje central se ha identificado a la resistencia a la insulina como mecanismo fisiopatológico. Este síndrome engloba en su definición a diferentes factores que aumentan de manera directa y notoria el riesgo de diabetes mellitus (50,51) y de enfermedad cardiovascular (52,53). Los criterios diagnósticos propuestos han variado a lo largo del tiempo, en función de la orientación que los autores querían otorgar a la definición, y según los componentes que se consideraban obligatorios (50,51,54,55). Actualmente, unos de los más empleados por su sencillez siguen siendo los definidos en el National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP:ATP-III) de 2001, según los cuales el síndrome está presente si coexisten tres o más de los cinco parámetros valorados, teniendo todos los componentes el mismo peso pronóstico (Tabla 2). No obstante, el espectro de trastornos clínicos que se han ido englobando dentro de síndrome metabólico ha ido ampliándose en los últimos años (55), añadiendo a los clásicos (la diabetes mellitus, la dislipemia de perfil aterogénico y la hipertensión arterial) las comorbilidades de hígado graso no alcohólico, la hipercoagulabilidad, la inflamación crónica de bajo grado o la apnea del sueño.

Tabla 2. Criterios diagnósticos del síndrome metabólico según NCEP ATP-III (2001).

<i>Circunferencia abdominal</i>	>102 cm en el hombre; >88 cm en la mujer
<i>Triglicéridos</i>	>150 mg/dL o en tratamiento hipolipemiente
<i>HDL-colesterol</i>	<40 mg/dL en el hombre; <50mg/dL en la mujer
<i>Tensión arterial</i>	>130/85 mmHg o en tratamiento farmacológico
<i>Glucemia basal</i>	>100 mg/dL o con hipoglucemiantes

Los sujetos con obesidad y con alteraciones incipientes del metabolismo hidrocarbonado presentan de manera frecuente niveles aumentados de insulina en plasma, que son conocidos como hiperinsulinismo, y que resultan de la pérdida de sensibilidad de los tejidos metabólicos a su acción (situación de resistencia insulínica). Esta circunstancia, que constituye el pilar central del síndrome metabólico, es también una causa reconocida de incremento del riesgo cardiovascular (al favorecer por diferentes mecanismos la aterosclerosis) y de aumento de la frecuencia de neoplasias (56,57). Así, se ha descrito asociada a la obesidad una mayor incidencia de los siguientes cánceres: gástrico, colorrectal, pancreático, endometrial, de mama en mujeres postmenopáusicas, renal, prostático y vesical.

Otras patologías que ven igualmente aumentada su incidencia en los pacientes con obesidad son: algunas enfermedades pulmonares, como el síndrome de apneas obstructivas del sueño (58); trastornos osteoarticulares degenerativos en las articulaciones de carga (59); hiperfiltración glomerular, microalbuminuria y deterioro de función renal (60); insuficiencia cardíaca (61); hipercoagulabilidad y trombosis (62); fibrilación auricular (63); hernia de hiato con reflujo gastroesofágico; colelitiasis (64); o hipertensión intracraneal benigna. Asimismo, no debe olvidarse el fuerte componente de psicopatología que tiene asociado esta enfermedad, que puede condicionar la adherencia al tratamiento y que se suele manifestar como trastornos del ánimo, trastornos de ansiedad, del control de impulsos o de la conducta alimentaria.

En lo que se refiere a la esfera hormonal, el obeso presenta una miríada de alteraciones bioquímicas con mayor o menor repercusión clínica (65,66), entre las que se encuentran: el extremadamente prevalente déficit de vitamina D (67); hipogonadismo hipogonadotropeo e infertilidad femenina (68); hiperandrogenismo de origen ovárico (69); síndrome de ovario poliquístico;

elevaciones subclínicas de la hormona TSH; déficit funcional somatotropo; leve hipercortisolismo endógeno; e hiperactivación del eje renina-angiotensina. Mención aparte merecen las profundas alteraciones que aparecen en los niveles y en la funcionalidad de las diferentes adipocinas, que todavía no son bien conocidas.

Por otro lado, la obesidad está englobada dentro del espectro de las patologías nutricionales, al ser una enfermedad provocada por un exceso de aporte calórico que conduce a un desequilibrio de la homeostasis energética. Como tal, está sujeta a la coexistencia de diversos déficits nutricionales (abarcados dentro del diagnóstico de desnutrición), que de hecho aparecen frecuentemente en este colectivo de pacientes, en relación con las dietas desequilibradas que habitualmente consumen, caracterizadas por un alto valor energético, pero bajo aporte nutricional. Éstas facilitan la aparición de déficits de micronutrientes como hierro, calcio, ácido fólico, vitamina D, vitamina E, vitamina A o vitamina C (70).

Adicionalmente, tampoco es infrecuente emitir el diagnóstico de sarcopenia (un tipo de desnutrición proteica) en esta población, facilitada tanto con un mal aporte dietético de proteínas, como con una falta de ejercitación de la masa muscular (propia de las personas obesas) y con mecanismos de resistencia a la insulina, inflamación sistémica y estrés oxidativo (71). En conjunto, esta compleja situación constituye la obesidad sarcopénica (72), condición clínica que aglutina las consecuencias adversas de ambas entidades por separado, y que por ello condiciona un cuadro de importante limitación funcional, dependencia y aumento de morbimortalidad (73). Los criterios diagnósticos de este síndrome clínico no han sido bien establecidos, siendo que la mayor parte de definiciones en los estudios publicados se han basado en parámetros de composición corporal.

Finalmente, la obesidad lleva consigo un aumento de mortalidad por cualquier causa, que se ha descrito ampliamente en la literatura (74-76) y que se asocia al IMC, siguiendo una curva con morfología en J (Figura 5). La obesidad constituye en la actualidad una de las principales causas de mortalidad de causa prevenible en nuestro medio, y se deriva principalmente de la enfermedad cardiovascular, seguida de la patología oncológica.

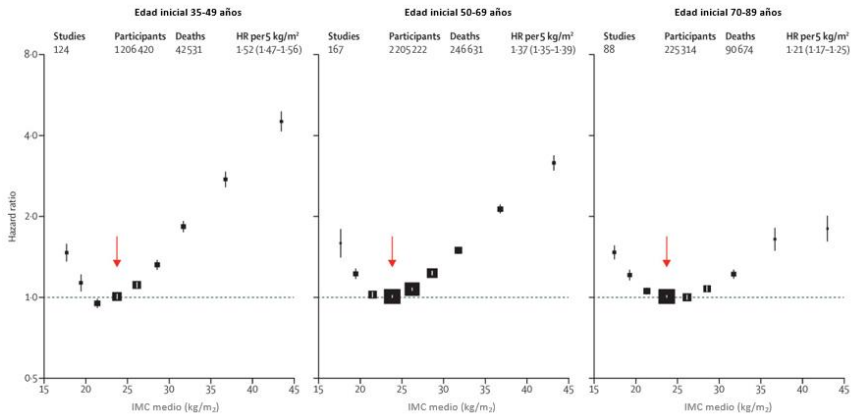


Figura 5. Asociación entre el IMC y la mortalidad por todas las causas, estratificada por grupos de edad. Adaptado de Di Angelantonio et al. (2016) (77).

Con todo, como se ha indicado previamente, la relación entre IMC y comorbilidad no es lineal. Así, es evidente que bajo el diagnóstico de obesidad se encuentran englobadas poblaciones muy heterogéneas entre sí, con un comportamiento y una historia natural muy divergentes, y que pueden considerarse sub-fenotipos de esta enfermedad (78). Si atendemos a la situación metabólica coexistente, encontramos que existe aproximadamente un 25% de personas con obesidad que no padecen resistencia a la insulina ni las comorbilidades que se le asocian (79). Esta circunstancia ha condicionado el reciente acuñamiento del término “obesidad metabólicamente sana”. Aunque su definición y criterios diagnósticos son todavía controvertidos (80), se usa este término para definir a aquellas personas con un IMC propio de obesidad, en las que no se consigue evidenciar ninguna alteración clínico-analítica sugestiva de síndrome metabólico.

Actualmente desconocemos los mecanismos fisiopatológicos por los que un subgrupo de personas con obesidad se encuentra protegido del síndrome metabólico, aunque se barajan diferentes hipótesis: diferencias en la distribución del exceso de grasa, en el sistema de ácidos biliares, en la composición de la microbiota intestinal, en la producción de adipocinas y miocinas, o en el grado de *lipoinflamación* asociada (80). Se ha visto que esta

circunstancia es más frecuente en mujeres jóvenes de etnia asiática, en comparación con la caucásica (79). Aunque los pacientes con obesidad metabólicamente sana tienen asociado un curso clínico más benigno y un mejor pronóstico cardiovascular (81,82), se trata de una situación dinámica que puede evolucionar hacia el síndrome metabólico en poco tiempo, al perderse la insulín-sensibilidad (83). De este modo, en la actualidad muchas investigaciones centran sus esfuerzos en intentar aclarar qué factores modulan la progresión de una obesidad metabólicamente sana (de curso mucho más benigno) hacia una metabólicamente insana, de modo que se pueda actuar de forma preventiva en los estadios precoces de la enfermedad.

1.1.5 Valoración antropométrica del sujeto con obesidad

El estudio de la cantidad de grasa corporal y de su distribución en los sujetos con sobrepeso y obesidad constituye todavía un reto en la práctica clínica, derivado de las dificultades metodológicas asociadas. La antropometría directa es un método barato y sencillo de determinar la composición corporal por compartimentos (muscular y grasa), basado en la medida de pliegues cutáneos y de perímetros corporales. Sin embargo, esta valoración progresivamente está siendo sustituida por un método más reproducible y preciso: el análisis de composición corporal por bioimpedancia eléctrica.

La bioimpedancia eléctrica es una sencilla e inocua exploración, que consiste en la estimación de la cantidad de kilos correspondientes a cada compartimento corporal de un individuo, basándose en las propiedades eléctricas de los tejidos. Para ello, un electrodo emisor hace pasar una pequeña corriente eléctrica alterna a través de las estructuras corporales del paciente, y la corriente de salida se recoge en un segundo electrodo receptor. A partir de la diferencia de voltaje obtenida entre los dos electrodos de exploración se obtienen dos parámetros eléctricos: resistencia y reactancia. Mediante ecuaciones validadas para este fin y conociendo el comportamiento eléctrico de cada tejido, a partir de estos dos parámetros se puede obtener la estimación de la composición corporal. A partir de la información recogida en crudo y sin hacer uso de fórmulas predictivas también se puede analizar el ángulo de fase y realizar un análisis vectorial.

Existen en la actualidad una amplia gama de dispositivos de bioimpedancia eléctrica, que se diferencian entre sí por la frecuencia de la corriente emitida y por su capacidad de realizar un análisis por segmentos corporales. Los dispositivos multifrecuencia son significativamente más precisos en la estimación de los compartimentos corporales (84), y los de análisis segmentario siempre son de elección, por discriminar mejor entre los diferentes elementos corporales.

Estas básculas permiten obtener información precisa sobre la cantidad de masa grasa (en kg y en %) y de masa libre de grasa (en kg y en %), así como estimar en kg la masa muscular, los litros de agua corporal total y su distribución intra y extracelular, e incluso el área de grasa visceral (cm²).

Además, las segmentarias permiten analizar esta información por cinco segmentos corporales (tronco y cuatro extremidades), informando sobre la distribución regional de la masa grasa y libre de grasa.

Finalmente, estos dispositivos tienen la ventaja de permitir al clínico la monitorización de los cambios de composición corporal por compartimentos en un paciente concreto, después de instaurar un plan nutricional específico, y de adecuar las recomendaciones de forma individualizada a los cambios físicos producidos.

1.1.6 Lipoinflamación asociada a la obesidad

Es bien sabido que el tejido adiposo blanco es el más afectado por la obesidad crónica, no sólo de manera cuantitativa, sino también cualitativa, viéndose comprometida tanto su estructura como sus diferentes funcionalidades. Por una parte, la capacidad de almacenamiento de lípidos se altera, lo cual conduce a niveles más altos de ácidos grasos circulantes y a una resistencia a la acción anabólica de la insulina. Por otro lado, se producen profundas modificaciones en la función endocrina de este tejido, viéndose afectadas la liberación de leptina, adiponectina y de muchas otras adipocinas de reconocidos efectos metabólicos sistémicos.

En la actualidad, el tejido adiposo se contempla cómo órgano endocrino, como fuente de producción de muchas citoquinas, y como centro integrador de las señales que influyen en la homeostasis energética provenientes de todo el organismo. De este modo, se ha establecido que es el lugar donde se desencadenan las alteraciones inmunitarias que conducen a la inflamación sistémica de bajo grado que caracteriza a la obesidad crónica, como describieron inicialmente en el modelo animal Hotamisligil et al. (85-87). La ubicación exacta de esta inflamación crónica no ha sido bien definida, aunque sería coherente pensar, como apuntan algunas evidencias, que la grasa visceral sería la más probable, en base a la relación existente entre su cantidad y el desarrollo de síndrome metabólico (88).

La inflamación es un proceso fisiológico de respuesta del organismo a estímulos dañinos de diferente índole, que va destinada a reestablecer la homeostasis sistémica. No obstante, cuando se mantiene activa a largo plazo, como en el caso del paciente obeso, origina la lesión del tejido donde asienta, e incluso puede afectar a estructuras distantes y que intervienen en la homeostasis energética, como los islotes pancreáticos, el hígado, el músculo esquelético o el hipotálamo. De este modo, la inflamación sistémica de bajo grado ha sido relacionada en numerosos trabajos con el desarrollo de patologías crónicas asociadas al síndrome metabólico, como la disfunción de la célula beta (89), la resistencia tisular a la insulina propia de la diabetes mellitus tipo 2 -tanto a nivel adipocitario (90), como hepático (91) y muscular (92)-, y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (93).

Según la hipótesis de inflamación crónica, las personas con obesidad y resistencia a la insulina presentan una intensa infiltración del estroma de su tejido adiposo blanco por células inmunitarias del sistema monocito/macrófago, que son atraídas a este lugar mediante moléculas quimiotácticas. Posteriormente, condicionado por factores locales todavía no bien conocidos, estos macrófagos desarrollan un cambio fenotípico decisivo por el que se convierten en células M1, caracterizadas por un perfil proinflamatorio (28,94,95). Esta circunstancia condiciona un desequilibrio en el tejido adiposo blanco en la ratio de poblaciones macrofágicas de fenotipo proinflamatorio (M1) y antiinflamatorio (M2), con predominancia de las primeras. Este fenómeno, en el que participan una gran variedad de poblaciones inmunitarias, ha sido acuñado con el término *lipoinflamación*.

La *lipoinflamación* se manifiesta con un incremento en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), que son de producción local y posteriormente liberadas al torrente sanguíneo (87,96). Se ha descrito que la inflamación sistémica que esto condiciona favorece la resistencia a la insulina, que a su vez conduce al síndrome metabólico y a la aterosclerosis sistémica acelerada (97-99). Por tanto, el tipo de comportamiento del macrófago que infiltra el tejido adiposo blanco de la persona con obesidad parece ser determinante sobre el comportamiento metabólico de ésta, decantándolo hacia una versión metabólicamente sana o insana (Figura 6).

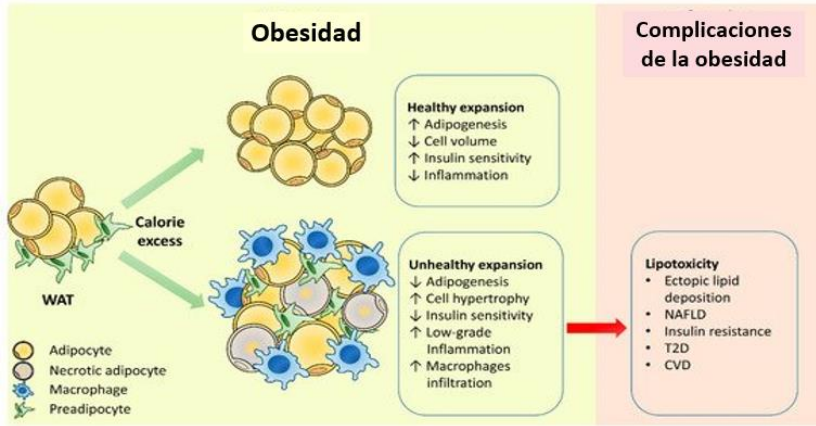


Figura 6. Expansión del tejido adiposo blanco como consecuencia de la obesidad por la vía de la obesidad metabólicamente sana (sin inflamación) y por la vía de la obesidad metabólicamente enferma (asociada a lipoinflamación y a comorbilidad metabólica). Adaptado de Longo et al. (2019) (100).

Atendiendo a los factores desencadenantes del tipo de polarización fenotípica que presenta el macrófago del tejido adiposo blanco, diversos factores se han postulado. Por un lado, han sido descritas alteraciones en la capacidad de remodelado de la matriz extracelular del tejido adiposo como causa de estrés mecánico al adipocito (101), así como fenómenos de hipoxia adipocitaria por exceso de distensión, que podrían contribuir a esta inflamación (102).

Otra teoría aboga por la disbiosis intestinal como factor precipitante de estas alteraciones inmunológicas (48,103,104). Según esta última, dietas de alto contenido lipídico provocarían alteraciones en la composición del ecosistema bacteriano intestinal y favorecerían la permeabilidad de la barrera intestinal. Como consecuencia, los lipopolisacáridos presentes en la luz intestinal, procedentes de las bacterias Gram negativas del ecosistema disbiótico, podrían alcanzar con mayor facilidad el torrente sanguíneo a través de la barrera intestinal permeable, originando el fenómeno conocido como endotoxemia metabólica (105). Los lipopolisacáridos son moléculas que constituyen reconocidos componentes estructurales de la pared celular bacteriana, con capacidad de activación de los receptores *toll-like* del sistema inmunitario

innato. Una vez en el plasma, se cree que podrían ser transportados mediante las lipoproteínas plasmáticas hasta tejidos remotos, y al acumularse en el tejido adiposo blanco, desencadenar reacciones inflamatorias a este nivel.

Independientemente de qué los origina, actualmente se sabe poco sobre la secuencia de eventos inmunológicos que tienen lugar en el tejido adiposo blanco y que desembocan en el *switch* de fenotipo macrofágico, en la cascada inflamatoria y en la *lipoinflamación*. Múltiples células del sistema inmunitario pueden verse implicadas, y su papel individual está por dilucidar. No obstante, es sabido que la activación macrofágica se ve modificada por los linfocitos T, células integrantes de la respuesta inmunitaria adaptativa que infiltran el tejido adiposo blanco, en mayor medida en los sujetos con obesidad que en los delgados. Así, el tipo de respuesta desarrollada por los linfocitos T colaboradores o *T helper* (Th) es determinante de la polarización del macrófago (106). De este modo, parece que la participación de la citoquina IFN- γ (propia de la respuesta Th1) sería clave en regular el *switch* fenotípico hacia el M1, y en modular el desarrollo de insulín-resistencia (107). También la citoquina IL-17 (propia de la respuesta Th17) se ha relacionado con los efectos proinflamatorios del macrófago, aunque aún no está bien definida la disfunción de esta población linfocitaria en el contexto de las enfermedades metabólicas.

Por el contrario, las células Th2 promoverían un fenotipo macrofágico de tipo M2, células que aumentarían los niveles tisulares de IL-10 y con ello favorecerían la insulín-sensibilidad, al compensar los efectos del TNF- α (108). Por su parte, las células T reguladoras o Treg son una estirpe de linfocitos T especializada en controlar la hiperreactividad inmunológica, y en el tejido adiposo generan un patrón de citoquinas que también conduce a la supresión de la inflamación propia de la obesidad. En modelos animales obesos se ha objetivado que esta estirpe de linfocitos es abundante en la grasa abdominal de los sujetos metabólicamente sanos, pero se encuentra muy reducida en los insulín-resistentes (106). Además, el adecuado funcionamiento de estas células se ha relacionado con la reversión de la resistencia a la insulina tras el uso del fármaco pioglitazona (109). Adicionalmente, en este proceso se ha descrito la participación de las células T citotóxicas (Tc), que a través de la amplia

infiltración del tejido adiposo blanco favorecerían el reclutamiento posterior de macrófagos (110).

Por otro lado, los eosinófilos son células integrantes del sistema inmunitario innato, asociadas con la respuesta a infecciones helmínticas y reacciones alérgicas. Su infiltración del tejido adiposo blanco se ha relacionado, a través de la secreción de IL-4, con la activación y mantenimiento del fenotipo M2 del macrófago, y con ello con un mejor perfil de insulín-sensibilidad (111). En su ausencia, esta población de macrófagos se ve muy disminuida, por lo que también se le atribuye al eosinófilo un papel en el mantenimiento de la homeostasis metabólica.

La participación de la microbiota intestinal en la diferenciación y acumulación de estas poblaciones linfocitarias en el tejido adiposo blanco se encuentra actualmente en estudio. También se contempla una alteración de la interacción entre esta microbiota y las células inmunitarias intestinales asociada a las dietas ricas en grasa (112).

Sea como fuere, teniendo en cuenta la crucial participación de estas estirpes celulares en el desarrollo de la resistencia a la insulina y del síndrome metabólico, en este momento se contemplan como posibles dianas terapéuticas para modular la homeostasis metabólica. Ésta se llevaría a cabo mediante una reducción de la ratio Th1/Th2 en el tejido adiposo, que condujese a la modificación del patrón de citoquinas liberado y a la polarización de la respuesta macrofágica hacia al fenotipo antiinflamatorio M2 (108).

1.1.7 Estrés oxidativo asociado a la obesidad

Recientemente se ha empezado a reconocer el papel del estrés oxidativo como factor fisiopatológico clave en el desarrollo de muchas patologías, no siendo la obesidad, ni sus comorbilidades, una excepción (113). El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción celular de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y su contrapartida: los elementos del sistema antioxidante de los que disponen los organismos eucariotas.

Actualmente se acepta que, en paralelo a la *lipoinflamación*, el sujeto con obesidad desarrolla una situación de aumento de estrés oxidativo que también se origina en el tejido adiposo blanco (114-116), aunque se desconocen los mecanismos exactos que conducen a ello. Se considera que estos dos factores fisiopatológicos están muy interrelacionados entre sí (si bien no está clara la secuencia temporal en la que aparece cada elemento) y que se potencian el uno al otro, favoreciendo así los fenómenos de disfunción adipocitaria (117). Tampoco ha sido bien explorada la relación existente entre las alteraciones de las poblaciones inmunitarias que habitan el tejido adiposo blanco y la función endocrina del mismo, aunque se cree que adipocinas como la adiponectina tienen un papel determinante, debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes (28) y sensibilizantes a la insulina (32).

Hoy en día, el estrés oxidativo ha sido relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (118-120), con la aparición de enfermedad cardiovascular (121), y con la presencia de comorbilidades asociadas a la obesidad (121,122), tal como hipertensión arterial (123), diabetes mellitus tipo 2 (124), aterosclerosis (125) e hígado graso no alcohólico (126,127).

1.1.8 *Inmunopatología asociada a la obesidad*

Como se ha comentado anteriormente, el tejido adiposo blanco tiene una activa participación en el control de la respuesta inmunitaria sistémica, a través de la producción de moléculas de señalización que son liberadas al torrente sanguíneo (citoquinas y adipocinas). Si bien no son bien conocidos los mecanismos exactos por los que esta regulación tiene lugar, sí que disponemos de evidencias contundentes de la existencia de esta interrelación entre los sistemas metabólico, endocrino e inmunitario (128). Por consiguiente, la disfunción del tejido adiposo presente en las situaciones de obesidad crónica acarrea alteraciones, no sólo en los sistemas homeostáticos energético y metabólico, sino también en la capacidad de respuesta inmunitaria y en los fenómenos de inflamación tisular.

Es bien sabido que la obesidad incrementa por sí misma la susceptibilidad a las infecciones (129), y que confiere al sujeto que la padece un riesgo incrementado de evolucionar desfavorablemente ante infecciones consideradas como comunes. La obesidad se contempla, asimismo, como factor de riesgo independiente de contraer infecciones postoperatorias (130) y se ha asociado a una mayor mortalidad infecciosa intrahospitalaria (131,132) y a una estancia más prolongada en las Unidades de Cuidados Intensivos (133,134). Como consecuencia, existe un exceso de morbimortalidad de causa infecciosa asociada a esta enfermedad, que se suma a la generada en el resto de las esferas (metabólica, cardiovascular, oncológica, osteoarticular, etc.). Por lo tanto, en base a las estimaciones que auguran un incremento progresivo de la prevalencia de obesidad, es esperable que las infecciones asociadas aumenten en las próximas décadas, y paralelamente el consumo de recursos sanitarios.

Se desconoce la fisiopatología concreta de la disfunción inmunitaria del obeso, aunque en general se ha relacionado con alteraciones en la inmunidad de tipo celular, tanto innata como adquirida. Ya en 1999 Niemann et al. describieron diferencias entre sujetos obesos y delgados en cuanto al recuento leucocitario y la respuesta fagocítica y oxidativa manifestada por los monocitos circulantes (135). Este mismo trabajo apuntaba hacia que la estimulación linfocitaria en el obeso se asociaba con una menor proliferación celular que en sujetos con normopeso.

Hoy en día sabemos que las personas con obesidad tienen incrementada la ratio de monocitos de fenotipo M1 (proinflamatorio)/M2 (antiinflamatorio) (136), confiriéndoles el estado proinflamatorio crónico que se ha descrito en un apartado anterior como asociado a la obesidad. Este *switch* que tiene lugar sobre el sistema monocito/macrófago genera alteraciones en el perfil de citoquinas liberadas a nivel sistémico, cuyos efectos sobre la respuesta inmunitaria frente a las infecciones todavía no han sido bien explorados. No obstante, se ha postulado que la exposición crónica a mediadores proinflamatorios generaría una desensibilización del sistema inmunitario a los mismos, de modo que ante noxas infecciosas reales no se desarrollaría la respuesta inflamatoria pertinente (137), favoreciendo por ello una peor evolución del proceso infeccioso.

Otro factor candidato a explicar la inmunopatología del paciente con obesidad es la alteración en el perfil de secreción de adipocinas por el tejido adiposo. La abundante hormona adiponectina es ampliamente conocida por sus funciones inmunosupresoras, mientras que la leptina, todavía más estudiada, tiene efectos opuestos proinflamatorios (138,139). Ésta última, se ha convertido en la diana más estudiada como causante de la inmunopatología del obeso (129), dado que la mayoría de las células del sistema inmunitario expresan receptores para esta molécula. Esto le otorga capacidad para modular la acción de las células del sistema inmunitario: en el caso del monocito/macrófago favorece la liberación de IL-5, de TNF- α y de IL-12, y aumenta su actividad fagocítica (140); sobre los neutrófilos incrementa la respuesta oxidativa y favorece la quimiotaxis (141,142); modifica la función de las células NK (143); ejerce funciones fundamentales sobre la maduración tímica de los linfocitos T (144) y sobre su activación y proliferación clonal tras el estímulo antigénico (145); finalmente, la leptina también es capaz de estimular la linfopoyesis y la mielopoyesis (146). Con todo, el déficit de esta hormona se ha asociado con respuestas inmunitarias insuficientes, tanto en modelos murinos *ob/ob* como en humanos con déficit congénito, y con alteraciones inmunitarias que revierten con su suplementación (147). En el caso de la población con obesidad, existe una situación de hiperleptinemia crónica, resultado del desarrollo de resistencia a la acción de esta hormona sobre los tejidos metabólicos. Sobre las células del sistema inmunitario se cree que se generaría

una situación funcionalmente similar, caracterizada por el déficit de acción de la leptina y de estimulación del sistema inmunitario.

Adicionalmente, es conocido que las células de este sistema presentan receptores para la insulina (148), pero los efectos de la hiperinsulinemia crónica han sido poco explorados en el campo de la inmunopatología; no obstante, se ha barajado la posibilidad de que la resistencia a la insulina tenga capacidad de influenciar la diferenciación del linfocito *T helper* hacia una respuesta inmunitaria tipo Th2, en lugar de la Th1 (149).

Por otro lado, se ha descrito que el exceso de tejido adiposo corporal tiene efectos perjudiciales sobre los propios órganos linfoides, a través del depósito de grasa en los tejidos, alterando su arquitectura y función. Por ejemplo, a nivel del timo, se ha visto que la obesidad favorece el envejecimiento tisular y reduce la diversidad de las células T que se originan en su seno (150).

Finalmente, el propio desequilibrio energético asociado al paciente obeso podría contribuir a la disfunción del sistema inmunitario, a través de la modificación de los niveles circulantes de sustratos energéticos. Los ácidos grasos libres en plasma, que se encuentran globalmente incrementados en sujetos que padecen obesidad, tienen capacidad de unión a receptores *toll like* de los macrófagos, y de activar por ellos mismos respuestas inflamatorias (151).

Teniendo en cuenta los datos anteriormente expuestos sobre el compromiso inmunitario de la población con obesidad, no es sorprendente que exista una susceptibilidad aumentada a infecciones bacterianas, víricas y también protozoarias, aunque estas últimas son menos conocidas en el contexto del sujeto obeso. La relación entre los parásitos protozoarios y la inmunidad del hospedador es un vasto campo de investigación todavía por explorar.

La inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad podría ser contemplada como protectora frente a infecciones protozoarias crónicas, que requieren de una respuesta inflamatoria rápida y potente para su eliminación (152). No obstante, también hay trabajos que describen en individuos obesos una mayor tasa de colonización por algunas especies protozoarias (153). El actual trabajo pretende ayudar a explorar esta importante laguna de conocimiento.

1.2 Colonización intestinal por organismos unicelulares eucariotas

Las parasitosis intestinales son las enfermedades provocadas por la infección del tracto digestivo del hospedador humano que vienen producidas, o bien por la ingestión por vía oral de protozoos (ya sea en su forma quística o móvil) o de huevos de helmintos, o bien por la penetración de larvas o de helmintos a través de la piel. En el caso de la parasitación por organismos eucariotas unicelulares, los helmintos (seres pluricelulares) quedan excluidos, tratándose por tanto de colonizaciones por microorganismos pertenecientes al antiguo reino protocista, y que característicamente tienen un ciclo vital en el que ejercen una función parásita en el intestino del hospedador. Tradicionalmente, su presencia como parásitos se ha considerado perjudicial para el ser humano.

Existe una gran cantidad de infecciones protozoarias que afectan al tracto gastrointestinal humano, y que pueden manifestarse con un amplio espectro clínico (154). Ciertas especies parásitas no disponen de mecanismos conocidos de patogenicidad, ni de capacidad invasora sobre la pared del intestino humano, por lo que completan su ciclo vital en la luz intestinal, donde interactúan con los elementos de su contenido y con la mucosa intestinal. La capacidad patógena y la virulencia de los protozoos intestinales difiere ampliamente entre especies, e incluso entre cepas o genotipos de la misma especie, determinadas por factores como la cantidad de inóculo infectivo, el subtipo, o incluso la procedencia del patógeno implicado.

Asimismo, la repercusión clínica puede ser muy divergente entre individuos colonizados por el mismo parásito, condicionado por la respuesta inmunitaria del hospedador y su capacidad de contención de la infección. De este modo, las manifestaciones abdominales agudas predominan en población pediátrica y entre los adultos que padecen alguna alteración en la inmunocompetencia. Contrariamente, las parasitosis que trascurren de forma oligo o asintomática son propias de hospedadores adultos inmunocompetentes, como los que se incluyeron en el actual trabajo. Estas parasitosis clínicamente poco floridas pueden pasar desapercibidas para el humano adulto y perdurar en su intestino durante largos periodos de tiempo hasta volverse crónicas, adquiriendo importancia en el control de la homeostasis del hospedador.

1.2.1 Factores de riesgo de colonización intestinal

La principal vía de transmisión de las parasitosis intestinales es la oral-fecal, y dado que para este tipo de infecciones los factores de riesgo son compartidos (aguas, alimentos y suelos contaminados fecalmente, escasas medidas de higiene personal y comunitaria...), es habitual encontrar colonizaciones múltiples en el mismo hospedador (155). Las infecciones intestinales se han asociado clásicamente con poblaciones con menos recursos económicos, dificultades para el acceso a aguas potables y condiciones higiénicas deficientes; por este motivo, los viajes realizados a países con bajos recursos (fundamentalmente a regiones tropicales y subtropicales de Asia y África) se contemplan ampliamente como un factor de riesgo para contraer este tipo de parasitosis (156-158). En nuestro medio, las condiciones óptimas para la colonización se encuentran en colectivos que emplean aguas no potabilizadas para el consumo propio (aguas de pozos, lagos, lluvia, etc.) (159). Asimismo, profesiones que implican el contacto con aguas residuales o con restos fecales humanos (agricultores, profesionales sanitarios, personas que atienden a grandes dependientes) son consideradas también factor de riesgo, y como tales se tuvieron en cuenta en el diseño de este estudio.

Por otro lado, las verduras, frutas y hortalizas son un elemento imprescindible de nuestra dieta, pero que también se ha descrito como fuente común de infecciones protozoarias, que pueden ser patogénicas para el ser humano (160-162). Esta circunstancia es propia del consumo crudo de estos productos o si éstos son lavados con agua no potable (como la procedente de ríos o pozos), porque puede acarrear la ingestión accidental de formas infectivas microscópicas del parásito (quistes, ooquistes y huevos). La frecuencia global de contaminación protozoaria de frutas y verduras se ha descrito como del 1,9-9,3 % (162) y es variable en relación con el área geográfica estudiada. En el caso de *Giardia intestinalis*, se cree que pueden contener quistes el 4,8% de estos productos, como término medio.

Por otro lado, la frecuencia de contaminación está relacionada con la forma de producción, procesamiento y posterior almacenamiento y venta de los productos agrícolas. De este modo, aquellos que son cultivados de manera ecológica y en cuyo riego se emplean aguas no potabilizadas, aumentan la

probabilidad de ser contaminados, respecto a aquellos con los que se emplean plaguicidas y pesticidas, porque asocian una carga parasitaria mucho mayor (162); también es más frecuente la transmisión de ciertas parasitosis intestinales a partir de verduras vendidas en mercados al aire libre, respecto a si se venden en supermercados cerrados, debido a la contaminación por parte de artrópodos como vector mecánico, una vez los productos están en la tienda. Con todo, en este estudio consideramos que las personas que consumían de forma regular verduras y hortalizas de cultivo propio, o de cultivo ecológico de pequeños productores, presentaban mayor riesgo de contraer infección por alguno de los microorganismos analizados.

Asimismo, es bien sabido que la población pediátrica es un colectivo especialmente afectado por infecciones (protozoarias, helmínticas, bacterianas o víricas) con vía de transmisión oro-fecal, debido a su menor cumplimiento de las normas de higiene y el mayor contacto directo entre sí. Los picos de prevalencia para la colonización por los microorganismos de estudio varían entre series, pero suelen encontrarse entre los 4-15 años para *Blastocystis* sp. (156,157,163). A edades más precoces no es tan frecuente este tipo de colonización, probablemente debido a la mayor dependencia y vigilancia estrecha de los padres y a la alimentación más restrictiva y controlada. En concordancia, en este estudio también se consideró factor de riesgo para parasitaciones intestinales el contacto estrecho (familiar o profesional) con niños menores de 10 años.

Finalmente, los animales constituyen un reservorio conocido para múltiples parásitos humanos, facilitando la transmisión de infecciones a nuestra especie. Es destacable que en el caso del protista *Blastocystis* sp. existen ciertos subtipos considerados más zoonóticos que otros (el ST5 se ha relacionado con el ganado bovino y porcino, mientras que ST6 y ST7 suelen aparecer en aves). En este sentido, algunos estudios (156) han indicado que profesiones que tienen contacto íntimo con el ganado aumentan la prevalencia de la colonización por *Blastocystis* sp., aunque otros no lo han confirmado (163). Por otro lado, en este último estudio español no se detectaron casos de colonización en los perros y gatos domésticos analizados, por lo que se concluyó que éstos tenían un papel despreciable en la adquisición de la colonización por este microorganismo. Sea como fuere, en este estudio el

contacto regular con animales domésticos no desparasitados y con animales de ganado se consideró factor de riesgo para la colonización por los parásitos eucariotas intestinales.

1.2.2 Parásitos intestinales eucariotas de interés

1.2.2.1 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis, también conocida como *Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*, es uno de los parásitos unicelulares eucariotas con reconocido carácter patógeno que más frecuentemente afecta al intestino del ser humano y que, por su elevada prevalencia y repercusiones clínicas, más se ha estudiado. Se trata del protozoo flagelado extracelular causante del mayor número de infecciones protozoarias intestinales en el humano (Figura 7). La forma quística es la infectiva, resistente a la cloración de las aguas y que puede sobrevivir en el medio externo en ambientes húmedos y fríos durante meses, mientras que los trofozoítos son la forma móvil que adoptan al penetrar en el hospedador (164).

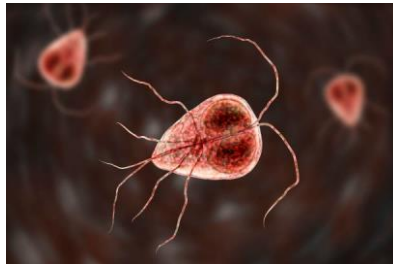


Figura 7. Trofozoítos de *Giardia intestinalis*. Fuente: <https://www.istockphoto.com/>

Su transmisión tiene lugar a través de agua y alimentos contaminados fecalmente con quistes, o directamente por el contacto con personas o animales infectados. La colonización asienta en regiones proximales del tracto gastrointestinal, principalmente duodeno y yeyuno, donde se fijan al epitelio intestinal haciendo uso de su disco ventral. También pueden parasitar íleon,

vías biliares e incluso el tubo pancreático, y ser causa de colecistitis y pancreatitis (165,166).

Se la considera claramente patógena, dado que es el protozoo responsable de la mayoría de las gastroenteritis agudas vinculadas al consumo de aguas contaminadas en el mundo. La OMS estima que se producen 250 millones de nuevos casos de giardiosis al año (CDC 2015), pese a que en 2007 fuera incluida en la iniciativa de enfermedades descuidadas (167). La incidencia de infección en países desarrollados es del 2-7% (aunque se considera subestimada), pero de hasta 50% en los países en desarrollo socioeconómico (168).

La fisiopatología de la infección por *G. intestinalis* es todavía altamente desconocida, pero se sabe que dispone de diferentes mecanismos lesivos sobre el enterocito humano: depleción de arginina, lesión del complejo de unión apical o modificación de la expresión génica. En la fase aguda de la infección, el parásito induce una importante disrupción estructural en el enterocito, que conduce a disfunción de las microvellosidades y a la apoptosis celular (169-171). Como consecuencia de la alteración que provoca sobre las uniones estrechas epiteliales, se genera un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal (172), que facilita los procesos de alergia e intolerancia alimentarias. Al mismo tiempo, induce la pérdida de la actividad enzimática disacaridasa del borde en cepillo del epitelio, lo que conduce a la diarrea osmótica característica de la infección (173), aunque en ésta también existe un componente de esteatorrea producida por mala digestión y malabsorción por el tracto intestinal superior. Esta mala digestión ejercida por el protozoo viene producida por su interferencia con la activación de las enzimas pancreáticas y sobre el efecto micelar solubilizador de las grasas (174-176), provocada para facilitar el consumo de ácidos biliares por el parásito. Histopatológicamente genera un infiltrado linfocítico intraepitelial y cierta atrofia vellositaria (177-179), con disminución de la superficie mucosa de absorción y tendencia a la malabsorción de oligoelementos. Pese a estas disrupciones estructurales y funcionales del epitelio, no se produce la invasión de la mucosa intestinal por el parásito, y en general en sujetos inmunocompetentes la infección suele ser autolimitada por una respuesta inmunitaria humoral, en la que la participación de IgA secretora anti-*Giardia* juega un papel fundamental (169).

Por otro lado, numerosas publicaciones indican que *G. intestinalis* tiene capacidad por sí misma de reconfigurar la composición de la microbiota del ecosistema intestinal, conduciendo a una disbiosis, y ésta persistir incluso tras su erradicación (171,180,181), lo que justifica la existencia de las denominadas complicaciones postinfecciosas (166,182). Los mecanismos implicados en generar esta disbiosis son poco claros, si bien mientras dura la infección se le atribuye la capacidad de alterar (mediante proteasas de cisteína) la integridad de los *biofilms* en los que habitan las bacterias intestinales comensales (180). Esto las liberaría desde el *biofilm* a la luz, donde persistirían, convirtiéndose en patógenas e inducirían disrupción epitelial, aumento de la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana e inflamación persistente. Esta situación clínica se ha descrito en hasta un 5% de las giardiosis (166) y puede prolongarse años, manifestándose como tendencia a los trastornos intestinales (síndrome de intestino irritable) (183-185) y como intolerancias a carbohidratos secundarias al daño de la mucosa (186). Incluso se han descrito complicaciones postinfecciosas a nivel extraintestinal, como alergias, artritis o síndrome de fatiga crónica (187), añadiendo un grado más de complejidad a la labor de desentrañar los procesos que participan en esta infección protozoaria.

Por último, cabe una mención especial su interacción con el sistema de los ácidos biliares humanos. Aunque clásicamente han sido considerados sólo por su función emulsificadora de las grasas, nuevas evidencias han demostrado que se comportan como moléculas señalizadoras a nivel tanto intestinal como sistémico, y empiezan a atribuírseles funciones endocrinas y de regulación metabólica (41,188). Por su parte, la microbiota intestinal tiene capacidad de modificar estas moléculas, y por lo tanto de influenciar en la señalización que ejercen sobre la homeostasis del hospedador (189). En el caso de *G. intestinalis* la información al respecto de su capacidad de metabolizar ácidos biliares en ocasiones ha sido contradictoria (178,190), pero se cree por estudios *in vitro* que la presencia de los conjugados estimula su crecimiento (171,191), mientras que en forma desconjugada le resultan tóxicos (192,193), siendo éste actualmente un campo de investigación puntero.

1.2.2.2 *Blastocystis* sp.

Se trata de un microorganismo eucariota que clásicamente ha resultado difícil de catalogar filogenéticamente, actualmente siendo englobado dentro del grupo *Stramenopiles*. Tiene un ciclo vital que pasa por una fase biológicamente activa y una de enquistamiento, que viene determinada por la compatibilidad de subtipo con el hospedador en el cual se aloja (Figura 8). Se le atribuye capacidad de multiplicación por fisión binaria y presenta un metabolismo anaerobio estricto.

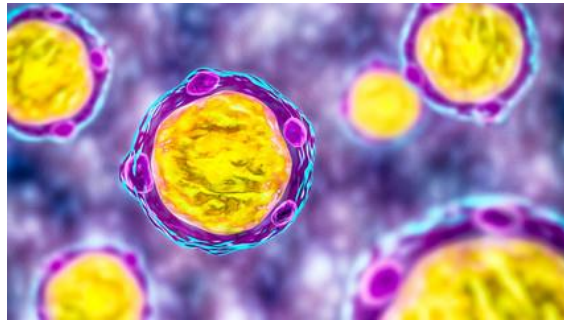


Figura 8. Ejemplares de *Blastocystis* sp. en su forma vacuolar, muy frecuentemente hallados en heces humanas. Fuente: <https://es.dreamstime.com/>

La clasificación taxonómica de este microorganismo también ha sido objeto de debate, y en la actualidad ya no se habla de especies de *Blastocystis*. En su lugar, se ha establecido una terminología de consenso por la que se clasifica en subtipos de *Blastocystis* sp., determinados por su composición genética, que es llamativamente heterogénea. De este modo, mediante secuenciación génica de la subunidad pequeña del ADN ribosómico se han descrito hasta la fecha 28 subtipos de este microorganismo (194), que se caracteriza por su gran diversidad genética (195). La nomenclatura de los subtipos es ST1-ST17, ST21, ST23-29 y ST30-ST32. De éstos, los subtipos ST1-ST10, ST12, ST14, ST16 y ST26 se han conseguido aislar en humanos y animales (196), indicando su potencial zoonótico, si bien el 90% de las veces son ST1, ST2, ST3 y ST4. El resto de los subtipos se han comunicado sólo en animales, sugiriendo que son específicos de hospedador y suponen por lo tanto menor riesgo para la Salud Pública (197). Aunque existe una gran variabilidad geográfica en la distribución, el subtipo ST3 es el más prevalente a nivel mundial. En nuestro país la epidemiología molecular de este protista es muy desconocida, aunque

recientemente se han publicado trabajos que la estudian tanto en animales como en humanos (198,199).

Diferentes subtipos pueden colonizar el mismo sujeto (colonización mixta), con significación clínica desconocida. Por otro lado, se cree que puede existir cierta especificidad de subtipos por determinados hospedadores, aunque probablemente mediada por las relaciones establecidas con el resto del ecosistema intestinal, que ejercen la selección y eliminación natural de este microorganismo.

Al igual que otros protistas intestinales, se adquiere a través de la vía fecal-oral a partir de agua o alimentos contaminados con quistes o esporas, o a partir del contacto directo con hospedadores infectados (200). Su infección es considerada por muchos autores una zoonosis, dado que ciertos animales funcionan como reservorio de algunos subtipos.

Actualmente es considerado el parásito intestinal más frecuentemente aislado en heces humanas, si bien habitualmente se contempla como un hallazgo incidental. Dependiendo de las series, se ha descrito hasta en un 100% de individuos muestreados (niños senegaleses) (201), aunque en general su prevalencia se establece en torno al 10-30% en países industrializados y al 30-75% en países empobrecidos (202), siendo más frecuente en adultos que en niños.

En el ser humano establece su localización a nivel distal del tracto gastrointestinal, a la altura del colon. La simple exposición a *Blastocystis* sp. no es suficiente para desarrollar la colonización estable, ya que la composición de la comunidad bacteriana intestinal juega un importante papel en su eliminación. No obstante, cuando tiene lugar una colonización humana estable ésta puede prolongarse por más de 10 años, y de este modo convertirse en un miembro estructural del ecosistema intestinal, modulando su composición y funcionalidad (203).

Su capacidad patogénica se ha relacionado con la forma vital ameboide. Este microorganismo carece de la habilidad de invadir la mucosa intestinal, y tampoco parece que tenga capacidad de adherirse a la pared epitelial. El principal factor de patogenicidad que se le conoce son las proteasas de cisteína y serina, que le otorgan la habilidad de ejercer efectos a distancia. Se cree que

la diferente expresión de esta enzima entre subtipos podría justificar las discrepancias en cuanto a las manifestaciones clínicas que se asocian a la infección (204). Estas proteasas permiten, por un lado, degradar las IgA secretoras del epitelio intestinal, y con ello evadir el sistema inmunitario (205), y por otro generar apoptosis epitelial (206). Además, se han relacionado tanto *in vitro* (207), como en modelo murino (208), con la capacidad del microorganismo para modular la expresión de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos, y de aumentar la permeabilidad de la barrera intestinal (209,210). Los motivos biológicos de esta lesión de la barrera intestinal en un microorganismo no invasivo de la mucosa están poco claros, pero estos autores creen que *Blastocystis* sp. podría modular al alza la expresión de estas proteasas en momentos específicos de su ciclo vital, para favorecer la secreción acuosa colónica y aumentar la transmisión fecal-oral de los quistes.

Con todo esto, en la actualidad se continúa debatiendo sobre el potencial patogénico de *Blastocystis* sp. en humanos, teniendo en cuenta que su presencia en heces no se asocia en la mayoría de los casos a ninguna manifestación clínica (203). Dado que no se ha podido demostrar de manera inequívoca su vinculación con patología intestinal, su papel como agente etiológico es todavía especulativo (211) y hay autores que lo consideran un elemento comensal más dentro del ecosistema intestinal. Asimismo, se ha apuntado a que diferentes subtipos del parásito pueden estar detrás de las diferencias en la virulencia y en la capacidad de generar o no manifestaciones clínicas (211); sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha todavía no han arrojado suficiente luz como para confirmar de manera consistente esta relación (202).

Es más, recientemente se ha instaurado una tendencia a considerar a *Blastocystis* sp. un factor beneficioso dentro del ecosistema intestinal, ya que los estudios de secuenciación de la microbiota intestinal muestran que su presencia se asocia con una mayor biodiversidad y mejor funcionalidad (212,213). Por otro lado, algunos autores han apuntado hacia un papel protector de este microorganismo frente a la obesidad (213-215) debido a que su presencia se asociaba inversamente al IMC en la población de estudio. No obstante, sería necesario definir la presencia de este microorganismo en el ecosistema intestinal del humano sano (mediante muestras recogidas de

manera aleatoria con un método molecular lo suficientemente sensible como para detectarlo), antes de poder establecer ningún tipo de relación causal (216).

1.2.2.3 *Dientamoeba fragilis*

Inicialmente clasificada como una ameba, actualmente se la considera un protozoo flagelado perteneciente al orden *Trichomonadida*. A este microorganismo unicelular no se le conoce forma de quiste, sólo de trofozoíto, que aparentemente es carente de flagelo (Figura 9). Su ciclo vital todavía no se conoce completamente.



Figura 9. Representación de *Dientamoeba fragilis*. Fuente: <https://www.certest.es/>

Pese a ser uno de los parásitos intestinales más ubicuos, es todavía muy desconocido, y durante décadas ha sido obviado en los estudios de colonización intestinal humana (217). Esto se explica, en parte, por las dificultades intrínsecas a su detección por técnicas tradicionales, ya que sus trofozoítos degeneran rápidamente fuera del organismo, de ahí el nombre que se le asignó. Sin embargo, en los últimos años ha visto muy incrementada su tasa de detección en heces humanas (218), gracias a las nuevas herramientas de diagnóstico molecular, que tienen una sensibilidad mucho mayor que la tinción en frotis.

Uno de los principales vacíos de conocimiento en torno a este microorganismo es su mecanismo de transmisión (219), aunque se considera que la vía de adquisición humana también es oro-fecal. Al compartir vía de colonización, se

asocia a la coinfección por otros parásitos intestinales, como *Blastocystis* sp. (220) o huevos de algunos helmintos, que se ha postulado que vehiculizarían y protegerían el trofozoíto hasta el hospedador humano (221).

Cuando parasita a nuestra especie el área de colonización intestinal es distal, a nivel del colon, que es el único medio en el que habita. Establece colonizaciones de larga duración gracias a la tolerancia del sistema inmunitario del hospedador, lo que le permite establecer relaciones estables con el resto del ecosistema intestinal. Si bien se le conocen mecanismos de patogenicidad, y al igual que ocurre con *Blastocystis* sp., su elevada prevalencia en sujetos sanos asintomáticos ha suscitado debate sobre su capacidad patógena en nuestra especie. Se desconoce con exactitud la frecuencia de sintomatología abdominal atribuible a su presencia.

1.2.3 Implicaciones clínicas de la colonización intestinal por unicelulares eucariotas

Las manifestaciones clínicas asociadas a la colonización intestinal por los microorganismos anteriormente expuestos han sido ampliamente descritas en la literatura de forma llamativamente heterogénea. En muchos casos podemos encontrar series que refieren una importante frecuencia de sintomatología abdominal y extra-abdominal, así como otros trabajos que reportan colonizaciones completamente asintomáticas asociadas a *Blastocystis* sp. Es por ello que, actualmente, existe un intenso debate sobre si se puede considerar a los parásitos unicelulares eucariotas como miembros comensales del ecosistema intestinal, o si siempre debieran contemplarse como patogénicos, y como tales ser erradicados (222).

Las parasitaciones intestinales por *G. intestinalis* se presentan con un amplio espectro clínico, desde las formas de disentería aguda o los cuadros de desnutrición crónica, hasta el extremo de encontrar colonizaciones completamente asintomáticas. La giardiosis humana también asocia síndromes de malabsorción de carbohidratos (223), de lípidos y de oligoelementos (B12, hierro, zinc) (194-196), y en niños en países en desarrollo es vista como causa de compromiso pondo-estatural y de menor desarrollo intelectual. Diversos factores han sido descritos como determinantes de esta variabilidad clínica, tanto dependientes de la virulencia del microorganismo (asociados a diferencias genéticas entre cepas (224)) como de la susceptibilidad individual del hospedador. No obstante, los mecanismos concretos son desconocidos.

Recientemente, se ha postulado la interrelación establecida entre *G. intestinalis* y otros componentes del ecosistema intestinal como explicación a la heterogeneidad clínica de la infección (225). Se cree que las comunidades bacterianas intestinales pueden modular la susceptibilidad del hospedador a la colonización por este parásito y, mediante la creación de un ambiente más proclive a su proliferación, determinar que ésta progrese hasta una infección clínicamente importante (226). Por otro lado, evidencias recientes (192,193) indican que algunas cepas concretas de *Lactobacillus* spp. ejercen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de trofozoítos de *G. intestinalis* y que reducen su potencial de enquistamiento, limitando la duración y la transmisibilidad de

la infección, y esto ha llevado a contemplarlas como una posible estrategia terapéutica.

Por su parte, a *Blastocystis* sp. se le han atribuido casos de diarreas graves en niños e inmunodeprimidos (tras haber descartado otros agentes infecciosos), así como todo tipo de clínica abdominal inespecífica, como flatulencias, dolor abdominal o incluso estreñimiento (209,216); también se le ha relacionado con clínica extraintestinal, siendo la más relevante la urticaria. No obstante, en la mayoría de los casos su presencia carece de relevancia clínica y en el humano no ha sido demostrada de manera inequívoca su vinculación con la enfermedad intestinal.

Por último, *D. fragilis* se ha relacionado con diferentes grados de patología intestinal, desde el dolor abdominal hasta la diarrea. No obstante, prácticamente desde su descubrimiento ha existido controversia entre la comunidad científica sobre su papel patogénico (227), persistiendo hoy en día la duda sobre si puede considerarse comensal dentro del ecosistema intestinal. Aunque se sabe que hay individuos colonizados que no presentan manifestaciones clínicas, algunos expertos consideran que la evidencia científica es suficiente como para considerarla patógena. Además, por su elevada prevalencia abogan por incluirla dentro del panel de agentes etiológicos en el estudio de los trastornos gastrointestinales, y por erradicarla si no se encuentra otra causa que los justifique (228).

Aunque las parasitaciones intestinales por protozoos sin capacidad invasiva sobre la mucosa pueden cursar clínicamente asintomáticas, existe un riesgo asociado a la presencia de estos microorganismos en la luz. Se trata de la acción expoliatrix que ejercen sobre las vitaminas y oligoelementos de origen dietético, que junto a la lesión epitelial que generan en vecindad, puede conducir a malabsorción y a su deficiencia nutricional en el hospedador. En este sentido, la colonización crónica por *G. intestinalis*, ubicada en el duodeno, se ha relacionado con déficit de vitamina B12 (229), de vitamina A (186), y del cofactor zinc (230,231), así como con niveles plasmáticos más altos de cobre (230). La ubicación intestinal más distal de *Blastocystis* sp. y de *D. fragilis* hace mucho más improbable que puedan alterar la absorción de vitaminas y oligoelementos, aunque algún estudio caso-control puntual ha apuntado a lo contrario (niveles plasmáticos de magnesio más bajos (232)).

Por otro lado, mucho se ha escrito sobre la posible relación de los protozoos intestinales con el desarrollo de patologías intestinales crónicas, como la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome de intestino irritable. Los datos disponibles en la literatura al respecto hasta la fecha no siempre son concluyentes. En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, hay evidencias que sugieren que la colonización por algunos protozoos intestinales se asocia a menores incidencias de esta enfermedad (posible factor protector). Contrariamente, se ha descrito una mayor prevalencia de colonización por *Blastocystis* sp. en sujetos con algunos subtipos de síndrome de intestino irritable (233,234) y, si bien no se puede establecer ninguna relación causal, se ha sugerido que la presencia del protozoo juega un papel en el desarrollo de la sintomatología intestinal. No obstante, esta asociación está lejana a ser consistente, dado que también encontramos trabajos publicados que no son capaces de confirmar una mayor prevalencia de *Blastocystis* sp. en sujetos con el síndrome (235-237), o que incluso refieren una relación inversa entre la colonización y la clínica intestinal (203,238).

Para acabar, la presencia de *G. intestinalis* también se ha correlacionado con trastornos intestinales funcionales, como las alergias alimentarias (239) o la malabsorción de fructosa valorada por test de hidrógeno espirado (240), un trastorno funcional intestinal muy frecuente que podría ser reversible con la erradicación del parásito.

1.2.4 Respuesta inmunitaria del hospedador frente a la colonización por unicelulares eucariotas

La infección por organismos unicelulares patógenos desencadena una respuesta inmunitaria destinada a activar los mecanismos inflamatorios y prooxidantes de defensa. En el caso de las parasitaciones por protozoos, esta respuesta es altamente dependiente de la de tipo celular, tanto innata (centrada en el papel del macrófago) como adquirida (centrada en los linfocitos T *helper*). Para desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada es preciso un fino equilibrio entre sus componentes, destinado a lograr la contención de la infección protozoaria (reduciendo la carga parasitaria y evitando así la infección invasiva), así como impedir el daño tisular derivado del exceso de estimulación inmunitaria.

La respuesta inmunitaria es un proceso complejo y coordinado, en el que participan multitud de estirpes celulares y de moléculas de intercomunicación celular. Por un lado, el sistema monocito-macrófago (componente crucial del sistema inmunitario innato) posee la habilidad de fagocitar a pequeños patógenos extracelulares y de activarse a través de la unión a sus receptores *toll like*. En este proceso las células de este sistema liberan un espectro de citoquinas proinflamatorias que, actuando sobre otras inmunitarias, incrementan a su vez la producción de citoquinas distintas y de óxido nítrico, y con ello desencadenan la cascada de estrés oxidativo que favorece la eliminación del parásito extracelular. Por su parte, los granulocitos neutrófilos participan en la respuesta oxidante defensiva y también contribuyen a la eliminación de patógenos extracelulares, principalmente bacterianos y helmínticos, pero también protozoarios (241).

Las células más importantes en la coordinación de la respuesta inmunitaria frente a protozoos (patógenos extracelulares) son los linfocitos T CD4+ (242), piedra angular del sistema inmunitario adquirido. Las células CD4+ son activadas por las células presentadoras de antígeno (macrófagos y dendríticas), desencadenando su proliferación clonal y desplazándose a los tejidos donde se encuentra el parásito para coordinar la respuesta defensiva. El ambiente de citoquinas presente en el lugar de la infección determina la polarización de la respuesta Th hacia uno de los tres fenotipos descritos: el Th1 (promovido por la IL-12 y el IFN- γ), el Th2 (suscitado por la presencia de IL-4 producida por

mastocitos, eosinófilos y basófilos activados) o el fenotipo Th17 (favorecido por la IL-23 e indirectamente por el TGF- β). Concretamente, la respuesta Th1 conduce a la producción de citoquinas como el IFN- γ o el TNF- α , que originan una cascada proinflamatoria que es la responsable de la eliminación de patógenos, fundamentalmente intracelulares. Por su parte, la respuesta Th2 (que tiene su máxima expresión en la lucha contra las infecciones helmínticas) suscita la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos específicos de isotipo IgE.

Finalmente, la respuesta inmunitaria propia de las infecciones frente a patógenos extracelulares es la de tipo Th17. Este subtipo de linfocitos es más frecuentemente encontrado en los tejidos mucosos, y se les atribuye un importante papel en el control de las infecciones intestinales. No obstante, es crucial que esta población mantenga un equilibrio con la del subtipo de linfocito T regulador (Treg), la cual a través de la IL-10 tiene la función de inhibir la respuesta inmunitaria y compensar las anteriores respuestas proinflamatorias, para de este modo mantener la homeostasis. Así, los Treg conducen a una reducción de la activación macrofágica y promueven el desarrollo del fenotipo M2 macrofágico, por lo que si esta respuesta está sobre-expresada puede favorecer la susceptibilidad del hospedador a las infecciones protozoarias invasivas.

A nivel intestinal, los Treg son las células que determinan la adquisición de inmunotolerancia frente a antígenos externos, derivados tanto de los alimentos como de las bacterias de la microbiota intestinal. La comunidad bacteriana intestinal puede influir en este sentido, condicionando la polarización de los linfocitos T y la respuesta inmunitaria intestinal, siendo determinante de la capacidad de cronificación de infecciones como la de *G. intestinalis*. De este modo, guardar un equilibrio entre Th17/Treg es importante para superar una situación de infección protozoaria y evitar su cronificación. De forma opuesta, el desequilibrio hacia un exceso de respuesta Th17 se ha relacionado con afecciones inflamatorias crónicas, como la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (243).

Por otro lado, los linfocitos de estirpe T CD8+ o citotóxicos (Tc) median gran parte de los efectos citotóxicos que ocurren en las infecciones por patógenos intracelulares, siendo responsables de la inmunopatología asociada a éstas. En

el caso de la giardiosis, son causantes de las alteraciones estructurales y funcionales del epitelio duodenal y yeyunal (acortamiento de las microvellosidades y pérdida de la capacidad disacaridasa) (177,242,244,245), que resultan reversibles tras eliminar la infección (170).

El papel de los linfocitos B como parte de la respuesta inmunitaria adquirida humoral en la lucha frente a parásitos intestinales es menos crucial que el de los anteriores, pero está implicada en la protección contra *G. intestinalis*. A través de la producción de anticuerpos específicos, favorecen la fagocitosis de los trofozoítos por macrófagos y neutrófilos peritoneales, y facilitan su lisis por el complemento. Estos anticuerpos se encuentran presentes en suero y en secreciones mucosas en forma de IgA secretora (246), donde actúan inhibiendo la adherencia de los trofozoítos a la mucosa. De este modo, se ha descrito que los sujetos con una menor capacidad de producción de esta molécula tienen tendencia a desarrollar giardiosis crónica (247). Por otro lado, en las respuestas inmunológicas con gran participación de eosinófilos (propias de la respuesta Th2 o de tipo alérgico) se produce un cambio fenotípico en los linfocitos B hacia la producción de inmunoglobulinas específicas de los isotipos E y G. Por este motivo, los niveles plasmáticos de IgE totales suelen estar aumentados en las helmintiasis, pero no así en las infecciones protozoarias. Sin embargo, sí se han detectado niveles de IgE más altos de lo habitual en humanos en el contexto de giardiosis (248), que revierten tras la erradicación de la colonización (249).

Atendiendo al resto de componentes celulares de la respuesta inmunitaria, los mastocitos cuentan con un papel clave en el control de las infecciones protozoarias como *G. intestinalis*, siendo reclutados en gran cantidad hacia el intestino delgado en este contexto (250). Por otro lado, la participación de eosinófilos en la respuesta inmunitaria frente a protozoos no es tan importante como frente a las infestaciones helmínticas, y no está bien aclarado su papel en la lucha contra estos parásitos; no obstante, se han escrito trabajos que asocian la eosinofilia con la presencia de *G. intestinalis* (251,252) o *D. fragilis* (253) y la infiltración eosinofílica del intestino delgado con la giardiosis (254).

Finalmente, cabe destacar que los protozoos parásitos han evolucionado a lo largo de la historia en estrecho contacto con sus hospedadores, lo que ha motivado su desarrollo de diferentes mecanismos de evasión o modulación

del sistema inmunitario humano, para de este modo prolongar su presencia en el hospedador. Éstos comprenden desde modificaciones en sus antígenos de superficie y mimetismo molecular, a la liberación de moléculas que modulan la respuesta inmunitaria del hospedador, provocando un viraje hacia una respuesta de anergia o de inmunosupresión (255).

1.2.5 Estrés oxidativo e inflamación sistémica asociadas a la colonización intestinal por unicelulares eucariotas

Las infecciones producidas por parásitos unicelulares eucariotas son una importante fuente de estrés oxidativo y de inflamación crónica (256-258), efectos derivados de la respuesta inmunitaria que se desencadena en el hospedador para combatir su proliferación (259,260). No obstante, la influencia de los parásitos intestinales microscópicos sobre el estado de óxido-reducción o balance redox y la inflamación sistémica del hospedador ha sido pobremente descrita en la literatura (261).

Pese a ello, hay datos que apoyan el hecho de que, incluso especies de microeucariotas que habitan en la luz intestinal y que son incapaces de penetrar en la mucosa, pueden generar inflamación a este nivel. Por un lado, se ha indicado previamente que *Blastocystis* sp. tiene la habilidad de alterar la función barrera de la mucosa colónica y de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias por los colonocitos y macrófagos de la mucosa (207)(208), lo que le otorga capacidad de modular las vías inflamatorias intestinales del hospedador. Por su parte, *G. intestinalis* también tiene capacidad de perturbar la barrera epitelial duodenal, si bien esto no se ha relacionado de manera clara con fenómenos de inflamación intestinal (262). Con todo, los efectos de estos dos parásitos eucariotas unicelulares sobre el estatus inflamatorio y redox a nivel sistémico no han sido todavía bien estudiados.

En línea con lo anterior, es destacable que una gran cantidad de estudios han ido orientados a establecer si existe relación entre la presencia de estos protozoos intestinales y la aparición de diferentes trastornos digestivos, como el síndrome de intestino irritable (209,220,263), una entidad clínica con etiología todavía poco clara. Si bien los resultados obtenidos arrojan informaciones contradictorias, un metaanálisis concluía que existía una correlación positiva entre la presencia de este trastorno funcional y la colonización (264). Por otro lado, se ha establecido que los pacientes con síndrome de intestino irritable presentan un incremento de permeabilidad de su barrera intestinal colónica (265); de existir colonización intestinal por estos microorganismos, por los mecanismos previamente expuestos éstos podrían facilitar la activación del sistema inmune de la mucosa intestinal subyacente, y

promover a este nivel la inflamación crónica de bajo grado, lo que justificaría los síntomas de algunos sujetos parasitados (266).

En este contexto, es razonable hipotetizar que los parásitos unicelulares eucariotas intestinales tendrían la capacidad de modular la situación inflamatoria y el balance redox sistémico de su hospedador. Como consecuencia, la señalización intercelular mediante citoquinas proinflamatorias se alteraría, y esto influiría en la regulación de las funciones de tejidos distales, como el adiposo blanco. Por lo tanto, la infección intestinal por los protozoos de interés de este estudio podría mediar cambios en la señalización en el tejido adiposo del hospedador obeso, favoreciendo el desarrollo de un fenotipo de *lipoinflamación* y modulando las funciones metabólicas fundamentales.

Para valorar la situación de estrés oxidativo sistémico de un sujeto, en el ámbito de la investigación actualmente se dispone de una amplia gama de biomarcadores. Entre ellos, se encuentran componentes del sistema antioxidante endógeno (como las vitaminas A, E y C) y ciertas moléculas y enzimas, cuyos niveles y actividades permiten interpretar la situación redox de un organismo eucariota. Entre estos encontramos:

- Niveles de malondialdehído (MDA): este compuesto se genera como resultado de la peroxidación lipídica celular, y es altamente tóxico para las moléculas orgánicas. Se emplea comúnmente como un biomarcador plasmático de daño oxidativo en células y tejidos.
- Niveles de glutatión (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG): en estado reducido, esta molécula es considerada como el principal agente antioxidante en las células eucariotas. Además, la relación GSH/GSSG se considera un buen indicador del estado redox en los seres vivos (267).
- Niveles de nitritos y nitratos en plasma (NOX): estos compuestos son productos finales estables del radical libre óxido nítrico (NO), y se utilizan con frecuencia como marcadores subrogados de éste. Sus niveles en fluidos biológicos reflejan la actividad de las NO-sintasas. Se producen en exceso durante la inflamación, debido a la sobreexpresión de la enzima NO-sintetasa inducible (iNOS), vinculando así el sistema redox con la respuesta inflamatoria (268,269)

- Superóxido Dismutasa 3 (SOD-3): esta enzima cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, tanto dentro como fuera de las células. Es la primera enzima implicada en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, y con ello mantiene los niveles de aniones superóxido dentro de rangos seguros, evitando el estrés oxidativo. Las situaciones de sobreproducción crónica de especies reactivas al oxígeno están relacionadas con una mayor expresión de esta enzima. Sus niveles se han correlacionado inversamente con el estado de obesidad (270).
- Capacidad Antioxidante Total en plasma (TAC): se considera la suma de todos los efectos de los antioxidantes individuales que están presentes en el plasma (a saber: vitamina A, vitamina C, carotenoides, glutatión, ácido úrico, etc.) Por lo tanto, se considera como el indicador biológico más relevante de la capacidad antioxidante de un organismo.

1.2.6 Concepto de infectoobesidad

En trabajos recientes el término *infectoobesidad* ha sido acuñado para describir el potencial papel patogénico ejercido por patógenos ambientales sobre el desarrollo de la obesidad (271-273). Sus defensores argumentan que la forma de expansión de esta enfermedad (con una afectación a nivel mundial y con semejante velocidad de progresión en las últimas décadas) asemeja epidemiológicamente a la de las enfermedades infecciosas, y abogan por considerar a un agente infeccioso como causa plausible.

En este sentido, diferentes agentes infecciosos han sido estudiados como determinantes del desarrollo de obesidad o de sus complicaciones cardio-metabólicas, fundamentalmente agentes virales como el Adenovirus-36, con algunos estudios epidemiológicos en humanos que apoyarían esta teoría. Están poco definidos los mecanismos por los que ejercerían los cambios en la adiposidad corporal, pero se contempla un posible efecto periférico sobre la diferenciación de los preadipocitos del tejido adiposo blanco, así como posibles repercusiones sobre las estructuras cerebrales de control del apetito y del balance energético (271,272).

La influencia que puedan tener los protozoos parásitos en este campo ha sido muy poco explorada. Se ha descrito un aumento de la prevalencia de obesidad en sujetos con serología positiva para la infección por *Toxoplasma gondii*, pero sin poderse probar ninguna relación causal (153). Por su parte, un estudio reciente (274) valoró la presencia de la infección latente por *T. gondii* en una población de obesos adolescentes, y describió que aquellos participantes con serología positiva para el parásito presentaban, de manera estadísticamente significativa, mayor prevalencia de síndrome metabólico, cifras de HOMA-IR más elevadas, peores índices antropométricos y peores parámetros de composición corporal. Estos datos podrían sugerir que este protozoo tuviera un papel en la patogénesis de la obesidad y en favorecer los trastornos metabólicos que se le asocian.

Respecto a los parásitos intestinales eucariotas, en la actualidad poco se sabe sobre el comportamiento que tienen en el hospedador que padece obesidad, en comparación con el hospedador con un IMC normal. Su presencia no está bien descrita en esta población y menos aún su influencia sobre el desarrollo

de la inflamación de bajo grado que le acompaña y que media el riesgo metabólico. Se postula, no obstante, que puedan ejercer efectos sobre el control de la homeostasis energética a nivel hipotalámico, sobre las funciones del tejido adiposo blanco o sobre diferentes rutas metabólicas.

1.3 Microbiota intestinal humana

1.3.1 Definición y composición de la microbiota intestinal

Bajo el término microbiota intestinal se engloba a todo el conjunto de microorganismos que habitan de manera simbiótica en el interior del intestino humano, configurando un ecosistema complejo con múltiples interacciones entre sí y con el hospedador, todavía no bien entendidas. La microbiota comprende a millones de organismos de muy diferente índole, incluyendo a bacterias, *Archaea*, hongos, virus, helmintos y protozoos. La mayoría de las especies ejercen una colonización permanente del intestino, mientras que una cantidad variable de microorganismos lo habitan de manera transitoria. Su abundancia relativa es altamente variable, y condicionada por multitud de factores externos.

La adquisición de esta microbiota intestinal comienza antes del nacimiento y se establece progresivamente durante los primeros años de vida, de forma modulada por factores ambientales, como la vía de nacimiento, el tipo de lactancia recibida o la introducción de alimentos en la dieta (275). De este modo, los microorganismos que se adquieren gradualmente constituyen una comunidad en el ecosistema intestinal, muy estable a lo largo del tiempo, extremadamente variable entre individuos y altamente específica de cada sujeto. La estructura (abundancia y diversidad) de la microbiota intestinal varía a lo largo del tracto digestivo, siendo determinada por factores como el pH, la presión parcial de oxígeno o la disponibilidad de nutrientes. La mayor cantidad y diversidad de microorganismos se alcanza en los tramos distales del intestino, a nivel del colon (276).

La composición del ecosistema intestinal adulto está determinada por multitud de factores ambientales dependientes del sujeto y de su estilo de vida, muchos de ellos todavía no bien comprendidos, entre los que se hallan la composición de la dieta habitual, la práctica de ejercicio físico, el hábito tabáquico, el uso de antibióticos y otros fármacos. Hasta la fecha, los estudios de la composición de la microbiota intestinal humana se han focalizado fundamentalmente en el componente bacteriano y *Archaea*, debido a que es cuantitativamente más abundante. De este modo, se ha descrito su composición y la abundancia relativa por diferentes niveles taxonómicos, tanto en humanos sanos como en

diferentes escenarios de enfermedad. Las bacterias que componen la microbiota intestinal humana pertenecen en su práctica totalidad a los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria y, en menor medida, Verrucomicrobia. Si bien se han relacionado ciertas alteraciones de la estructura del ecosistema bacteriano con patologías concretas, todavía no se han descrito los factores que determinan que un microbioma sea eubiótico (asociado a salud del hospedador) o disbiótico (asociado a patología). Es más, actualmente se prefiere ir más allá de la descripción taxonómica de las bacterias que configuran una microbiota, y en su lugar estudiar la composición metabolómica (conjunto de metabolitos producidos por un sistema biológico), que es considerado el aparato funcional de este órgano y determinante de su salud (277).

Por otro lado, el componente eucariota de la microbiota intestinal humana, denominado por algunos *eukarioma* y representado por protozoos y helmintos (excluyendo al componente fúngico), ha sido mucho menos estudiado en la literatura. No obstante, su descripción está suscitando un creciente interés (222,226,278) y en la actualidad se pretende conocer las implicaciones que ejerce su presencia sobre el sistema endocrino e inmunitario del hospedador. Se ha postulado (225,226) que los cambios producidos en las últimas décadas en la composición de la microbiota intestinal como consecuencia de las modificaciones en el estilo de vida occidental (entre las que destaca la práctica desaparición de parasitosis por helmintos y protozoos, la incorporación de alimentos procesados y el uso habitual de antibióticos), hayan provocado una alteración de la relación bidireccional establecida entre microbiota y hospedador. Una creciente cantidad de enfermedades han sido relacionadas en su patogenia con este fenómeno, entre las que se halla la obesidad (279-281). Como consecuencia, se ha empezado a contemplar la posibilidad de que las parasitaciones intestinales otorguen un posible efecto beneficioso sobre la homeostasis del ser humano.

1.3.2 *Función de la microbiota intestinal como un nuevo órgano*

Lejos de contemplarse como meros comensales, actualmente sabemos que los microorganismos que conforman la microbiota intestinal ejercen multitud de funciones beneficiosas para el hospedador humano, no totalmente conocidas. Tanto es así, que en la actualidad se la ha empezado a contemplar como un nuevo órgano metabólico, que ejerce funciones imprescindibles para conservar la salud del individuo (282).

Por un lado, la microbiota intestinal aporta una ingente cantidad de material genético, denominado el microbioma (283), que complementa a la que posee el hospedador humano y que le otorga capacidades metabólicas nuevas. Por ejemplo, es a través de esta comunidad bacteriana como tienen lugar los procesos de fermentación de polisacáridos no absorbibles y de síntesis de ácidos grasos de cadena corta (propionato, butirato, acetato) que sirven de sustrato energético al colonocito, y que contribuyen al mantenimiento de la función barrera intestinal. Este proceso se ha relacionado ampliamente con la regulación del balance energético en el hospedador, ya que conduce a un incremento del aprovechamiento energético de los alimentos contenidos en la dieta (47,284). Otra función metabólica ejercida por la microbiota intestinal que resulta imprescindible para el ser humano es la síntesis de ciertas vitaminas y de los ácidos biliares secundarios. Las moléculas resultantes de este metabolismo ejercen funciones de señalización celular en el hospedador que afectan, entre otros, al metabolismo glucídico, y que pueden modular la resistencia a la insulina (282).

Por otro lado, la microbiota intestinal ejerce funciones sobre el sistema inmunitario intestinal de maduración de clones de linfocitos Th y de inmunomodulación (285,286). Actualmente sabemos que estos microorganismos son necesarios para la expansión y la diferenciación de células inmunitarias de la mucosa intestinal, y que existen mecanismos moleculares (como la producción de ácidos grasos de cadena corta) por los cuales pueden modular a este nivel el equilibrio entre las respuestas Th17: Treg (287). Asimismo, se ha visto en el modelo de ratones libres de gérmenes que en ausencia de microbiota intestinal la respuesta Th17 está poco desarrollada, pero que esta circunstancia cambia al ser colonizados por bacterias de otros ratones (288). Por todo esto, se considera que la microbiota juega un papel

fundamental en mantener la inmunotolerancia y la homeostasis intestinal, mientras que la disbiosis puede desequilibrar estas respuestas hacia una mayor presencia de la de tipo Th17, y ello conducir a respuestas inflamatorias inadecuadas a nivel intestinal (243).

La microbiota también tiene un papel en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y consecuentemente en la regulación de la respuesta inflamatoria sistémica. En situaciones de disbiosis intestinal sostenida existe una pérdida de esta función de barrera y un aumento de permeabilidad al paso de componentes antigénicos intraluminales. Numerosos estudios se han centrado en demostrar cómo este fenómeno permite la translocación de lipopolisacáridos bacterianos, que pasan a nivel sistémico y condicionan un estado de inflamación de bajo grado a nivel de adipocitos blancos y macrófagos (289). Esta inflamación, a su vez, se asocia al desarrollo de obesidad, resistencia insulínica (290), enfermedades metabólicas y aterosclerosis sistémica acelerada (291), por lo que la composición de la microbiota intestinal influiría en el desarrollo de estos trastornos.

La capacidad de la microbiota intestinal para modular positivamente las funciones biológicas del hospedador está fuertemente ligada a su composición. En este sentido, resulta fundamental mantener en la comunidad bacteriana una adecuada diversidad de especies y un equilibrio entre filos, familias y géneros (292). Esta situación, conocida como *eubiosis*, se ha convertido en un nuevo objetivo terapéutico, aunque como se ha comentado, todavía no se dispone de criterios que la definan con claridad. Por el contrario, denominamos *disbiosis* al escenario en el cual se producen alteraciones cualitativas de la microbiota intestinal que conducen a la pérdida de sus funciones y, por tanto, a patología en el hospedador humano. Actualmente se habla de que entre la microbiota intestinal y el organismo pluricelular que la hospeda se establece una relación bidireccional, por la cual la composición de una puede influir sobre la homeostasis de la otra, a través de diferentes moléculas de señalización.

1.3.3 *Microbiota intestinal y obesidad*

La composición y función de la microbiota intestinal (es decir, el microbioma y el metaboloma) son contempladas como un factor ambiental que influye en la fisiopatología de la obesidad y de sus complicaciones metabólicas y cardiovasculares. Las evidencias que respaldan la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad derivan de los estudios realizados en Ratones Libres de Gérmenes (GFM), a los que se les trasplantó microbiota fecal de diferentes donantes y en los que se evaluaron los efectos sobre la masa grasa corporal.

El equipo de Gordon *et al.* fue el primero, en 2004, en sugerir un papel para la microbiota intestinal en la fisiopatología de la obesidad (293). Llegaron a esta conclusión tras comprobar que, ante la misma ingesta dietética, la ganancia de peso y de masa grasa de los ratones GFM era menor que la de aquellos que estaban colonizados por microbiota intestinal, y que en estos últimos existía una peor situación metabólica, con menor sensibilidad a la insulina y niveles más altos de leptina. También observaron que, tras el trasplante fecal de heces procedentes de los ratones estándar hacia los GFM, se reproducía en éstos la adiposidad y la situación de resistencia a la insulina. En un trabajo posterior, también indicaron que los GFM eran resistentes a la obesidad inducida por la dieta de tipo occidental, es decir, con alto contenido graso (294). Hallazgos igualmente relevantes en este campo fueron los aportados por el equipo de Turnbaugh *et al.* en 2006, ya que establecieron la base en la relación de causalidad entre la microbiota intestinal y la obesidad. Este equipo reprodujo cómo el trasplante de microbiota fecal de ratones genéticamente obesos a GFM con normopeso inducía en los segundos el fenotipo de obesidad y de resistencia a la insulina (295). Posteriormente, en otro trabajo llevado a cabo en individuos genéticamente idénticos, comunicaron que existían diferencias funcionales entre los microbiomas intestinales que estaban directamente relacionadas con la situación ponderal (280). El equipo de Gordon *et al.* complementó estos resultados con estudios de trasplante de microbiota intestinal humana sobre GFM, empleando heces procedentes de mujeres adultas gemelas pero discordantes para peso corporal. Indicaron que, cuando el trasplante provenía de la gemela con sobrepeso, se producía un aumento de la masa grasa del ratón, que no se provocaba cuando el trasplante provenía de la gemela con normopeso (296). De este modo, quedaba confirmada la

trasmisibilidad de la adiposidad corporal a través del intercambio de la microbiota intestinal.

Cuando se estudiaron las diferencias de composición de la microbiota intestinal entre sujetos obesos y con normopeso, la primera característica que se relacionó con la situación de obesidad fue la alteración del cociente entre los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Así, de manera bastante consistente en diferentes estudios, se identificó un aumento de la abundancia relativa del primer filo respecto al segundo, que era reversible tras los cambios nutricionales (279,297,298). Sin embargo, caracterizar un microbioma como eubiótico o no en base a esta característica aisladamente es excesivamente simplista, y actualmente cada vez se acepta menos como biomarcador de salud o enfermedad. Se ha visto que es más sólida la relación entre el desarrollo de obesidad y la pérdida de biodiversidad de las comunidades bacterianas del ecosistema intestinal (214). Menos claro es el papel que tiene la abundancia relativa de familias y géneros bacterianos sobre el desarrollo de los diferentes componentes del síndrome metabólico, dado que cada especie puede contribuir de manera diametralmente opuesta a la disbiosis intestinal, lo cual vuelve muy complejo el estudio del ecosistema en su conjunto (280,299,300). Especies bacterianas concretas con un reconocido papel beneficioso contra la obesidad (antiinflamatorio, productor de ácidos grasos de cadena corta) son, entre otras, *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii*, si bien su abundancia absoluta dentro de la biomasa intestinal es reducida.

En lo que se refiere a los cambios de funcionalidad, la disbiosis intestinal propia del obeso se ha relacionado con una mayor rentabilidad energética obtenida de los nutrientes de la dieta (295), con la alteración en la capacidad de síntesis de ácidos grasos de cadena corta a partir de la fermentación de carbohidratos (301,302), y con la alteración del perfil de ácidos biliares producidos.

Finalmente, como se ha venido comentando con anterioridad, la obesidad se ha asociado con un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, que favorece la traslocación de lipopolisacáridos bacterianos y la endotoxemia metabólica (105), y con los conocidos efectos deletéreos a nivel metabólico e inflamatorio.

1.3.4 *Trinomio microbiota intestinal, eucariotas unicelulares intestinales y obesidad*

Hasta la fecha, en la literatura hay poca información disponible respecto al papel de las colonizaciones protozoarias intestinales sobre la composición y estructura del ecosistema intestinal humano, así como sobre sus repercusiones sobre su homeostasis. Estos protozoos son relevantes microorganismos que, junto con los hongos levaduriformes, constituyen el componente unicelular del *eukarioma* intestinal (microeucariotas). Como se ha comentado en apartados anteriores, su presencia no ha sido claramente definida como patógena o comensal para nuestra especie, y se desconoce si los efectos que ejercen sobre la estructura de las comunidades bacterianas intestinales podrían ser responsables de parte de su patogenicidad. Por otro lado, es llamativa la falta de estudios centrados en describir el efecto que producen estas parasitosis sobre la microbiota intestinal en el contexto concreto del sujeto con obesidad.

En el caso de la colonización por *G. intestinalis*, uno de los parásitos intestinales microeucariotas más estudiados, se han descrito profundos cambios en la composición del microbioma humano asociados a su presencia. Multitud de estudios han indicado que este protozoo tiene el potencial de reconfigurar la estructura del ecosistema intestinal y causar una disbiosis que persiste incluso largo tiempo después de su erradicación (171,180,181). Por otro lado, se ha sugerido que la composición de la microbiota intestinal es determinante para la colonización por este microorganismo, ya que, al modular la susceptibilidad a la infección del hospedador, permite la progresión hasta una situación clínicamente relevante (225).

Respecto a *Blastocystis* sp., también se ha descrito que la composición del microbioma es factor clave para condicionar su colonización estable, ya que la sola exposición al parásito no es suficiente como para desarrollar la infección crónica. A diferencia de la anterior, las colonizaciones pueden prolongarse durante años, comportándose este microorganismo como un componente estable del ecosistema intestinal, con capacidad de modular su estructura (203,215). De este modo, y a la inversa que con el anterior microeucariota, la presencia de *Blastocystis* sp. como componente de la microbiota intestinal se ha asociado con un cambio cualitativo beneficioso: la mayor biodiversidad del

microbioma (212,213). Esto lo definiría más como factor de mantenimiento de la eubiosis que como causa de disbiosis (213-215).

Finalmente, muy poco se ha investigado sobre el impacto de la colonización por *D. fragilis* sobre la composición y función de la microbiota intestinal. En lo poco que se ha publicado, no se identificaron diferencias ni en la estructura ni en la diversidad del ecosistema intestinal asociadas a la presencia de este parásito (303).

1.4 Hipótesis de trabajo

En base a los antecedentes expuestos y a las lagunas de conocimiento existentes en la actualidad, se diseñó un estudio orientado a explorar la presencia de parásitos intestinales unicelulares eucariotas en una población de sujetos con obesidad grave, y a correlacionarla con una serie de parámetros metabólicos, inflamatorios, de estrés oxidativo y con la estructura y composición de la microbiota intestinal.

Se postuló que los microeucariotas que parasitasen de manera estable el intestino de sujetos obesos podrían inducir en éste cambios en la estructura de las comunidades bacterianas intestinales, así como una respuesta inflamatoria de bajo grado y de aumento del estrés oxidativo, que se reflejaría a nivel sistémico. Por lo tanto, la colonización sería capaz de modular la homeostasis del hospedador humano, y condicionar diferencias en la presencia de comorbilidades metabólicas.

2 *Objetivos*

2.1 Objetivo principal

El objetivo principal del estudio fue describir la prevalencia de colonización intestinal por microorganismos eucariotas unicelulares en una población de sujetos con obesidad grave, con intención de correlacionar su presencia con las variables de interés de la investigación, que fueron las siguientes: sintomatología abdominal, parámetros antropométricos, comorbilidades metabólicas, parámetros nutricionales, niveles de biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo, estructura y diversidad de la comunidad bacteriana intestinal.

2.2 Objetivos específicos

Además de describir la colonización intestinal referida, la investigación contemplaba recoger información sobre variables epidemiológicas, clínicas, antropométricas, nutricionales, analíticas y metagenómicas en la población de estudio. En base a esta información, el estudio perseguía alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer la prevalencia de colonización intestinal por los eucariotas unicelulares de interés en la población con obesidad grave estudiada.
2. Identificar los factores de riesgo epidemiológico más frecuentemente ligados a la colonización intestinal por microeucariotas parásitos.
3. Explorar las diferencias en la sintomatología abdominal referida entre subgrupos de participantes (atendiendo a la presencia de colonización intestinal).
4. Explorar las diferencias en composición corporal, medida mediante bioimpedancia eléctrica, entre subgrupos de participantes (atendiendo a la presencia de colonización intestinal).

Objetivos

5. Explorar las diferencias en prevalencia de comorbilidades metabólicas asociadas da la obesidad, valoradas de manera clínico-analítica, entre subgrupos de participantes (atendiendo a la presencia de colonización intestinal).
6. Explorar las diferencias en la prevalencia de déficits nutricionales específicos entre subgrupos de participantes (atendiendo a la presencia de colonización intestinal).
7. Analizar los niveles de biomarcadores de inflamación sistémica y correlacionarlos con la presencia de colonización intestinal.
8. Analizar los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo sistémico y correlacionarlos con la presencia de colonización intestinal.
9. Describir la diversidad alfa y beta de la microbiota intestinal y correlacionarla con la presencia de colonización intestinal.
10. Establecer diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas que conforman la microbiota intestinal en función de la presencia de colonización.
11. Valorar cuantitativa y cualitativamente la composición de la dieta de los sujetos de estudio y correlacionarla con la presencia de colonización intestinal por microeucariotas, con diferencias en la estructura de la microbiota intestinal y con los biomarcadores de estrés oxidativo sistémicos.

3 *Material y métodos*

3.1 Diseño del estudio

La presente Tesis Doctoral consistió en un estudio descriptivo y transversal sobre sujetos, en su mayoría obesos grado III (IMC >40 kg/m²), junto con un pequeño grupo de obesos grado II (IMC >35 kg/m²) con comorbilidades metabólicas significativas, los cuales eran atendidos en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España) como posibles candidatos a recibir una cirugía bariátrica.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe en mayo de 2018, con código de identificación del proyecto 2017/0486, respetando los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki y del Convenio del Consejo de Europa en relación con los Derechos Humanos y la Biomedicina de la Declaración de la UNESCO (Anexo B. Documentos de aprobación del comité ético del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe).

El reclutamiento de participantes comenzó en agosto de 2018 y se prolongó hasta febrero de 2020. En este momento se dispuso de 104 sujetos que cumplían los criterios de inclusión en el estudio, y que habían aceptado participar en el proyecto. Se obtuvo el consentimiento informado de todos ellos, tras haber recibido información sobre los objetivos, riesgos e implicaciones de su participación, y sobre la confidencialidad con la que se manejarían los datos (Anexo C. Documento de información al paciente y Anexo D. Documento de consentimiento informado).

3.2 Población de estudio

Se ofreció la inclusión en el estudio a todo paciente con obesidad que cumpliera los siguientes criterios de inclusión, considerados habitualmente como prerrequisito para la cirugía bariátrica:

- Edad entre 18 y 65 años.
- Presentar IMC >35 kg/m² en coexistencia con comorbilidad significativa o bien IMC >40 kg/m² sin comorbilidad.
- Ausencia de pérdida de peso sostenida con medidas no quirúrgicas en el seguimiento.

Asimismo, se aplicaron los siguientes criterios generales de exclusión:

- Diagnóstico reciente (en los 5 años previos) de enfermedad oncológica o presencia de enfermedad oncológica activa.
- Enfermedades intestinales inflamatorias o autoinmunes crónicas.
- Intervenciones quirúrgicas previas que supusieran una alteración en la dinámica de secreción de fluidos intestinales.

En lo que respecta al estudio de la composición de la **microbiota intestinal**:

- Se registró la presencia de factores de confusión, descritos como asociados a cambios en la estructura y función de la microbiota intestinal: uso habitual de inhibidores de la bomba de protones, tabaquismo activo, infección activa por *H. pylori* y antecedente de colecistectomía.
- Se añadió como criterio de exclusión el antecedente de toma de antibiótico por vía oral o parenteral en las 6 semanas previas a la recogida de heces.

En lo que respecta a los resultados de **parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo**:

- Se excluyó a aquellos sujetos que presentasen un trastorno inflamatorio crónico sistémico.
- Se excluyó a los pacientes con cualquier tratamiento sistémico con glucocorticoides o inmunosupresores de cualquier tipo durante los 30 días previos a las extracciones sanguíneas.

3.3 Valoración clínica y epidemiológica

Todos los participantes del estudio mantuvieron al menos dos visitas con el equipo investigador, en las que participábamos una titulada en Nutrición y Dietética y una médica especialista en Endocrinología y Nutrición. Durante estas visitas, a través de una exhaustiva anamnesis se recogió información sociodemográfica, clínica y epidemiológica relevante para el estudio.

Con intención de identificar las posibles vías de transmisión de los parásitos intestinales estudiados, se interrogó a los pacientes al respecto de la exposición a fuentes comunes de parasitación en nuestro medio, y que han sido aceptadas como vehículo de este tipo de microorganismos (304). Dado que la transmisión fecal-oral es la principal vía de adquisición de estas infecciones, se recopiló información sobre los siguientes aspectos: consumo de agua sin potabilidad confirmada (obtenida de pozos propios o de fuentes no tratadas); ingestión regular de alimentos considerados ecológicos (es decir, procedentes de huertos propios o de pequeños cultivos no tratados con pesticidas y abonados con excretas animales); estancia reciente (en los últimos 5 años) en un país endémico para este tipo de parasitosis; ocupación profesional de riesgo (aquellas que implican contacto directo con humanos o animales y sus excretas); contacto regular con niños menores de 10 años; y presencia habitual de mascotas no desparasitadas en casa.

Asimismo, se registró información sobre la clínica gastrointestinal de los participantes a través de cuestionarios estandarizados, cubriendo los siguientes

aspectos: frecuencia deposicional diaria; consistencia habitual de las heces según la Escala de Heces de Bristol (BSS) (305); evaluación subjetiva del grado de dolor, distensión abdominal y flatulencias de aparición habitual tras las comidas: se empleó para ello una escala analógica visual (de 0 a 10); y diagnóstico previo o percepción subjetiva de intolerancias alimentarias específicas.

Adicionalmente, se recogió información sobre el consumo habitual de fármacos y de suplementos vitamínicos, así como sobre la presencia de comorbilidades asociadas a la obesidad. Se valoraron tanto las comorbilidades generales como, más concretamente, las de tipo metabólico, incluyendo las siguientes: hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DT2) o prediabetes, dislipidemia (en cualquier forma) e hiperuricemia. Se diagnosticó a los pacientes con síndrome metabólico según los criterios establecidos por el NCEP-ATP III (54). Finalmente, se registró cualquier antecedente de evento trombotico o cardiovascular, de enfermedad crónica respiratoria, hepática o renal.

3.4 Valoración dietética y nutricional

Por sus antecedentes, todos los participantes en el estudio se encontraban bajo la recomendación de seguir una dieta hipocalórica estándar, definida como un aporte calórico entre 20-25 kcal/kg de peso total/día (306) y habían recibido consejos dietéticos por parte del personal sanitario para asemejarla lo más posible al modelo de dieta mediterránea.

Además, se alentó a los participantes que estaban cerca de la cirugía bariátrica a introducir progresivamente sustitutos de comida comerciales hipocalóricos-hiperproteicos, para intensificar la pérdida de peso antes de la intervención. Con este fin, se prescribieron los productos *Optisource*® (Nestlé Health Science, Vevey, Suiza) o *Vegestart Complet*® (Vegenat Health Care, Badajoz, España).

Para evaluar la calidad habitual de la dieta al ingreso en el estudio, cada participante rellenó los siguientes dos cuestionarios:

- Cuestionario corto de 14 ítems de adherencia a la dieta mediterránea, que ha sido validado en población española y utilizado por el grupo PREDIMED (307) (Anexo E. Cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea). Permite obtener una puntuación numérica del 0 a 14 puntos, considerándose que el sujeto es adherente a la dieta mediterránea si obtiene un resultado ≥ 10 .
- Registro dietético de cinco días: tres entre semana y dos de fin de semana (Anexo F. Documento de registro dietético). A partir de la información de estos registros, se empleó el software validado DIAL® (308) para evaluar la composición nutricional de la dieta y para estimar la ingesta diaria de macro y micronutrientes. Se consideró si los participantes satisfacían o no las necesidades nutricionales diarias de nutrientes aplicando los puntos de corte internacionalmente aceptados (309). También se calculó, mediante este mismo software, la ingesta diaria de los siguientes nutrientes antioxidantes para cada participante: vitamina A, vitamina C, vitamina E, ácidos grasos omega 3 y omega 6, selenio, cobre, zinc y manganeso.

3.5 Valoración antropométrica y de composición corporal

Todas las mediciones antropométricas se llevaron a cabo por la mañana y tras un ayuno nocturno de 8 horas. Se obtuvo la altura de los sujetos empleando el mismo tallímetro de pared calibrado, y se registraron los resultados ajustándolos al 0,5 cm más cercano. El peso corporal se midió mediante la misma báscula electrónica calibrada, estando los participantes en ropa ligera y sin zapatos, y se ajustó al 0,1 kg más cercano. La circunferencia de la cintura se registró siguiendo las recomendaciones de Sociedad Americana de Nutrición Parenteral y Enteral (ASPEN) (310), esto es: utilizando una cinta métrica no extensible, a la altura del abdomen donde se registraba un mayor perímetro, al final de una expiración normal, y con el paciente de pie. El IMC se calculó como peso en kg/altura en m².

En el actual estudio se empleó para el análisis de composición corporal la báscula InBody 770® (Biospace Co., Ltd., Seúl, Corea) (Figura 10). Se trata de un dispositivo de bioimpedancia eléctrica multifrecuencia (1 kHz, 5 kHz, 50 kHz, 250 kHz, 500 kHz, 1000 kHz) y de análisis segmentario (5 segmentos corporales: brazo derecho, brazo izquierdo, tronco, pierna derecha, pierna izquierda), y su desarrollo es relativamente reciente. A diferencia de dispositivos anteriores, los cálculos mediante los cuales obtiene las estimaciones sobre composición corporal no se basan en datos estadísticos de poblaciones específicas y ha demostrado su validez en los cálculos de la composición corporal en sujetos con obesidad grado II y III (311,312).

Este dispositivo emplea ocho electrodos de contacto, dos posicionados en la palma y dedo pulgar de cada mano, y dos en las plantas de los pies: uno en la parte frontal y el otro en el talón. La exploración tiene lugar con el paciente descalzo y en ortostatismo.



Figura 10. Dispositivo InBody 770 ©. Fuente: [https:// equipomedico.com./](https://equipomedico.com/)

Las exploraciones de los participantes por impedancia bioeléctrica fueron realizadas después de un ayuno de al menos 3 horas, y en una fecha alejada menos de un mes del momento de recogida de las muestras fecales y del análisis bioquímico. De cada paciente se registraron los siguientes parámetros, obtenidos a partir de la estimación realizada por el dispositivo referido: peso, masa grasa, masa libre de grasa, masa muscular esquelética, agua corporal total, agua intra y extracelular, ángulo de fase y área de grasa visceral.

3.6 Valoración de la enfermedad hepática

Es bien sabido que la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es casi universal entre las personas con obesidad mórbida. Para evaluar su presencia y estratificar la gravedad, técnicos de radiología realizaron ecografías hepáticas que obtuvieron imágenes que fueron catalogadas en cuatro categorías: ausencia de esteatosis hepática; esteatosis leve; esteatosis moderada; y esteatosis grave.

En aquellos pacientes catalogados ecográficamente como positivos para EHGNA se realizaron tests bioquímicos no invasivos con el fin de identificar a aquellos en riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Para ello, se utilizaron los siguientes cuatro índices validados: índice de proporción de aspartato aminotransferasa a plaquetas (APRI) (313), puntuación de fibrosis NAFLD (314), FIB-4 (315) y Hepamet Fibrosis Score (316), el más recientemente desarrollado.

3.7 Análisis de las muestras fecales

3.7.1 Obtención y procesado de las muestras

Las muestras fecales fueron recogidas después de un periodo mínimo de 6 semanas en ausencia de tratamiento antibiótico por vía oral o parenteral.

Cada paciente aportó tres muestras de heces, que fueron recogidas en días no consecutivos, almacenadas en recipientes REAL MiniSystems con fijador Total-fix (Durviz, Valencia, España) y conservadas refrigeradas a una temperatura de 4° C.

Una vez entregadas, se procedió a su filtrado y doble concentración por centrifugación en tubos comerciales Midi Parasep® (Apacor®).

3.7.2 Análisis parasitológico mediante técnicas moleculares

A partir de 200 µL del concentrado fecal se obtuvo el ADN total empleando el QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la detección e identificación de los parásitos intestinales de interés se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) en tiempo real multiplex mediante el ensayo Allplex GI-Parasite Assay (GIPPA) (Seegene, Seúl, Corea del Sur) (155,317,318). Este panel tiene como diana los genes que codifican la subunidad menor del ARN ribosómico *16S* de los siguientes 6 parásitos protistas humanos: *Giardia intestinalis*; *Entamoeba histolytica*; *Cryptosporidium* spp.; *Blastocystis* sp.; *Dientamoeba fragilis* y *Cyclospora cayetanensis*.

La PCR se realizó en el sistema en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia), y se gestionó con el software CFX Manager IVD 1.6, para un volumen de reacción de 25 µL, que contenía una mezcla de reacción de 20 µL (5 µL Primers Mom, 5 µL Anyplex PCR MM (EM2), 8 µL de agua ultrapura libre de DNasa/RNasa y 2 µL de control interno) y 5 µL de ADN. En cada ensayo se incluyeron controles negativos (agua destilada libre de

DNasa/RNasa) y positivos (proporcionados por el fabricante para cada una de las especies).

Los resultados se analizaron utilizando el software Seegene Viewer V3, optimizado para ensayos multiplex. Las muestras se consideraron positivas para parásitos específicos si el umbral del ciclo (Ct) era de ≤ 43 ciclos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.7.3 Análisis metagenómico de la comunidad bacteriana intestinal

El análisis metagenómico se llevó a cabo a partir del ADN bacteriano obtenido de las muestras fecales recogidas. Dicho análisis fue realizado por el Servicio de Secuenciación y Bioinformática de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).

El procedimiento llevado a cabo por FISABIO se muestra a continuación:

- Análisis del gen bacteriano que codifica para la fracción *16S* del DNA ribosómico, de acuerdo con un protocolo específico (Illumina MiSeq 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation protocol, Cod. 15044223 Rev. A). El par de cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa fue el sugerido por Klindworth et al. (319). Para iniciar el protocolo se empleó ADN genómico bacteriano (5 ng/ μ L en 10 mM Tris pH 8.5).
- Después de la amplificación del gen *16S* rDNA, el mutiplexing se realizó utilizando Nextera XT Index Kit (FC-131-1096). 1 μ L del producto obtenido se analizó en un chip Bioanalyzer DNA 1000 para verificar el tamaño esperado (~ 550 pares de bases) tras lo cual se procedió a la secuenciación utilizando una ejecución de extremo pareado de 2x300 pb (Kit de reactivo MiSeq v3 (MS-102-3001)) en un secuenciador MiSeq, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina).
- La evaluación de la calidad de la muestra se realizó mediante el uso del programa “Prinseqlite” (320), aplicando los siguientes parámetros:

min_length: 50; trim_qual_right: 30; trim_qual_type: media;
trim_qual_window: 20.

- La evaluación de la meta-taxonomía se realizó utilizando algunos de los complementos QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology). El denoising, la unión de extremos pareados y el agotamiento de quimeras se realizaron a partir de datos de extremos pareados utilizando la tubería DADA2 (321).
- Las afiliaciones taxonómicas se asignaron utilizando el clasificador bayesiano integrado en los complementos qiime2. La base de datos utilizada para esta asignación taxonómica fue la SILVA_release_132 (322). Los datos de secuencia se analizaron utilizando la tubería QIIME2, como se citó originalmente en el artículo de Caporaso (323). Las secuencias están disponibles en el repositorio público siguiente: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB51819>, número de acceso ERA10729632 (fecha de depósito 25/03/2022).

Sobre los resultados metagenómicos obtenidos tras el anterior protocolo, se procedió a analizar una serie de parámetros en cada muestra. En primer lugar, los índices de alfa y beta diversidad:

- Índices de alfa diversidad: el índice Chao1 evalúa la riqueza bacteriana dentro de una comunidad, mientras que el índice de Shannon evalúa la diversidad de una comunidad bacteriana basándose en la distribución de la abundancia de taxones dentro de una muestra.
- Índices de beta diversidad: índice de Sorensen e índice de Jaccard. Son los más utilizados en ecología y evolución, expresan la similitud o disimilitud de la composición de la comunidad microbiana entre dos muestras. A partir de estos datos se obtienen los análisis de coordenadas principales (PCoA), representación gráfica de las diferencias en la arquitectura de la estructura bacteriana.

En segundo lugar, se exploraron las diferentes categorías taxonómicas, describiendo las siguientes abundancias relativas:

- Abundancia relativa de los principales filos intestinales humanos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria
- Relación entre los filos Firmicutes/Bacteroidetes.
- Abundancia relativa de géneros que se describen como de efecto beneficioso sobre el hospedador (301,324-327): *Akkermansia* spp., *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp.
- Ratio entre los géneros *Bacteroides* spp. /*Prevotella* spp., cuyas abundancias relativas suelen estar inversamente correlacionadas (328,329).
- Ratio entre los géneros *Faecalibacterium* spp. /*Escherichia* spp., que se ha utilizado anteriormente como índice de disbiosis causada por parásitos microeucariotas (181).

3.8 Análisis de las muestras sanguíneas

3.8.1 Obtención, procesamiento y parámetros analizados

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas después de un ayuno nocturno de 8 horas, el mismo día que se obtuvieron las muestras fecales. Se recogieron las muestras de sangre en una situación de estabilidad clínica y con el participante asintomático para quejas inflamatorias o infecciosas.

A todos los participantes del estudio se les determinaron una serie de parámetros generales como parte de la práctica clínica habitual, realizados en el laboratorio de bioquímica y hematimetría del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Se analizaron los siguientes parámetros:

- Hemograma: recuento absoluto de leucocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos. La eosinofilia se ha descrito en algunas parasitosis intestinales, como la dientamoebosis y la giardiosis (253) y está relacionada con la urticaria crónica, que es un síntoma de blastocistosis (330).
- Parámetros metabólicos y nutricionales: glucosa, HbA1c, insulina, péptido C, leptina, creatinina, tasa de filtración glomerular, ácido úrico, colesterol total, triglicéridos, HDL-colesterol, LDL-colesterol calculado, transaminasas (GOT, GPT), proteínas viscerales, índice de saturación de la transferrina, sideremia, calcio, fósforo, magnesio, hormona paratiroidea (PTH) y vitaminas A, E, D, folato y B12. En un pequeño porcentaje de pacientes también se recogieron los niveles plasmáticos de los oligoelementos cobre y zinc.
- Parámetros marcadores inespecíficos inflamatorios: proteína C reactiva (fase aguda inflamatoria), ferritina y ceruloplasmina.
- Parámetros de la respuesta inmunitaria humoral: se evaluaron los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas A (IgA) y E (IgE). La IgA es la inmunoglobulina capaz de ser secretada en fluidos, y por ello la responsable de la inmunidad de piel y mucosas; se ha utilizado como herramienta diagnóstica en giardiosis (331,332). Por su parte, los

niveles plasmáticos de IgE pueden verse modificados de forma específica por reacciones alérgicas o en asociación con la infección por parásitos intestinales (333), y también se han descrito como aumentados en la giardiosis humana (239,248,249).

El resto de los parámetros bioquímicos se analizaron por la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Fe. Para ello, las muestras se preservaron usando heparina como anticoagulante y se procesaron en la hora siguiente a su obtención. Se centrifugaron durante diez minutos a 800x G para aislar la capa superior de plasma amarillo, el cual se almacenó a -80 °C para su análisis ulterior.

3.8.2 Análisis de citoquinas plasmáticas y de marcadores de estrés oxidativo

Para el estudio de parámetros inflamatorios se analizaron en el laboratorio los niveles en plasma de tres las principales citoquinas proinflamatorias humanas: IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Para ello, se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando kits comerciales específicos para cada una de ellas (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, EEUU). El ELISA se realizó en una placa Corning™ Costar™ 9018 de 96 pocillos, siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió por densidad óptica a 450 nm en el iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad®, California, USA.). Los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se expresaron como pg/mL.

De forma similar, se estudiaron los niveles de ciertos biomarcadores utilizados con frecuencia para evaluar el estado de óxido-reducción o redox sistémico, como son: niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA), relación en plasma entre el glutatión en estado reducido (GSH) y en estado oxidado (GSSG), niveles de nitritos y nitratos en plasma (NOX); actividad plasmática de la enzima superóxido dismutasa-3 (SOD-3); y capacidad antioxidante total en plasma (TAC).

El malondialdehído, el GSH y el GSSG se midieron mediante el método de cromatografía líquida de ultrarrendimiento con monitorización de reacciones múltiples-espectrometría de masas (334) utilizando un sistema ACquity UPLC

(Waters) equipado con una columna Acquity UPLC HSS T3 (1,8 μm , 2,1 mm X 100 mm; Waters). El análisis de espectrometría múltiple se realizó utilizando un espectrometro de masas Waters Xevo TQ-XS con una fuente de ionización por electropulverización, que funciona en el modo de ionización positiva. Los resultados se expresaron como concentración plasmática en ng/mL.

Los metabolitos del óxido nítrico (NOX), se determinaron en plasma mediante la reacción espectrofotométrica de Griess, utilizando nitrato reductasa. Los niveles vienen expresados en μM .

La actividad de la enzima SOD-3 del líquido extracelular (independiente del tipo -Cu /Zn, Mn, Fe-) y la TAC se midieron con un kit comercial específico (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) siguiendo los protocolos establecidos por el fabricante. Los ensayos colorimétricos enzimáticos se realizaron en una placa de 96 pocillos, y la absorbancia medida por densidad óptica en el lector de absorbancia de microplacas iMark™ (Bio-Rad®, California, USA) a 450 nm para SOD-3, y 750 nm para la TAC. La actividad de SOD-3 se expresó como U/mL y la de la TAC como mM.

3.9 Análisis estadístico

Se obtuvieron resultados preliminares de prevalencia de colonización intestinal por los microeucariotas de en torno al 50% en la población de estudio. Basándonos en esta estimación y estableciendo un nivel de significación $\alpha=0,05$, se calculó que era necesario un tamaño muestral de 100 sujetos para alcanzar una potencia estadística del 80% en los subsecuentes análisis que correlacionaban la colonización con las variables de interés.

Los datos obtenidos se muestran en la sección de resultados como frecuencia absoluta (%) en las variables cualitativas, y en las variables cuantitativas como media (desviación estándar) e aquellas de distribución normal y mediana (1° y 3° cuartil) en las de distribución no normal. La normalidad de los datos se valoró mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R, 4.0 versión (335). Para comparar las diferencias entre grupos se emplearon los siguientes tests estadísticos: prueba Chi^2 para variables cualitativas; para variables cuantitativas la prueba paramétrica de la T en la comparación de dos grupos y el test de ANOVA cuando se compararon más de dos grupos, y para las no paramétricas el test de Wilcoxon (Wilcoxon rank sum test) con corrección de continuidad. Los modelos de regresión lineal se emplearon para correlacionar los resultados de los biomarcadores redox con las variables continuas de interés.

Se consideró un valor $p < 0,05$ como indicativo de significación estadística en todas las comparaciones.

4 Resultados

4.1 Descripción de la población de estudio

Se incluyeron datos de 104 sujetos: 65 mujeres y 39 hombres. La edad media de la población estudiada fue de 47,8 ($\pm 10,4$) años.

Atendiendo a la nacionalidad, 91 pacientes eran españoles, siendo el resto: colombiana (4), búlgara (2), alemana (1), dominicana (1), rumana (1), hondureña (1), venezolana (1) y salvadoreña (1).

4.2 Resultados parasitológicos

4.2.1.1 Prevalencia de colonización intestinal por unicelulares eucariotas

Cincuenta y tres muestras (51%) fueron positivas para la presencia de parásitos al analizarlas mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La especie más frecuentemente hallada fue *Blastocystis* sp., con una prevalencia del 44,2%, seguida de *D. fragilis* (11,5%) y *G. intestinalis* (8,7%). Ninguno de los pacientes fue positivo para el resto de protozoos incluidos en el análisis: *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis*. Se detectó colonización intestinal por más de una especie en 14 pacientes, principalmente colonización mixta por *Blastocystis* sp./*D. fragilis* (7,6%), o *Blastocystis* sp./*G. intestinalis* (4,8%), y un caso de colonización por tres especies parásitas: *Blastocystis* sp., *D. fragilis* y *G. intestinalis*. Estos datos se encuentran resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Prevalencia de colonización intestinal general y colonización múltiple.

Especies parásitas	Positivos N	Prevalencia (%)
Colonización general	53	51,0%
<i>Blastocystis</i> sp.	46	44,2%
<i>D. fragilis</i>	12	11,5%
<i>G. intestinalis</i>	9	8,7%

Colonizaciones múltiples	14	13,5%
<i>Blastocystis</i> sp. + <i>D. fragilis</i>	8	7,6%
<i>Blastocystis</i> sp.+ <i>G. intestinalis</i>	5	4,8%
<i>Blastocystis</i> sp.+ <i>D. fragilis</i> + <i>G. intestinalis</i>	1	0,9%

4.2.1.2 Relación con la exposición a factores de riesgo parasitológico

El análisis de los factores de riesgo parasitológico analizados reflejó los siguientes resultados: el 34% de sujetos afirmó comer regularmente verduras y frutas cultivadas orgánicamente (sin usar productos químicos, pesticidas o fertilizantes industriales, y probablemente utilizando excrementos animales como fertilizantes naturales), obtenidos de su propio cultivo o de pequeños productores (Tabla 4); el 10,7% de pacientes había viajado recientemente a una zona endémica para la colonización por los parásitos analizados; y el 6,8% admitió haber presentado recientemente ingestión de agua sin garantía de potabilidad (fuentes no públicas y sistemas de agua privados). Además, el 18,4% de sujetos había estado expuestos a excrementos humanos como consecuencia de sus ocupaciones profesionales diarias. El contacto regular con niños y mascotas en la población que albergaba parásitos intestinales fue tan alto como 56,3% y 71,8%, respectivamente.

Tabla 4. Frecuencia de exposición a factores de riesgo parasitológico.

Factores de riesgo	Prevalencia	N.º sujetos
<i>Alimentación ecológica</i>	34,0%	35
<i>Fuentes de agua no públicas o privadas</i>	6,8%	7
<i>Viaje a país endémico</i>	10,7%	11
<i>Contacto con niños</i>	56,3%	85
<i>Contacto con mascotas</i>	71,8%	74
<i>Exposición profesional</i>	18,4%	19

El análisis de la relación entre estos hábitos y la presencia de parásitos reflejó que los pacientes colonizados eran aquellos con una significativamente mayor frecuencia de consumo de productos ecológicos (43,4 vs. 24,0%, $p=0,038$, Tabla 5).

Ninguna otra de las variables analizadas constituía un riesgo significativo de colonización intestinal, aunque tener contacto con niños y mascotas se relaciona en un alto porcentaje de casos. Al analizar estas variables ordenadas por especies parásitas, no hubo correlación estadísticamente significativa entre su presencia y la exposición a ninguno de los factores de riesgo parasitológico.

Tabla 5. Exposición a factores de riesgo parasitológico en función de la colonización intestinal.

Factores de riesgo	Colonizados (n=53)		No colonizados (n=50)		p-valor
	N	%	N	%	
<i>Alimentación ecológica</i>	23	43,4%	12	24,0%	0,038*
<i>Fuentes de agua no públicas o privadas</i>	4	3,9%	3	6,0%	0,76
<i>Viaje a país endémico</i>	5	9,4%	5	10,0%	0,83
<i>Contacto con niños</i>	30	56,6%	28	56,0%	0,95
<i>Contacto con mascotas</i>	39	73,6%	35	70,0%	0,69
<i>Exposición profesional</i>	10	18,9%	9	18,0%	0,91

4.3 Resultados de la clínica gastrointestinal

4.3.1.1 Resultados generales

Los participantes del estudio fueron interrogados sobre sus hábitos intestinales, la presencia de dolor abdominal, hinchazón abdominal y flatulencias, para evaluar si la colonización se asoció con diferencias en estos síntomas.

El número medio de deposiciones por día fue de $1,6 \pm 0,9$ (Tabla 6), con una consistencia media de $4,1 \pm 0,9$ en la escala de Bristol (BSS), si bien fueron resultados muy heterogéneos entre sujetos. En general, los síntomas abdominales fueron comunes, ya que el 47,1% de los participantes se quejaron de al menos uno de ellos. En concreto, el 10,6% refería dolor o malestar abdominal después de las comidas y el 26,9% hinchazón abdominal, mientras que las flatulencias después de las comidas alcanzaron el 37,5%.

Tabla 6. Información sobre las deposiciones y los síntomas abdominales.

Variables clínicas	Promedio \pm DE	
<i>Deposiciones por día</i>	1,6 \pm 0,9	
<i>Consistencia de las heces (BSS)</i>	4,1 \pm 0,9	
	Prevalencia	N.º sujetos
<i>Diarrea (6 o 7 BSS)</i>	5,8%	6
<i>Estreñimiento (1 o 2 BSS)</i>	7,7%	8
<i>Ritmo intestinal alternante</i>	6,7%	7
<i>Síntomas abdominales</i>	47,1%	49
<i>Dolor abdominal</i>	10,6%	11
<i>Hinchazón abdominal</i>	26,9%	28
<i>Flatulencias</i>	37,5%	39

BSS= puntuación en la escala de Bristol.

Atendiendo a las intolerancias alimentarias referidas por los participantes en el momento de la valoración clínica, 21 sujetos (20,2%) describían alguna de ellas, pero sin un diagnóstico de laboratorio que la confirmase de manera fehaciente. Así, 15 sujetos (14,4%) refirieron intolerancia percibida a la lactosa, tres pacientes (2,8%) mala tolerancia a las comidas ricas en grasas, otro paciente

(1,0%) intolerancia a la fructosa, a la grasa y a la lactosa, y otros dos (1,9%) algún tipo de intolerancia alimentaria intermitente que asociaban otro tipo de alimento concreto. Ninguno de ellos refirió intolerancia al gluten no celiaca.

4.3.1.2 Resultados según la situación de colonización intestinal

El número diario de deposiciones presentó diferencias significativas entre individuos colonizados y no colonizados ($p=0,026$; IC 95% [0,15, 0,85]) (Tabla 7), con una frecuencia deposicional mayor entre aquellos que no presentaban parásito intestinal. Un sujeto colonizado aquejaba diarrea (puntuaciones 6 y 7 en BSS), mientras que entre los no colonizados la presentaron cuatro. Siete pacientes refirieron ritmo intestinal alterno, siendo este hallazgo también menos frecuente en participantes no colonizados. Llamativamente, los sujetos que albergaban un parásito entérico describieron una tendencia global hacia menos síntomas abdominales que aquellos negativos. Así, la frecuencia de hinchazón abdominal y de flatulencias fue significativamente mayor en los no colonizados en comparación con los colonizados (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de síntomas gastrointestinales en función de la presencia de colonización.

Variables clínicas	No colonizados (n=51)	Colonizados (n=53)	p-valor
<i>Deposiciones/día (media ±DE)</i>	1,9±1,1	1,4±0,7	0,026*
<i>Consistencia fecal (media ±DE)</i>	4,2±1,0	4,0±0,7	Ns
<i>Diarrea</i>	7,8%	1,9%	Ns
<i>Estreñimiento</i>	3,9%	1,9%	Ns
<i>Ritmo intestinal alterno</i>	9,8%	3,8%	Ns
<i>Síntomas abdominales</i>	58,8%	35,8%	0,024*
<i>Dolor abdominal</i>	13,7%	7,5%	Ns
<i>Hinchazón abdominal</i>	37,2%	16,9%*	0,028*
<i>Flatulencia</i>	47,0%	28,3%*	Ns

	No colonizados (n=51)	<i>Blastocystis</i> sp. (n=46)	p-valor
<i>Deposiciones/día (media ±DE)</i>	1,9±1,1	1,4±0,7	0,026*
<i>Síntomas abdominales</i>	58,8%	37,0%	0,031*
<i>Dolor abdominal</i>	13,7%	8,7%	Ns
<i>Hinchazón abdominal</i>	37,2%	17,4%	0,029*
<i>Flatulencia</i>	47,0%	28,3%	Ns

DE = desviación estándar; % = frecuencia relativa; *estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre los grupos. Ns= no significativo en la comparación entre grupos.

En el análisis de sintomatología abdominal por especies parásitas concretas, las diferencias referidas sólo se mantuvieron significativas en el grupo de participantes colonizados por *Blastocystis* sp. frente a no colonizados (Tabla 7), y no cuando se compararon los sujetos que albergaban los otros dos parásitos intestinales con los negativos. Por lo tanto, la frecuencia relativa más baja de estas quejas en el grupo colonizado se desprendía del grupo positivo a *Blastocystis* sp.

En lo que a las intolerancias alimentarias se refiere, al comparar su prevalencia en función de la variable de la colonización no se identificó ninguna diferencias entre subgrupos.

4.4 Resultados de comorbilidades metabólicas

4.4.1.1 Resultados generales

Atendiendo a las comorbilidades asociadas con la obesidad, la población estudiada presentaba principalmente enfermedades respiratorias: 41 (39,4%) sujetos sufrían de síndrome de hipopnea-apnea obstructiva del sueño; 9 (8,7%) sujetos enfermedad pulmonar asmática y 2 (1,9%) de ellos enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por otro lado, 7 (6,7%) pacientes tenían antecedentes de enfermedad cardiovascular, otros 7 (6,7%) antecedentes de un evento trombotico y 8 (7,7%) de enfermedad renal crónica. Finalmente, 4 (3,8%) sujetos sufrían de un trastorno hepático crónico (relacionado con el virus de la hepatitis C o la enfermedad del hígado graso no alcohólico).

Por otro lado, 59 (56,7%) participantes cumplieron los criterios clínicos para el diagnóstico de síndrome metabólico, de acuerdo con la definición de la ATP-III (54). Las comorbilidades metabólicas identificadas de manera más frecuente fueron: dislipidemia (75,9%), hipertensión (54,8%), hiperuricemia (49,0%) y diabetes mellitus tipo 2 (31,7%). Además, el 34,6% cumplió criterios de prediabetes (ya fuera debido a la HbA1c >5,7% o un nivel de glucemia en ayunas >100 mg/dL), y solo el 33,7% de los participantes mostraron un metabolismo glucémico no deteriorado.

En lo que se refiere a la enfermedad de hígado graso no alcohólico, la exploración ecográfica resultó positiva para esteatosis en el 73,7% de los participantes, y el 17,3% obtuvo resultados positivos en los índices bioquímicos de riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (ver apartado 3.6). La información sobre la descripción de comorbilidades se encuentra resumida en la Tabla 8.

Tabla 8. Descripción de las comorbilidades asociadas a la obesidad.

Comorbilidades	Prevalencia	N.º. sujetos
<i>HTA</i>	54,8%	57
<i>Dislipemia</i>	75,9%	79
<i>DT2</i>	31,7%	33
<i>Prediabetes</i>	34,6%	33
<i>MHC normal</i>	33,7%	35
<i>Hiperuricemia</i>	49,0%	51
<i>Síndrome metabólico</i>	56,0%	59
<i>Enfermedad cardiovascular</i>	6,7%	7
<i>Eventos trombóticos</i>	6,7%	7
<i>Enfermedad renal crónica</i>	7,7%	8
<i>Resistencia a la insulina</i>	29,8%	31
<i>EHGNA (n= 99)</i>	73,7%	73
<i>Positividad a índices de EHNA</i>	17,3%	18

HTA= hipertensión arterial; DT2 = diabetes tipo 2; MHC= metabolismo hidrocarbonado; EHGNA = enfermedad de hígado graso no alcohólico; ENHA =esteatohepatitis no alcohólica.

4.4.1.2 Resultados según la situación de colonización intestinal

Se comparó la presencia de comorbilidades metabólicas entre sujetos colonizados por los parásitos del estudio con aquellos no colonizados, para determinar si esta variable se relacionaba con su desarrollo. Si bien no se halló ninguna comorbilidad cuya prevalencia fuera mayor de manera estadísticamente significativa, sí que se identificaron tendencias interesantes (Figura 11). De este modo, los sujetos colonizados mostraron una tendencia hacia un menor riesgo de padecer síndrome metabólico (49 vs. 64,7%), que era particularmente pronunciada en el subgrupo positivo para *Blastocystis* sp. (47,8%) (Figura 12). También se detectó una tendencia hacia una mayor frecuencia de DT2 (39,2 vs. 24,5%) y de HTA (58,8 vs. 50,9%) en pacientes no colonizados.

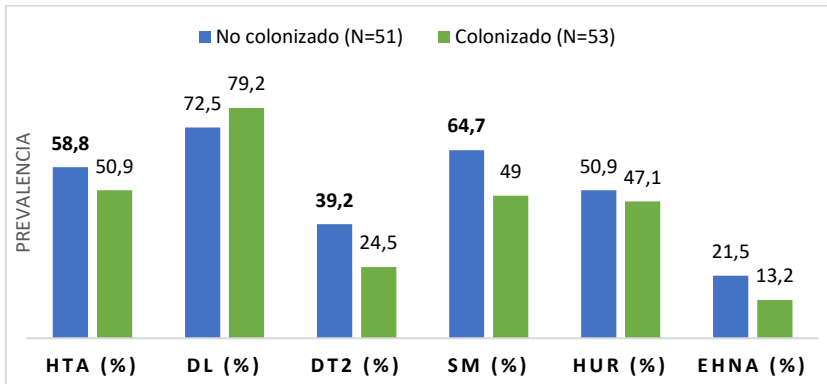


Figura 11. Comorbilidades metabólicas en función de la presencia de colonización intestinal por cualquier especie parásita. HTA= hipertensión arterial; DL= dislipemia; DT2=diabetes tipo 2; SM= síndrome metabólico; HUR= hiperuricemia; EHNA= esteatohepatitis no alcohólica.

Sospechando una diferente repercusión de las distintas especies parásitas sobre la aparición de las comorbilidades metabólicas, se analizó su prevalencia de forma estratificada en función del parásito colonizador. La información obtenida se muestra en las figuras siguientes.

En primer lugar, en la Figura 12 aparece mostrada la prevalencia de cada comorbilidad comparando el grupo de sujetos no colonizado con el grupo con resultado positivo para *Blastocystis* sp. (sujetos tanto con mono como con multiparasitación). A destacar que este subgrupo presentaba la prevalencia más baja de síndrome metabólico de entre los participantes en el estudio (47,8%).

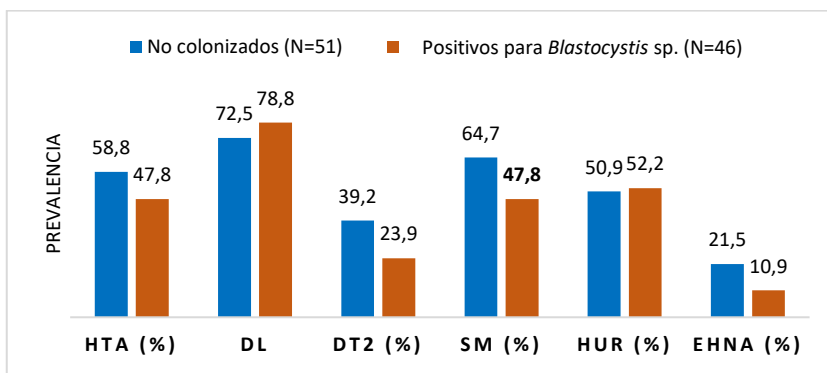


Figura 12. Comorbilidades metabólicas en no colonizados y colonizados por *Blastocystis* sp. HTA= hipertensión arterial; DL= dislipemia; DT2=diabetes tipo 2; SM= síndrome metabólico; HUR= hiperuricemia; EHNA= esteatobepatitis no alcohólica.

Por su parte, la Figura 13 representa la prevalencia de comorbilidades comparando el grupo de sujetos no colonizado frente al positivo para *G. intestinalis*. De éste, el 55,5% sufría síndrome metabólico, prevalencia mayor que en la de los subgrupos colonizados por las otras dos especies estudiadas. También presentaba la prevalencia más elevada de DT2 dentro del estudio (44,4%), así como la mayor positividad a los índices de esteatohepatitis no alcohólica (22,2%), en ambos casos superando a la de los sujetos no colonizados.

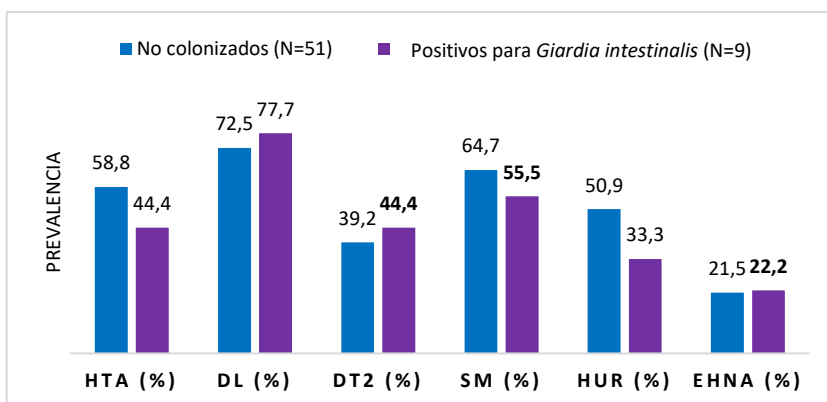


Figura 13. Comorbilidades metabólicas en no colonizados y colonizados por *G. intestinalis*. HTA= hipertensión arterial; DL= dislipemia; DT2=diabetes tipo 2; SM= síndrome metabólico; HUR= hiperuricemia; EHNA= esteatobepatitis no alcohólica.

Finalmente, la Figura 14 representa la prevalencia comorbilidades comparando el grupo de sujetos no colonizados frente al subgrupo positivo para el tercer parásito, *D. fragilis*. Estos participantes presentaron la menores frecuencias de todo el estudio de hiperuricemia (16,7%, siendo estadísticamente significativa la diferencia con el grupo de no colonizados, $p=0,019$) y de DT2 (8,3%, sin llegar a la significación estadística al comparar con los no colonizados, $p=0,064$).

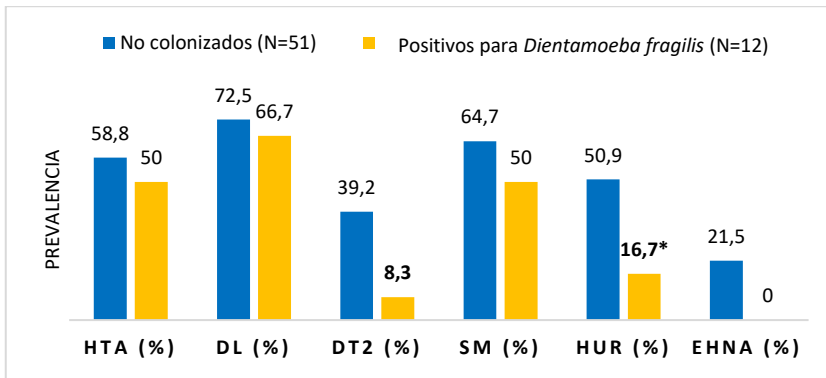


Figura 14. Comorbilidades metabólicas en no colonizados y colonizados por *D. fragilis*. HTA= hipertensión arterial; DL= dislipemia; DT2=diabetes tipo 2; SM= síndrome metabólico; HUR= hiperuricemia; EHNA= esteatohepatitis no alcohólica. * Estadísticamente significativa la diferencia entre grupos.

Pese a que los anteriores resultaban hallazgos clínicamente relevantes, tras la comparación estadística de los no colonizados frente a los positivos para cada una de las diferentes especies parásitas, no se identificaron diferencias significativas en la prevalencia de comorbilidades, salvo la indicada con la hiperuricemia y la colonización por *D. fragilis*.

Sin embargo, cabe una mención especial a las diferencias apreciadas en la prevalencia de DT2. Como se ha indicado, la más baja fue obtenida por los participantes positivos para *D. fragilis* (8,3%, Figura 14), seguida de los sujetos monocolonizados con *Blastocystis* sp. (21,2%, representada en la Tabla 9), mientras que la mayor de todas la presentaban los sujetos que tenían positividad para *G. intestinalis* (44,4%, Figura 13), que de hecho superaba a la frecuencia hallada en el grupo de no colonizados. Se detectaron por tanto

tendencias inversas entre la aparición de DT2 y la colonización por un tipo u otro de parásito intestinal: reduciéndola *Blastocystis* sp. y *D. fragilis*, por un lado, y aumentándola *G. intestinalis*, por otro.

Teniendo en cuenta esta circunstancia, se analizaron los resultados de prevalencia de DT2 comparando los sujetos no colonizados frente a los positivos, pero atendiendo a la especie parásita de forma más detallada. A tal fin, se crearon nuevas categorías: monoinfectados por *Blastocystis* sp. (tras excluir las coinfecciones con las otras dos especies), positivos para *D. fragilis* excluyendo los positivos para *G. intestinalis* (positivos DF y negativos GI) y sujetos B/DF, que incluían a los colonizados por *Blastocystis* sp. y/o por *D. fragilis*, tras excluir a los colonizados por *G. intestinalis*. Tras este análisis, de manera estadísticamente significativa la prevalencia de DT2 sí resultaba menor cuando se comparaban los no colonizados tanto con el subgrupo B/DF como con el de positivos DF y negativos GI (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de DT2 en función de la colonización intestinal por cada especie parásita.

Prevalencia de DT2		p-valor
No colonizados (n=51) 39,2%	Colonizados (n=53) 24,5%	0,108
No colonizados (n=51) 39,2%	Monoinfectados <i>Blastocystis</i> sp. (n=33) 21,2%	0,058
No colonizados (n=51) 39,2%	Positivos DF y negativos GI (n=11) 8,3%	0,037*
No colonizados (n=51) 39,2%	Positivos <i>G. intestinalis</i> (n=9) 44,4%	0,404
No colonizados (n=51) 39,2%	B/DF (n=44) 20,5%	0,041*

DT2= diabetes tipo 2; DF= *D. fragilis*; GI= *G. intestinalis*; B/DF= sujetos colonizados por *Blastocystis* sp. y/o por *D. fragilis*, tras excluir a los colonizados por *G. intestinalis*.

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre los grupos.

4.5 Resultados antropométricos

El estudio antropométrico de los participantes mostró un IMC medio de 45,9 \pm 6,6 kg/m². Al clasificar a los sujetos por su IMC según establece la clasificación de la OMS (1), 16 de ellos fueron considerados obesos tipo II, mientras que el resto (88 sujetos) se catalogaron como obesos tipo III. La circunferencia abdominal fue muy variable entre participantes, con un valor medio de 130,5 \pm 13,9 cm y una relación cadera-altura de 79,3 \pm 10,5. No se encontraron diferencias en estas variables en función del sexo de los participantes, así como tampoco en función del estado de colonización intestinal por los parásitos estudiados.

Los resultados del análisis de bioimpedancia se presentan agrupados por sexo y por estado de colonización en la Tabla 10. Como era esperable, se obtuvo un mayor porcentaje de masa grasa en mujeres que en hombres (53,0 vs. 46,3%), coexistente con menor porcentaje de masa esquelética (26 vs. 30,3%) en ellas. El ángulo de fase medio obtenido fue de 5,4 \pm 0,7 y el área de grasa visceral de 259,4 \pm 32,0 cm². No se encontraron diferencias en el análisis de estos parámetros estratificado en función de la presencia de colonización intestinal.

Tabla 10. Resultados antropométricos obtenidos por bioimpedanciometría estratificados por sexo y colonización (N=104).

	Hombres			Mujeres		
	Col	NC	p-valor	Col	NC	p-valor
IMC (kg/m ²)	44,9	46,7	0,63	47,1	44,8	0,29
%FM	46,7	45,8	0,99	53,3	52,7	0,59
%FFM	53,3	54,2	0,99	46,7	47,3	0,59
%SKM	30,0	30,6	0,88	25,9	26,2	0,71
VFA (cm ²)	270,3	250,8	0,13	253,9	262,6	0,16
Ángulo de fase	5,7	5,9	0,39	5,1	5,1	0,87
CAbd (cm)	138,8	137,9	0,90	126,9	125	0,46

NC= no colonizados; Col= colonizados; IMC= índice de masa corporal; %FM= porcentaje de masa grasa; %FFM= porcentaje de masa libre de grasa; %SKM= porcentaje de masa muscular esquelética; VFA= área grasa visceral; CAbd= circunferencia abdominal.

4.6 Resultados de la enfermedad hepática metabólica

La esteatosis hepática estuvo presente en el 73,7% de los sujetos evaluados por medio de ecografía hepática. La clasificación por grados obtuvo los siguientes resultados: 11,1% grave, 43,4% moderada y 19,2% leve, con ecogenicidad normal en el resto de los pacientes (26,2%) (Tabla 11).

Tabla 11. Gradación de la esteatosis hepática por ecografía.

Esteatosis hepática	N.º. sujetos (n=99)	Prevalencia (%)
<i>Ausente</i>	26	26,2%
<i>Leve</i>	19	19,2%
<i>Moderada</i>	43	43,4%
<i>Grave</i>	11	11,1%

Tras proceder al análisis comparativo en función de la presencia de colonización intestinal, se observó una discreta tendencia hacia una menor prevalencia de esteatosis hepática en pacientes colonizados frente a no colonizados (70,8 vs. 76,5%) y hacia una menor gravedad de la misma. Esta tendencia resultaba a expensas tanto de los sujetos que albergaban *Blastocystis* sp. y *D. fragilis* (69,0% y 41,7% de prevalencia de EHGNA, respectivamente) como de los colonizados por *G. intestinalis* (55,6% de prevalencia de EHGNA, Figura 15). No fue posible establecer una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de este trastorno metabólico para ninguno de los subgrupos de individuos colonizados.

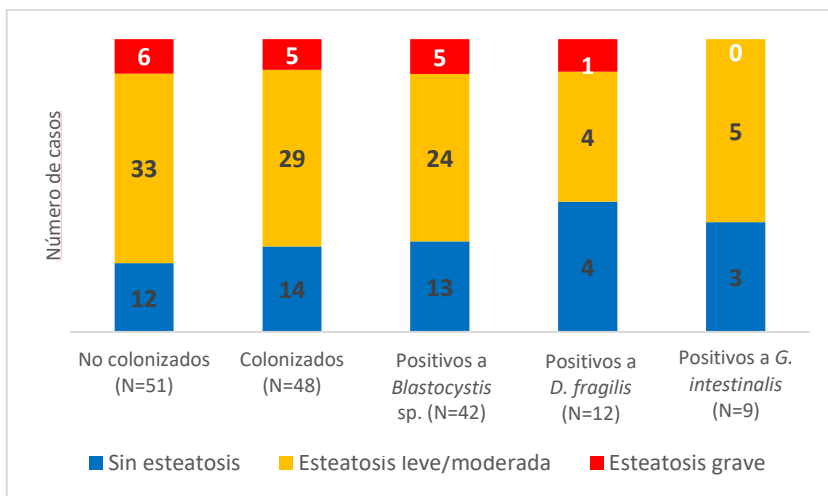


Figura 15. Resultados ecográficos en función de la colonización intestinal por especies parásitas. N=número de sujetos con resultados disponibles para esta variable dentro de cada grupo de colonización.

Con respecto a las puntuaciones de riesgo de esteatohepatitis no alcohólica, tras aplicar los tests bioquímicos no invasivos obtuvimos resultados positivos en 18 sujetos: 14 con el NAFLD Fibrosis Score, 8 con el FIB-4, 7 con el APRI y 5 con el Hepamet Fibrosis Score. Solo 2 de estos pacientes tenían un trastorno hepático crónico conocido.

No se pudieron establecer diferencias significativas en la frecuencia de positividad a los índices de EHNA en función del estado de colonización por microeucariotas. No obstante, existía una tendencia hacia una mayor frecuencia de positividad entre los sujetos no colonizados (21,5 vs. 13,2%, Figura 11), exceptuando, una vez más, a los colonizados por *G. intestinalis*, que presentaban la mayor frecuencia de positividad del estudio (22,2%, Figura 13).

4.7 Resultados dietéticos

Se valoró la información recopilada a partir de los cuestionarios y registros dietéticos rellenos por 84 participantes en el estudio. En base a esto, se analizaron una serie de variables de interés que se contemplaron en los objetivos del estudio, atendiendo a la composición cualitativa y cuantitativa de macro y micronutrientes.

Globalmente, fue llamativa la extremadamente baja adherencia de los participantes a las recomendaciones dietéticas proporcionadas por el equipo asistencial. Así, menos de un tercio de los sujetos ingerían una cantidad óptima de kcal para su situación de obesidad (20-25 kcal/kg de peso ajustado/día, (306)); el resto excedía o no alcanzaba las recomendaciones internacionales de aporte calórico diario. Por otro lado, el cumplimiento de las ingestas diarias recomendadas de cada macronutriente fue muy esporádico, lo que implica que la calidad de la dieta entre los participantes seguía siendo muy deficiente. La sobreingesta de azúcares simples estaba presente en el 95% de sujetos, la de lípidos en el 54% y la de proteínas en el 10%. La información global sobre las kcal ingeridas diariamente y del % del valor calórico total aportado por los tres macronutrientes aparece reflejada en la Tabla 12.

Tabla 12. Aportes calóricos y de macronutrientes diarios.

Aportes nutricionales (n=59)	Media	% valor calórico total
<i>Energético (kcal)</i>	1599	-
<i>Carbohidratos simples (g)</i>	52,6	13,7
<i>Carbohidratos complejos (g)</i>	100,5	29,3
<i>Lípidos (g)</i>	63,2	35,6
<i>Proteínas (g)</i>	85,5	21,4

Atendiendo a la ingesta diaria de fibra, se identificó que ninguno de los pacientes cubría la cantidad diaria recomendada. Empleando el software previamente especificado (308) se logró estimar la ingesta diaria de los principales micronutrientes y compararla con la ingesta diaria recomendada (IDR), con lo que se evidenció un elevado déficit de la mayoría de ellos (Tabla 13).

Tabla 13. Aporte de micronutrientes diario y cumplimiento de la ingesta diaria recomendada.

Micronutriente	Media	Cumplimiento de la IDR	
		% déficit	% suficiencia
<i>Fibra total (g)</i>	16,3	100	0
<i>Fibra soluble (g)</i>	4,1	44,1	55,9
<i>Fibra insoluble (g)</i>	7,1	100	0
<i>Vitamina A (µg)</i>	757,7	65,5	34,5
<i>Vitamina B6 (mg)</i>	1,6	66,1	33,9
<i>Vitamina B12 (mcg)</i>	4	83,1	16,9
<i>Vitamina C (mg)</i>	104,1	42,9	57,1
<i>Vitamina D (mcg)</i>	3,4	98,3	1,7
<i>Vitamina E (mg)</i>	5,8	96,4	3,6
<i>Cobre (mg)</i>	2,9	93,8	6,3
<i>Zinc (mg)</i>	8,8	37,5	62,5
<i>Hierro (mg)</i>	10,1	89,8	10,2

IDR= ingesta diaria recomendada.

En base a la anterior información, no fue posible establecer subgrupos de pacientes en función del patrón de ingesta presentado, ya que la inmensa mayoría de participantes seguían una dieta de patrón claramente occidental; es decir, una dieta con elevado consumo de azúcares simples, proteínas y grasas de origen animal y bajo aporte de fibra dietética y antioxidantes naturales. Igualmente, tras analizar el cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea, sólo el 19,2% de los sujetos que lo respondieron obtuvo una puntuación que permitía afirmar una buena adherencia a este patrón de alimentación (≥ 10) (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados del cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea.

Respuestas obtenidas (n=78)		
Puntuación media	≥ 10 puntos	
	Prevalencia	N.º sujetos
7,7 \pm 1,8	19,2%	15

Por otro lado, se recogió de manera específica la ingesta diaria de algunos micronutrientes de reconocido papel en la modulación del sistema antioxidante del ser humano. Esta ingesta se estratificó en función de la presencia de colonización intestinal por los parásitos analizados en el estudio. Tras comparar ambos grupos (Tabla 15), la ingesta diaria de estos nutrientes antioxidantes fue similar entre los sujetos colonizados y los no colonizados. Por lo tanto, la capacidad antioxidante procedente de la dieta era la misma, independientemente del estado de colonización de los participantes. Tampoco se identificaron diferencias en el aporte del resto de micro y macronutrientes entre colonizados y no colonizados.

Tabla 15. Ingesta diaria de nutrientes antioxidantes en función del estado de colonización.

	<i>Colonizado</i>		<i>No colonizados</i>		<i>WT</i>
	<i>Mediana</i>	<i>1C, 3C</i>	<i>Mediana</i>	<i>1C, 3C</i>	
<i>Vitamina A</i> (<i>µg/ día</i>)	702,0	536,0, 903,0	688,0	484,8, 859,5	0,13
<i>Vitamina C</i> (<i>mg/ día</i>)	87,3	58,3, 118,0	85,7	57,9, 118,0	0,21
<i>Vitamina E</i> (<i>mg/ día</i>)	5,5	4,0, 8,3	5,5	3,6, 8,1	0,06
<i>Ratio</i> <i>ω3/ω6</i>	0,17	0,13, 0,28	0,18	0,13, ,27	0,55
<i>Cobre</i> (<i>mg/ día</i>)	1,2	0,9, 2,1	1,2	0,9, 1,8	0,23
<i>Zinc</i> (<i>mg/ día</i>)	8,5	6,6, 11,2	8,0	6,4, 10,5	0,06
<i>Manganeso</i> (<i>mg/ día</i>)	2,7	2,1, 6,5	2,6	2,0, 5,4	0,37
<i>Selenio</i> (<i>µg/ día</i>)	104,0	77,6, 138,0	105,5	77,9, 135,5	0,34

1C, 3C: primer y tercer cuartil; WT: Prueba rank-sum test de Wilcoxon.

Finalmente, tras separar a los sujetos analizados en varias categorías con respecto a su cumplimiento de la IDR de vitaminas antioxidantes, tampoco se detectaron diferencias en los parámetros de estado de oxidación-reducción (redox) medios analizados (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros redox en función del cumplimiento de la ingesta diaria recomendada de antioxidantes.

CUMPLIMIENTO DE LA DRI

<i>Vitaminas</i>	<i>Ninguna</i> <i>(n=32)</i>	<i>Vit. A</i> <i>(n=4)</i>	<i>Vit. C</i> <i>(n=23)</i>	<i>Vit. A + C</i> <i>(n=22)</i>	<i>Vit. A+C+E</i> <i>(n=3)</i>	<i>KW</i> <i>T</i>
<i>MDA (ng/mL)</i>	418,3	450,0	401,2	388,1	431,7	Ns
<i>GSH/GSSG</i>	0,38	0,48	0,35	0,37	0,33	Ns
<i>TAC (mM)</i>	3,31	3,59	3,26	3,24	3,84	Ns
<i>SOD-3 (U/mL)</i>	1,47	1,41	1,36	1,48	0,93	Ns
<i>NOX (µg/mL)</i>	30,3	33,9	37,4	33,0	27,0	Ns

Vit. =vitamina; KW T= test de Kruskal-Wallis; Ns: sin diferencias significativas en la comparación de grupos.

4.8 Resultados generales de parámetros bioquímicos

4.8.1.1 Parámetros metabólicos

Los valores medios de los parámetros bioquímicos metabólicos se muestran en la Tabla 17 agrupados por el estado de colonización. Se obtuvieron resultados similares entre no colonizados y colonizados, tanto en general, como por especies parásitas concretas.

Tabla 17. Parámetros metabólicos en función de la colonización por las distintas especies parásitas.

Parámetros	NC (n=51)	Col (n=53)	<i>Blas</i> (n=46)	<i>GI</i> (n=9)	<i>DF</i> (n=12)
<i>Glucosa (mg/ dL)</i>	109	102	103	103	102
<i>Ácido úrico (mg/ dL)</i>	5,5	5,5	5,6	4,9	5,0
<i>Colesterol total (mg/ dL)</i>	176	172	171	167	178
<i>HDL-C (mg/ dL)</i>	50	47	47	45	50
<i>No HDL-C (mg/ dL)</i>	126	125	124	122	128
<i>LDL-C (mg/ dL)</i>	97	101	100	101	107
<i>Triglicéridos (mg/ dL)</i>	133	121	123	107	107
<i>HbA1c (%)</i>	5,7	5,8	5,8	5,8	5,4
<i>Péptido C (ng/ mL)</i>	4,7	4,1	4,2	3,5	4,3
<i>Proteínas totales (g/ dL)</i>	7,1	6,9	7,0	6,8	6,7
<i>Albumina (g/ dL)</i>	4,4	4,5	4,5	4,4	4,3
<i>IST (%)</i>	22,5	23,8	23,8	24,3	22,0
<i>Ca (mg/ dL)</i>	9,3	9,3	9,4	9,3	9,0
<i>P (mg/ dL)</i>	3,8	3,7	3,7	3,6	3,5
<i>Mg (mg/ dL)</i>	2,0	2,0	2,0	1,9	2,0
<i>PTH (pg/ mL)</i>	56,9	48	46,0	55,5	46,6
<i>Ceruloplasmina (mg/ dL)</i>	28,7	27,1	27,2	92,7	86,3

NC= no colonizados; Col= colonizados; Blas=*Blastocystis* sp.; DF= *D. fragilis*; GI= *G. intestinalis*, LDL-C = colesterol LDL; HDL-C = colesterol HDL; IST= índice de saturación de la transferrina; Ca =calcio; P= fósforo; Mg= magnesio; PTH =hormona paratiroidea.

Entre los participantes, el 39,3% presentó niveles plasmáticos elevados de la hormona leptina (media $54,9 \pm 32,1$ mg/dL), sin diferencias significativas atendiendo al estado de colonización y a las especies parásitas.

Los niveles plasmáticos de insulina fueron de $27,3 (\pm 35,1)$ mg/dL. Empleamos el índice HOMA-R para estudiar la presencia de resistencia a la insulina en los sujetos estudiados; utilizamos el punto de corte de $>3,8$, validado con este fin en nuestra población (336). Al hacerlo, clasificamos a 31 sujetos como resistentes a la insulina. El valor medio de índice HOMA-R fue de $6,05 (\pm 3,8)$. Habiendo excluido a los sujetos diabéticos que recibieron insulina, encontramos una diferencia estadísticamente significativa al comparar los índices HOMA-R en sujetos no colonizados ($6,97 \pm 4,8$) vs. colonizados ($5,31 \pm 2,5$) (Tabla 18). Esta tendencia hacia un índice HOMA-R más bajo se mantuvo en el subanálisis por subgrupos por especies colonizadoras, particularmente en aquellos que eran positivos para *G. intestinalis*, pero no alcanzó significación estadística debido a los grandes intervalos de confianza que contenían el valor nulo.

Tabla 18. Resultados metabólicos en función de la situación de colonización.

	No colonizados (n=51)	Colonizados (n=53)	p-valor	IC 95%
HOMA-IR	$6,97 \pm 4,8$	$5,31 \pm 2,5$	0,05*	[-3,3, -0,1]
Insulina (mcU/mL)	$33,9 \pm 50,2$	$21,6 \pm 10,1$	0,12	[-27,8, 3,1]
Leptina (ng/mL)	$57,9 \pm 36,3$	$52,2 \pm 27,8$	0,39	[-19,1, 7,6]
HOMA-IR	No colonizados (n=51)	<i>Blastocystis</i> sp. (n=46)		
	$6,97 \pm 4,8$	$5,50 \pm 2,4$	0,92	[-3,0, 0,2]
	No colonizados (n=51)	<i>D. fragilis</i> (n=12)		
$6,97 \pm 4,8$	$5,53 \pm 2,4$	0,10	[-4,0, 0,4]	
No colonizados (n=51)	<i>G. intestinalis</i> (n=9)			
$6,97 \pm 4,8$	$4,71 \pm 2,3$	0,07	[-4,9, 0,2]	

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre los grupos.

4.8.1.2 Parámetros nutricionales

La Tabla 19 muestra los parámetros bioquímicos nutricionales medios de la población estudiada estratificados por situación de colonización. No se identificaron diferencias significativas entre subgrupos.

Tabla 19. Parámetros nutricionales en función de la colonización intestinal por las distintas especies parásitas.

Parámetros	NC (n=51)	Col (n=53)	Blas (n=46)	GI (n=9)	DF (n=12)
Proteínas totales (g/ dL)	7,1	6,9	7,0	6,8	6,7
Albúmina (g/ dL)	4,4	4,5	4,5	4,4	4,3
IST (%)	22,5	23,8	23,8	24,3	22,0
Ca (mg/ dL)	9,3	9,3	9,4	9,3	9,0
P (mg/ dL)	3,8	3,7	3,7	3,6	3,5
Mg (mg/ dL)	2,0	2,0	2,0	1,9	2,0
PTH (pg/ mL)	56,9	48	46,0	55,5	46,6
Ceruloplasmina (mg/ dL)	28,7	27,1	27,2	92,7	86,3

NC= no colonizados; Col= colonizados; Blas=*Blastocystis* sp.; DF= *D. fragilis*; GI= *G. intestinalis*; IST= índice de saturación de la transferrina; Ca =calcio; P= fósforo; Mg= magnesio; PTH =hormona paratiroidea.

Atendiendo a los micronutrientes, se registró la frecuencia de su ingestión suplementaria, que aparece plasmada en la Tabla 20. Solo seis sujetos ingerían suplementos multivitamínicos orales. La deficiencia plasmática de micronutrientes más frecuente fue la de vitamina D, con un 79,8% de insuficiencia (<30 mg/dL) y un 22,1% de deficiencia (<15 mg/dL), a pesar de que el 43,3% de los sujetos ingirieron suplementos de colecalciferol o calcifediol. Los niveles medios de parathormona (PTH) en sujetos con insuficiencia de vitamina D fueron de 60,4 ($\pm 21,7$) mg/dL. El 30,8% de los participantes tenía signos de bajas reservas de hierro, relacionadas con un bajo índice de saturación de transferrina. Se observó deficiencia de vitamina A en dieciséis sujetos, mientras que fue más frecuente encontrar altos niveles plasmáticos de vitamina A y E (media de 58,6 mg/dL y 16,5 mg/dL, respectivamente). La deficiencia de ácido fólico se detectó en catorce participantes y la de B12, en dos sujetos (Tabla 20).

Tabla 20. Prevalencia de deficiencias de micronutrientes en la población de estudio.

Deficiencia	N	%	% de suplementación
<i>Insuficiencia de vitamina D (<30 mg/ dL)</i>	83	79,8%	43,3%
<i>Deficiencia de vitamina D (<15 mg/ dL)</i>	23	22,1%	
<i>Índice saturación transferrina <25 %</i>	32	30,8%	1,9%
<i>Vitamina A <42 mcg/ dL</i>	16	15,5%	-
<i>Vitamina E <8,6 mcg/ mL</i>	1	0,9%	-
<i>Ácido fólico <4,6 pg/ mL</i>	14	13,5%	3,8%
<i>Vitamina B12 <191 pg/ mL</i>	2	1,9%	0,9%

Finalmente, en sujetos que albergaban parásitos intestinales se observó una tendencia hacia niveles más bajos de vitamina A, E y B12, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 21).

Tabla 21. Niveles plasmáticos de vitaminas en función del estado de colonización.

Vitaminas	No colonizados (n=51)	Colonizados (n=53)	p-valor	IC 95%
<i>VitD (ng/ mL)</i>	21,9	22,6	0,521	[-2,7, 5,2]
<i>VitA (mcg/ dL)</i>	60,7	56,6	0,176	[-12,5, 2,3]
<i>VitE (mcg/ mL)</i>	17,2	15,8	0,066	[-3,4, 0,1]
<i>B12 (pg/ mL)</i>	468,9	411,2	0,089	[-125,9, 9,1]
<i>Ácido fólico (pg/ mL)</i>	6,5	7,9	0,184	[-0,7, 3,4]

4.9 Resultados de la situación de inflamación sistémica y el estrés oxidativo

De la muestra total de pacientes que constituyen este estudio, para estos análisis se descartó a 7 sujetos por cumplir alguno de los criterios de exclusión previamente expuestos (ver apartado 3.2). Se obtuvieron por ello resultados de **97 sujetos** para el análisis de parámetros inflamatorios y estado redox, 58 mujeres y 39 varones, cuya edad media fue de 47,9 años.

Los resultados de colonización intestinal por los parásitos de interés fueron similares a los de la muestra total: 49,5% de prevalencia global de colonización (n=48), con *Blastocystis* sp. en un 42,3%, seguido de *D. fragilis* (10,3%) y de *G. intestinalis* (9,3%), 6 casos de colonización mixta *Blastocystis* sp./*D. fragilis*, 5 casos positivos para *Blastocystis* sp./*G. intestinalis* y uno de colonización triple.

En este subgrupo de participantes, se identificó una mayor prevalencia de diabetes tipo 2 entre los sujetos no colonizados frente a los colonizados por uno de los microeucariotas (Tabla 22). Los sujetos, colonizados y no colonizados, fueron comparables en cuanto a las variables edad, tipo de obesidad, prevalencia de tabaquismo y resto de comorbilidades metabólicas. Asimismo, se reprodujo el valor de HOMA-R más bajo entre pacientes colonizados frente a no colonizados ($5,2 \pm 2,3$ vs. $7,1 \pm 4,7$, $p=0,021$) (Tabla 22), junto con la tendencia hacia una menor prevalencia de síndrome metabólico y de EHGNA.

Tabla 22. Variables epidemiológicas y clínicas e índice HOMA-IR en función de la colonización.

Variables	Colonizados		No colonizados		Test Chi ²
	N	%	N	%	
Mujeres	27	56,3	31	63,3	Ns
Obesidad tipo II	6	12,5	8	16,3	Ns
Fumadores	12	25	9	18,4	Ns
Hipertensión arterial	25	52,1	29	59,2	Ns
Dislipidemia	38	79,2	35	71,4	Ns
Diabetes tipo 2	11	22,9*	20	40,8*	p=0,047
Esteatosis hepática	31 ⁺	33,7	38 ⁺	41,3	Ns
Hiperuricemia	23	47,9	25	51	Ns
Síndrome metabólico	23	47,9	31	63,3	Ns
Enfermedad cardiovascular	3	6,3	5	10,2	Ns
	Media	DE	Media	DE	Prueba T
HOMA-IR	5,2*	2,3	7,1*	4,7	p=0,021
Edad (años)	47,9	9,7	47,8	9,7	Ns

N = número de casos; DE = desviación estándar; *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre los grupos en la prueba T. Ns: no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos. + Faltan datos de varios sujetos en este parámetro, % ajustado al número de sujetos con información disponible.

Por otro lado, no se identificaron diferencias significativas en los datos de composición corporal obtenidos por bioimpedanciometría al comparar los subgrupos de pacientes en base al estado de colonización (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados antropométricos obtenidos por bioimpedancia eléctrica en función de la colonización intestinal por parásitos (n=97).

M. antropométricas	Colonizados		No colonizados		Prueba T
	Media	SD	Media	SD	
<i>IMC (kg/m²)</i>	46,2	6,3	45,2	6,7	Ns
<i>C.Abd (cm)</i>	132,7	13,3	128,7	14,2	Ns
<i>FM%</i>	50,1	4,9	50,3	5,2	Ns
<i>FFM%</i>	49,9	4,9	49,7	5,2	Ns
<i>SKM%</i>	27,8	2,9	27,7	3,2	Ns
<i>Área de grasa visceral</i>	260,4	30,2	257,9	35,8	Ns
<i>Ángulo de fase</i>	5,3	0,7	5,4	0,7	Ns

IMC =índice de masa corporal; C.Abd= circunferencia abdominal; DE = desviación estándar; FM%: masa grasa %; FFM%; masa libre de grasa %, SKM%, masa muscular esquelética %; VFA: zona grasa visceral. DE: desviación estándar. Ns: no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos.

4.9.1.1 Biomarcadores de inflamación

Los resultados de parámetros inflamatorios aparecen mostrados en la Tabla 24. Fue destacable que los participantes en el estudio presentaban niveles ligeramente elevados de proteína C-reactiva y de ferritina. Atendiendo a los niveles plasmáticos de TNF- α , éstos fueron muy variables, mientras que los de IL-1 β e IL-6 eran excepcionalmente bajos o indetectables. Treinta y siete muestras arrojaron valores de IL-1 β por debajo del límite de detección, mientras que sólo 3 muestras arrojaron resultados positivos para IL-6.

Tabla 24. Biomarcadores de inflamación en la población de estudio.

Biomarcadores	Media	DE
<i>Proteína C reactiva (mg/L)</i>	8,4	7,0
<i>Ferritina (ng/mL)</i>	143,4	124,2
<i>Ceruloplasmina (mg/dL)</i>	27,9	7,9
	Mediana	1C, 3C
<i>IL-1β (pg/mL)</i>	1,3	0, 3,4
<i>IL-6 (pg/mL)</i>	0	0, 0
<i>TNF-α (pg/mL)</i>	25,4	9,1, 105,7

DE = desviación estándar, 1C, 3C: primer y tercer cuartil.

Se encontraron niveles ligeramente más altos de proteína C-reactiva en sujetos obesos tipo III respecto a los de tipo II, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas, debido al pequeño número de participantes en el último grupo (Tabla 25). Por otro lado, al analizar los biomarcadores en función del estado de colonización por los eucariotas unicelulares, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los biomarcadores inflamatorios, ni en los niveles de citoquinas proinflamatorias (Tabla 25).

Tabla 25. Biomarcadores de inflamación en función del tipo de obesidad y del estado de colonización.

Biomarcadores	Tipo de obesidad				WT
	Tipo II (n=14)		Tipo III (n=83)		
	Media	DE	Media	DE	
Proteína C reactiva (mg/L)	6,1	5,5	8,8	7,1	Ns
Ferritina (ng/mL)	117,67	94,1	147,1	128,0	Ns
Ceruloplasmina (mg/dl)	28,8	4,0	27,8	8,4	Ns
	Mediana	1C,3C	Mediana	1C,3C	
IL-1 β (pg/mL)	2,3	0, 3,7	0,8	0, 2,8	Ns
TNF- α (pg/mL)	26,1	9,7, 105,7	26,6	9,3, 105,6	Ns
	Estado de colonización				WT
	Colonizados (n=48)		No colonizados (n=49)		
	Media	DE	Media	DE	
Proteína C reactiva (mg/L)	8,1	7,6	8,7	6,4	Ns
Ferritina (ng/mL)	142,7	112,0	144,1	137,1	Ns
Ceruloplasmina (mg/dl)	27,1	5,3	28,7	9,8	Ns
	Mediana	1C,3C	Mediana	1C,3C	
IL-1 β (pg/mL)	0,8	0, 3,0	0,9	0, 3,2	Ns
TNF- α (pg/mL)	31,3	9,3, 86,3	24,3	10,2, 108,1	Ns

DE: desviación estándar; 1C, 3C: primer y tercer cuartil; WT: Prueba de rank sum test de Wilcoxon. Ns: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre subgrupos.

Cuando los participantes fueron clasificados según la especie parásita que los colonizaba, se observó una tendencia no significativa hacia niveles más bajos de proteína C-reactiva en aquellos positivos para *Blastocystis* sp., pero sin diferencias significativas en ningún parámetro inflamatorio (Tabla 26).

Tabla 26. Biomarcadores de inflamación en colonizados clasificados por la especie parásita.

Biomarcadores	<i>G. intestinalis</i> (n=9)	<i>Blastocystis sp.</i> (n=41)	<i>D. fragilis</i> (n=10)	WT
	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)	
<i>Proteína C reactiva</i> (mg/L)	10,7 (11,5)	8,3 (7,8)	11,1 (10,8)	Ns
<i>Ferritina</i> (ng/mL)	129,3 (180,7)	149,3 (115,5)	170,8 (56,9)	Ns
<i>Ceruloplasmina</i> (mg/dl)	29,3 (5,7)	27,2 (5,8)	28,7 (3,5)	Ns
	Mediana (1C, 3C)	Mediana (1C, 3C)	Mediana (1C, 3C)	
<i>IL-1β</i> (pg/mL)	2,1 (0,4, 2,9)	0,98 (0, 3,1)	0,2 (0,1, 1,8)	Ns
<i>TNF-α</i> (pg/mL)	38,6 (6,2, 154,4)	34,6 (9,6, 92,8)	14,0 (1,5, 46,0)	Ns

DE: desviación estándar; 1C, 3C: primer y tercer cuartil; WT: Prueba de rank sum test de Wilcoxon de la comparación con sujetos negativos para cada uno de los parásitos. Ns: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre subgrupos.

Finalmente, se estratificó a los participantes en función de dos comorbilidades metabólicas muy prevalentes: resistencia a la insulina y presencia de EHGNA. Los resultados de parámetros inflamatorios aparecen en la Tabla 27 desglosados en función de estas comorbilidades. Es destacable que se obtuvieron niveles significativamente más altos de proteína C-reactiva entre los sujetos resistentes a la insulina, junto con niveles significativamente más altos de ferritina entre los que sufrían EHGNA; no se detectaron diferencias significativas en los niveles de citoquinas inflamatorias atendiendo a la presencia del resto de comorbilidades metabólicas.

Tabla 27. Biomarcadores inflamatorios en función de algunas comorbilidades metabólicas.

Biomarcadores	Sensibilidad a la insulina		WT
	Resistente	Sensible	
Proteína C reactiva (mg/L)	6,4*	3,7*	p=0,025
Ferritina (ng/mL)	215,1	101,0	Ns
Ceruloplasmina (mg/dL)	25,5	26,0	Ns
IL-1 β (pg/mL)	1,0	2,6	Ns
TNF- α (pg/ml)	12,0	49,9	Ns
	EHGNA		
	Presente	Ausente	
Proteína C reactiva (mg/L)	5,7	3,5	Ns
Ferritina (ng/ml)	155,8*	87,6*	p=0,009
Ceruloplasmina (mg/dL)	26,0	28,0	Ns
IL-1 β (pg/ml)	1,9	2,4	Ns
TNF- α (pg/ml)	16,9	33,4	Ns

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre los grupos. WT: Prueba de suma de rango de Wilcoxon. Ns: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre subgrupos.

4.9.1.2 Serie blanca e inmunoglobulinas plasmáticas

A partir del análisis hematimétrico se obtuvo el recuento de glóbulos blancos de los participantes, desglosado en recuento de neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y monocitos. Se obtuvo un recuento absoluto significativamente mayor tanto de eosinófilos como de monocitos en sujetos colonizados *vs.* no colonizados, mientras que el recuento absoluto de leucocitos, neutrófilos y linfocitos no mostró diferencias en base a esta variable (Tabla 28). Al subanalizar por especies parásitas, estas diferencias sólo permanecieron significativas al comparar el grupo de los no colonizados frente al positivo para *Blastocystis* sp.

Tabla 28. Recuento de la serie blanca y niveles de inmunoglobulinas en función del estado de colonización intestinal.

	NC	Col	Prueba T	Blas	Prueba T	GI	DF
Leucocitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	7,5	7,8	Ns	7,8	Ns	8,4	7,3
Neutrófilos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	4,1	4,6	Ns	4,5	Ns	5,0	4,2
Linfocitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	3,17	2,28	Ns	2,6	Ns	2,3	2,3
Eosinófilos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	0,16*	0,24*	p=0,018	0,24*	p=0,021	0,25	0,24
Monocitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	0,46*	0,61*	p=0,002	0,60*	p=0,010	0,58	0,58
			WT	WT			
IgA (mg/dL)	289,2	265,0	Ns	273,4	Ns	218,3	249,1
IgE (kUA/L)	47,0	70,0	Ns	62,0	Ns	83,0	62,0

NC= no colonizados; Col= colonizados; Blas=*Blastocystis* sp.; DF= *D. fragilis*; GI= *G. intestinalis*; *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre los grupos en la prueba T al comparar con no colonizados. Ns: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre subgrupos. WT: prueba de suma de rango de Wilcoxon.

En la tabla anterior también se muestran los niveles plasmáticos medios de las inmunoglobulinas A y E. Como se puede apreciar, existía una tendencia hacia niveles más bajos de IgE en los participantes no colonizados, pero sin clara correlación con una especie parásita concreta. Asimismo, se observaron valores de inmunoglobulinas por encima del rango normal en 11 pacientes para la IgA y en 29 participantes para la IgE.

4.9.1.3 Biomarcadores de estrés oxidativo

Los resultados de los parámetros de estrés oxidativo obtenidos se analizaron de manera comparativa, atendiendo a una serie de variables descritas como con capacidad de modificar el estatus redox de un individuo. No se encontraron diferencias significativas entre subgrupos atendiendo a las variables sexo, edad, tabaquismo activo, ni tipo de obesidad. Sin embargo, existía una tendencia hacia niveles más altos de NOX y más bajos de SOD-3 entre los obesos tipo III, en comparación con los obesos tipo II.

A continuación, se procedió a clasificar a los participantes en tres estratos en función de los niveles plasmáticos de las vitaminas antioxidantes A y E: niveles deficitarios, óptimos o altos de estas vitaminas. Se compararon los niveles de biomarcadores redox entre ellos, hallando diferencias significativas en los niveles de TAC en lo que respectaba a la situación de suficiencia de vitamina E, con niveles más altos de este parámetro conforme aumentaban los niveles plasmáticos de vitamina E (Tabla 29).

Tabla 29. Biomarcadores redox en función de la suficiencia plasmática para las vitaminas A y E.

Biomarcadores	Niveles plasmáticos vitamina A (mcg/dL)			AT
	Déficit (<42)	Óptimo (42-68)	Exceso (>68)	
MDA (ng/mL)	421,9	410,67	424,88	0,93
Ratio GSH/GSSG	0,38	0,36	0,37	0,95
TAC (mM)	2,680	3,449	3,178	0,13
SOD-3 (U/mL)	1,081	1,630	1,273	0,28
NOX (µg/mL)	26,8	33,0	34,5	0,11
	Niveles plasmáticos vitamina E (mcg/mL)			AT
	Déficit (<8.6)	Óptimo (8.6-13)	Exceso (>13)	
MDA (ng/mL)	442,0	379,6	426,3	0,16
Ratio GSH/GSSG	0,16	0,37	0,36	0,46
TAC (mM)	1,611*	2,949*	3,355*	p=0,02
SOD-3 (U/mL)	0	1,289	1,444	0,35
NOX (µg/mL)	26,9	31,3	32,8	0,83

AT= test de ANOVA; *estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre grupos en la prueba ANOVA.

Por otro lado, la Tabla 30 y la Figura 16 muestran los biomarcadores redox estratificados en función del estado de colonización por los eucariotas unicelulares del estudio. Sorprendentemente, los sujetos colonizados mostraron niveles significativamente más altos de TAC ($p=0,009$), un índice GSH/GSSG más bajo ($p=0,034$) y una tendencia no significativa hacia niveles más altos de SOD-3. Los niveles plasmáticos de los antioxidantes vitamina A y E fueron similares independientemente del estado de colonización.

Tabla 30. Biomarcadores redox en función del estado de colonización y de las especies intestinales parásitas.

Biomarcadores	Colonizados (n=48)		No colonizados (n=49)		Prueba T
	Media	DE	Media	DE	
MDA (ng/mL)	408,5	72,4	424,0	103,4	0,53
GSH/GSSG	0,33*	0,16	0,40*	0,16	$p=0,034^*$
TAC (mM)	3,57*	1,11	2,93*	1,09	$p=0,009^*$
SOD-3 (U/mL)	1,65	1,2	1,24	1,1	0,10
NOX ($\mu\text{g/mL}$)	29,9	15,2	34,7	18,0	0,34
VitA ($\mu\text{g/dL}$)	55,1	12,1	60,3	23,9	0,65
VitE ($\mu\text{g/mL}$)	15,8	3,8	17,1	5,3	0,34
	B/DF (n=35)		GI (n=9)		Prueba T
MDA (ng/mL)	402,1		436,2		0,46
GSH/GSSG	0,33		0,33		0,53
TAC (mM)	3,69		3,11		0,16
SOD-3 (U/mL)	1,81		0,97		0,053
NOX ($\mu\text{g/mL}$)	29,9		30,2		0,98
VitA ($\mu\text{g/dL}$)	56,5		49,3		0,17
VitE ($\mu\text{g/mL}$)	15,9		15,4		0,75

B/DF= *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* positivos después de excluir sujetos coinfectados con *G. intestinalis*; GI= *G. intestinalis*; DE = desviación estándar *Estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos en la prueba T.

Si se analizaban estos datos por especie parásita concreta, al comparar los sujetos positivos para *G. intestinalis* frente a los positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*, se detectaba una respuesta antioxidante reducida en el primer subgrupo, mostrada por una tendencia no significativa hacia una menor actividad de SOD-3 y de TAC (Tabla 30 y Figura 16), junto con niveles más altos de MDA entre los positivos a *G. intestinalis* que en el resto de participantes en el estudio. Este hallazgo sugería una respuesta antioxidante más fuerte entre los sujetos colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* que por los portadores de *G. intestinalis*.

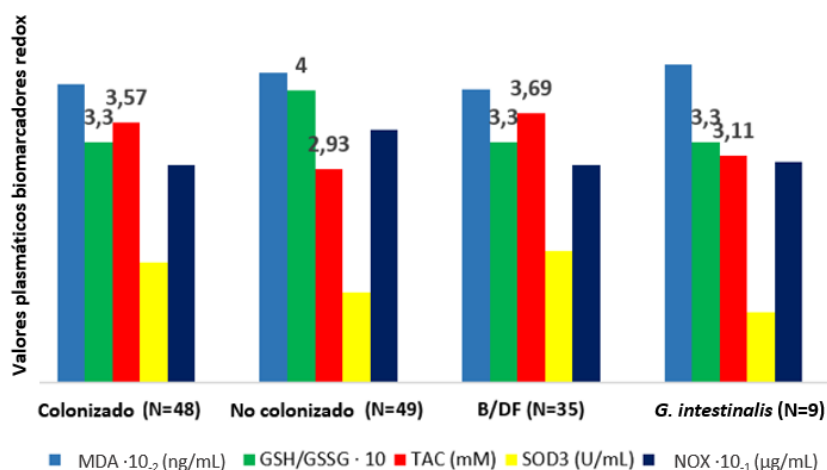


Figura 16. Biomarcadores redox en función del estado de colonización y las especies parásitas. B/DF= *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* positivos después de excluir sujetos coinfectados con *G. intestinalis*.

De forma similar a como se ha expuesto anteriormente en el apartado de biomarcadores inflamatorios (4.9.1.1), se analizaron los marcadores redox en base a dos comorbilidades metabólicas: resistencia a la insulina y EHGNA (Tabla 31). Así, los sujetos resistentes a la insulina mostraron una relación GSH/GSSG significativamente más alta, una mayor actividad SOD-3 y niveles de NOX más elevados que aquellos sensibles a la insulina. Por otro lado, los participantes que presentaban EHGNA ecográficamente presentaron

una relación GSH/GSSG más alta y niveles de NOX más elevados que los participantes que no la presentaron. No se obtuvieron tales resultados con respecto a la DT2 u otras comorbilidades.

Tabla 31. Biomarcadores redox en función de la insulín-resistencia y la presencia de EHGNA.

Biomarcadores	Insulín-resistencia		Test T
	Resistente	Sensible	
MDA (ng/mL)	411,1	407,9	0,82
GSH/GSSG	0,388*	0,297*	<i>p=0,011*</i>
TAC (mM)	3,29	3,16	0,59
SOD-3 (U/mL)	1,66*	1,04*	<i>p=0,025*</i>
NOX (µg/mL)	36,7*	25,3*	<i>p=0,01*</i>
Biomarcadores	Situación de EHGNA		Test T
	Presente	Ausente	
MDA (ng/mL)	412,2	420,3	0,25
GSH/GSSG	0,383*	0,303*	<i>p=0,045*</i>
TAC (mM)	3,28	3,15	0,60
SOD-3 (U/mL)	1,47	1,35	0,61
NOX (µg/mL)	34,9*	24,5*	<i>p=0,002*</i>

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre grupos en la prueba T.

Dado que el estrés oxidativo puede ser modificado tanto por la presencia de los parásitos intestinales, como por el estado metabólico, agrupamos a los participantes en el estudio en cuatro subgrupos, definidos por la presencia de colonización intestinal y por la de resistencia a la insulina (Tabla 32).

Tabla 32. Biomarcadores redox en función de la sensibilidad a la insulina y el estado de colonización.

Biomarcadores	Insulín-resistentes		Test T
	Col (n=30)	NC (n=29)	
MDA (ng/mL)	414,5	407,7	0,78
Ratio GSH/GSSG	0,33*	0,45*	<i>p=0,007*</i>
TAC (mM)	3,59*	2,97*	<i>p=0,022*</i>
SOD-3 (U/mL)	1,84	1,48	0,25
NOX (µg/mL)	33,3	39,8	0,19

	<i>Insulin-sensibles</i>		<i>Test T</i>
	<i>Col (n=15)</i>	<i>NC (n=11)</i>	
<i>MDA (ng/mL)</i>	396,6	426,1	0,22
<i>Ratio GSH/GSSG</i>	0,33	0,26	<i>p=0,024*</i>
<i>TAC (mM)</i>	3,64*	2,54*	<i>p=0,04*</i>
<i>SOD-3 (U/mL)</i>	1,12	0,82	0,43
<i>NOX (µg/mL)</i>	25,4	24,8	0,89

NC= no colonizados; Col= colonizados *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre grupos.

Tras este subanálisis, los sujetos que presentaron los niveles más altos de TAC fueron los colonizados, tanto en el grupo de resistentes como de sensibles a la insulina (Figura 17), siendo estas diferencias estadísticamente significativas en la comparación por subgrupos. Por su parte, la relación GSH/GSSG tenía un comportamiento inverso en función de la resistencia a la insulina, siendo máxima en los insulin-resistentes y no colonizados y mínima en los insulin-sensibles y no colonizados. El nivel de NOX y la actividad de SOD-3 se mantuvieron similares independientemente del estado de colonización.

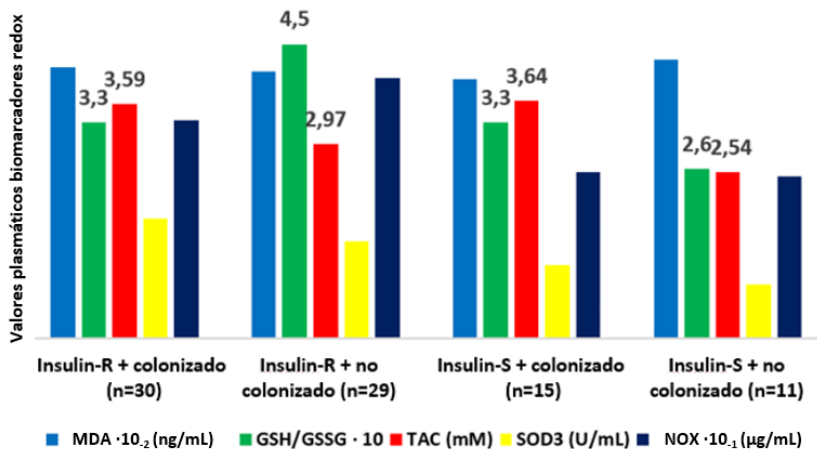


Figura 17. Biomarcadores redox en función de la sensibilidad a la insulina y el estado de colonización por parásitos intestinales. *Insulin-R*= *insulin-resistentes*; *Insulin-S*= *insulin-sensibles*.

Finalmente, se realizó un modelo de regresión lineal para determinar si existía una asociación entre los biomarcadores redox e inflamatorios y los niveles de

algunas mediciones bioquímicas y antropométricas. Los resultados obtenidos mostraron una asociación positiva y fuerte entre los niveles de MDA y los índices HOMA-IR, y asociaciones negativas con los niveles plasmáticos de leptina y vitamina A. Además, se detectaron correlaciones positivas débiles entre los niveles de NOX y la ferritina plasmática y entre la actividad de SOD-3 y los niveles plasmáticos de proteína C-reactiva. Por último, los niveles de TAC mostraron una tendencia casi significativa hacia una correlación inversa con el % de masa grasa obtenido del análisis de bioimpedancia. Estos resultados se muestran más detalladamente en la Tabla 33.

Tabla 33. Correlación entre los marcadores redox y las mediciones bioquímicas y antropométricas.

Correlación	Estimación	Intervalo de confianza	p-valor
<i>MDA y HOMA-IR</i>	10,08	[3,5, 16,67]	0,003*
<i>MDA y leptina plasmática</i>	-0,92	[-1,70, -0,15]	0,020*
<i>MDA y vitamina A plasmática</i>	-1,7	[-2,92, -0,48]	0,007*
<i>NOX y ferritina plasmática</i>	0,043	[0,005, 0,081]	0,028*
<i>Niveles de SOD-3 y PC-R plasmática</i>	0,05	[0,007, 0,096]	0,025*
<i>TAC y % de masa grasa</i>	0,123	[-0,247, 0,001]	0,052

4.10 Resultados del análisis metagenómico de la comunidad bacteriana intestinal

De la muestra total de pacientes que constituyen este estudio, se obtuvieron resultados de análisis metagenómico de **56 sujetos**, 36 mujeres y 20 varones, cuya edad media fue de $48,1 \pm 9,8$ años.

De éstos, 31 participantes (55,3%) mostraban colonización por los parásitos unicelulares intestinales de interés en el estudio, con las mismas especies descritas que con anterioridad. Concretamente, la prevalencia fue: *Blastocystis* sp. 46,4%, *Giardia intestinalis* 16,1% y *Dientamoeba fragilis* 8,9%, con 5 casos de colonización mixta *Blastocystis* sp./*G. intestinalis*, 2 casos de *Blastocystis* sp./*D. fragilis* y 1 caso colonizado por las tres especies.

El grupo de sujetos colonizados por un eucariota unicelular fue comparable con el grupo no colonizado en términos de edad, sexo, comorbilidades metabólicas, consumo de reemplazo de comidas y tabaquismo. Sin embargo, los participantes colonizados fueron significativamente más obesos (IMC $47,3$ vs. $43,4$ kg/m², $p=0,025$). A continuación, se muestran (Tabla 34) los datos de interés de este subgrupo de pacientes, estratificados según el estado de colonización.

Tabla 34. Comparación de las variables sociodemográficas, antropométricas y clínicas en función de la colonización intestinal.

	Colonizados (n=31)	No colonizados (n=25)
	N (%)	N (%)
Mujeres	19 (61,3)	17 (68,0)
Hombres	12 (38,7)	8 (32,0)
Edad (años)	47,8 (10,3)	48,6 (9,3)
IMC (kg/m ²)	47,3 (6,7)	43,4 (5,8)
C. Abd (cm)	132,4 (11,6)	126,9 (15,4)
Obesidad tipo II	3 (9,7)	6 (24,0)
Obesidad tipo III	28 (90,3)	19 (76,0)
Fumadores	11 (35,5)	4 (16,0)
Sustitutos de comidas	11 (35,5)	11 (44,0)
Uso regular de IBP	3 (9,7)	5 (20,0)
Colecistectomía previa	1 (3,2)	4 (16,0)

Hipertensión	14 (45,2)	16 (64,0)
Dislipidemia	25 (80,6)	16 (64,0)
DT2	8 (25,8)	11 (44,0)
Esteatosis hepática	10⁺ (37,0)	5 (20,0)
Hiperuricemia	15 (48,4)	11 (44,0)
Síndrome metabólico	15 (48,4)	14 (56,0)
R. insulina	17 (56,7)	12 (63,2)

IMC= Índice de masa corporal; Cabd= circunferencia abdominal; IBP= inhibidores de la bomba de protones; DT2= Diabetes mellitus tipo 2. R. insulina = resistencia a la insulina. Los números en negrita indican significación en el nivel de 0,05 entre grupos. +Faltan datos de 4 sujetos.

4.10.1.1 Factores de confusión asociados a cambios en la microbiota intestinal

El 25,0% de los participantes presentaba tabaquismo activo en el momento del estudio, 14,3% hacían consumo regular de inhibidores de la bomba de protones, mientras que cinco pacientes (8,9%) tenían antecedentes de colecistectomía. Por otro lado, siete participantes (12,5%) habían sido diagnosticados recientemente de colonización gástrica por *Helicobacter pylori*. Finalmente, 22 sujetos (42,3%) estaban tomando al menos un sustituto de comida comercial al día durante el mes anterior a la muestra fecal. Como muestra la Tabla 34, en ninguna de estas variables existían diferencias entre los subgrupos determinados por el estado de colonización por microeucariotas.

4.10.1.2 Riqueza de la microbiota intestinal

Tras analizar todas las muestras fecales, se obtuvo una media de 188.847 secuencias genéticas crudas. Después de someter estas secuencias al protocolo de evaluación de calidad incluido en la DADA2 *pipeline* (filtrado de calidad inicial, *denoising*, unión de extremos pareados y filtrado químico) el número medio de lecturas se redujo a 136.840 (73,1% de las entradas no químicas). El conjunto de datos final obtuvo 3.783 variantes únicas de amplicones, distribuidas en 13 filos, 96 familias, 330 géneros y 668 especies conocidas.

Se evidenció una tendencia hacia un mayor número de lecturas en sujetos colonizados con un parásito eucariota unicelular, lo que resultó estadísticamente significativo en el subgrupo de positivos para *Blastocystis* sp. (Tabla 35).

Tabla 35. Número de lecturas en función de la colonización por parásitos intestinales eucariotas.

	N.º lecturas	1C, 3C	p-valor
No colonizados (n=25)	118 374	[102 180, 134 796]	0,057
Colonizados (n=30)	132 459	[114 380, 153 853]	
<i>Blastocystis</i> sp. negativos (n=30)	118 070	[104 699, 134 413]	0,038*
<i>Blastocystis</i> sp. positivos (n=26)	136 282*	[118 027, 154 792]	
<i>G. intestinalis</i> positivos (n=9)	124 533	[108 363, 147 966]	0,938
<i>G. intestinalis</i> negativos (n=47)	129 192	[109 766, 145 651]	
<i>D. fragilis</i> negativos (n=51)	128 644	[109 293, 143 190]	0,384
<i>D. fragilis</i> positivos (n=5)	143 983	[113 766, 157 903]	

*Estadísticamente significativo entre grupos en la prueba T. 1C= primer cuartil; 3C= tercer cuartil.

Asimismo, se identificó un recuento significativamente menor de secuencias entre los participantes que sufrían de EHGNA frente a los que no padecían esta enfermedad (Tabla 36).

Tabla 36. Número de lecturas en función de la presencia de EHGNA.

	N.º lecturas	1C, 3C	p-valor
Sin EHGNA	140 395	[132 075, 157 609]	0,002*
Con EHGNA	118 374*	[102 767, 133 840]	

*Estadísticamente significativo entre grupos en la prueba T. 1C= primer cuartil; 3C= tercer cuartil.

4.10.1.3 Índices de diversidad de la estructura bacteriana intestinal

Para evaluar la diversidad alfa de la estructura bacteriana empleamos dos índices de uso habitual a nivel de género: el índice de Chao1 y el índice de Shannon. Para analizar la diversidad beta de la estructura bacteriana utilizamos los índices de Jaccard y de Sorensen.

Se realizó un análisis comparativo de los índices de alfa diversidad de la muestra de sujetos estudiada, atendiendo a diferentes variables clínicas. No se identificaron diferencias condicionadas por la ingestión de sustitutos de comidas ni por el consumo regular de IBP. Los participantes que eran más gravemente obesos mostraron índices de diversidad alfa más bajos que los menos obesos, aunque de manera no significativa (obesidad tipo III: *Chao1*: 126,2 y *Shannon*: 3,1 vs. obesidad tipo II *Chao1*: 109,8 y *Shannon*: 2,84). También se realizó un análisis de los índices de alfa diversidad en función de la composición cualitativa de la dieta, sin encontrarse diferencias entre subgrupos en función de la ingesta adecuada de macronutrientes.

4.10.1.3.1 En función de la colonización intestinal por eucariotas unicelulares

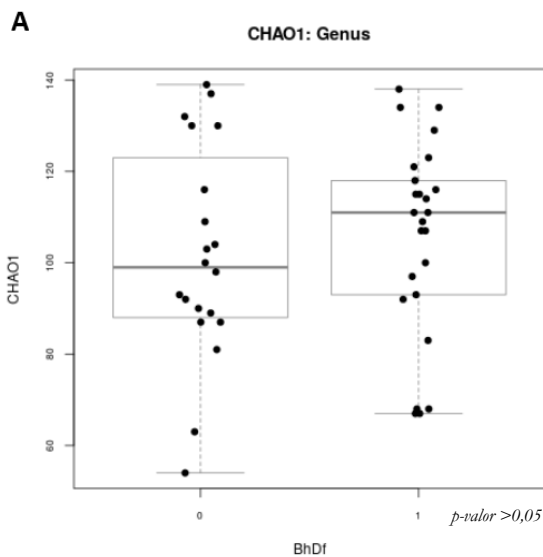
Al comparar los índices de alfa diversidad entre los pacientes que albergaban parásitos intestinales con aquellos que no lo hacían, no se detectaron diferencias significativas en términos generales. Sin embargo, si se analizaban los resultados de manera desglosada en función de la especie de parásito presente, existía una tendencia no significativa hacia índices de alfa-diversidad más altos en sujetos positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*, en comparación con el de los colonizados por *G. intestinalis* (datos recogidos en la Tabla 37).

Tabla 37. Índices de diversidad alfa y beta a nivel de género categorizados por colonización y especies parásitas.

	No colonizados (n=25)	B/DF (n=22)	G. intestinalis (n=9)
<i>Chao1</i>	109,8	119,1	103,3
<i>Shannon</i>	2,89	2,94	2,72
<i>Jaccard</i>	0,443	0,477	0,376
<i>Sorensen</i>	0,599	0,632	0,520

B/DF = positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* después de excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*

Esta tendencia hacia índices de diversidad alfa distintos en función de la especie parásita que coloniza el ecosistema intestinal se puede apreciar en la Figura 18; en ésta aparece representada la distribución de los índices Chao1 y Shannon comparando sujetos no colonizados, frente a colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*.



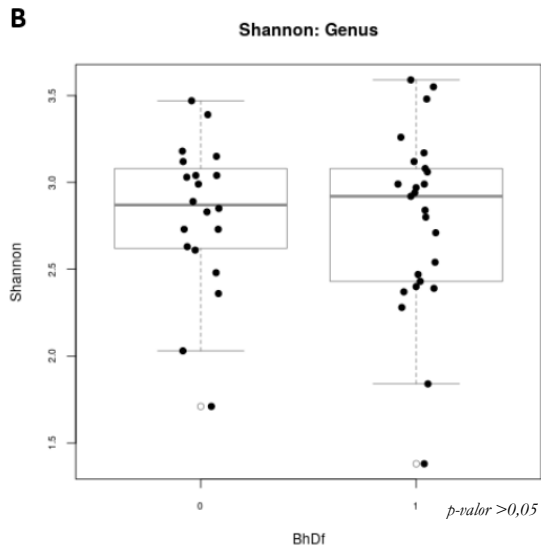


Figura 18 Diagrama de cajas comparando los índices de diversidad alfa a nivel de género en sujetos no colonizados (0) frente a colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* (1). A: distribución del índice Chao1. B: distribución del índice Shannon.

Por su parte, la Figura 19 representa la distribución de los índices Chao1 y Shannon comparando los participantes no colonizados frente a aquellos positivos para *G. intestinalis*.

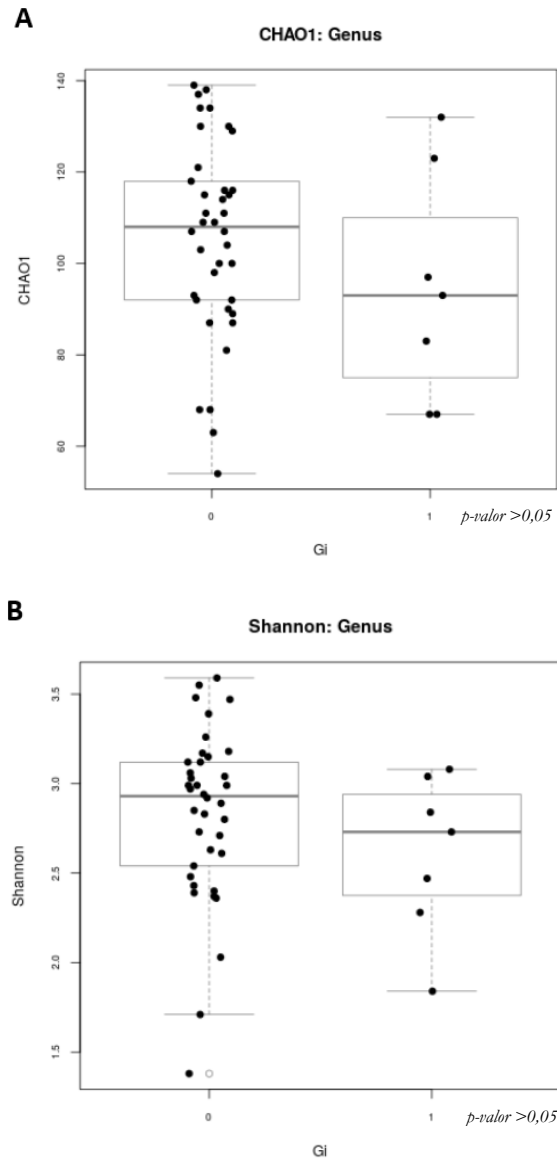


Figura 19. Diagrama de cajas comparando los índices de diversidad alfa a nivel de género en sujetos no colonizados (0) frente a colonizados por *G. intestinalis* (1). A: distribución del índice Chao1. B: distribución del índice Shannon.

Por otro lado, se seleccionó a los pacientes que (en base a la información aportada por los registros dietéticos) cumplieran los requerimientos diarios de los tres macronutrientes: carbohidratos, proteínas y grasas. En base a la información anterior, se realizó un análisis comparativo de los índices de alfa diversidad en función del estado de colonización intestinal por eucariotas unicelulares. No se identificaron diferencias significativas entre subgrupos, si bien la mediana de los pacientes positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. intestinalis* siempre era superior a la del resto (Figura 20).

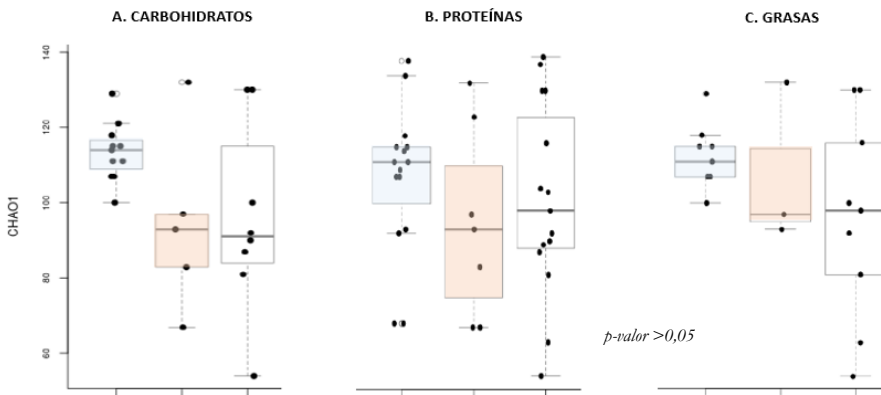


Figura 20. Diagrama de cajas comparando la alfa diversidad a nivel de género mediante el índice Chao1 estratificada en función de la adecuación a la ingesta diaria de macronutrientes (A: ingesta adecuada de carbohidratos; B: ingesta adecuada de proteínas; C: ingesta adecuada de grasas) y de la situación de colonización con parásitos intestinales (azul: positivos a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*; rojo: positivos a *G. intestinalis*; blanco: no colonizados). Las líneas horizontales indican medianas.

Atendiendo a la diversidad beta, los resultados obtenidos mostraron diferencias no significativas entre subgrupos en la estructura de la comunidad bacteriana (datos en la Tabla 37), con mayores índices (indicativos de una mayor variabilidad de géneros) entre los participantes colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*, y mucho menores en los colonizados por *G. intestinalis*. Estas discrepancias en la estructura de la comunidad bacteriana se reflejan en la Figura 21 y en la Figura 22, que se muestran a continuación.

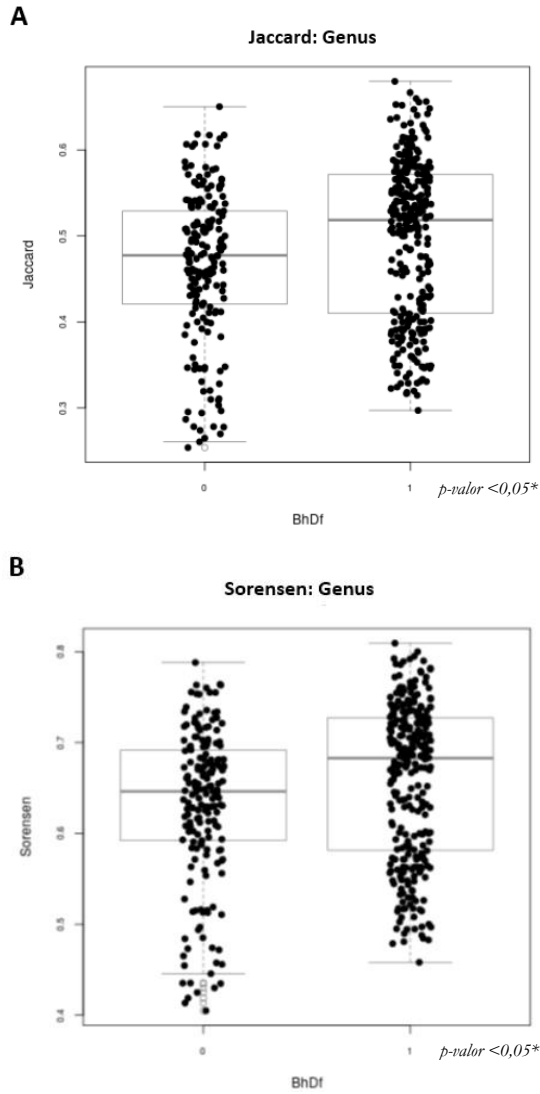


Figura 21. Representación en diagrama de cajas de los índices de diversidad beta en sujetos no colonizados (0) frente a colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* (1). A: distribución del índice Jaccard. B: distribución del índice Sorensen.

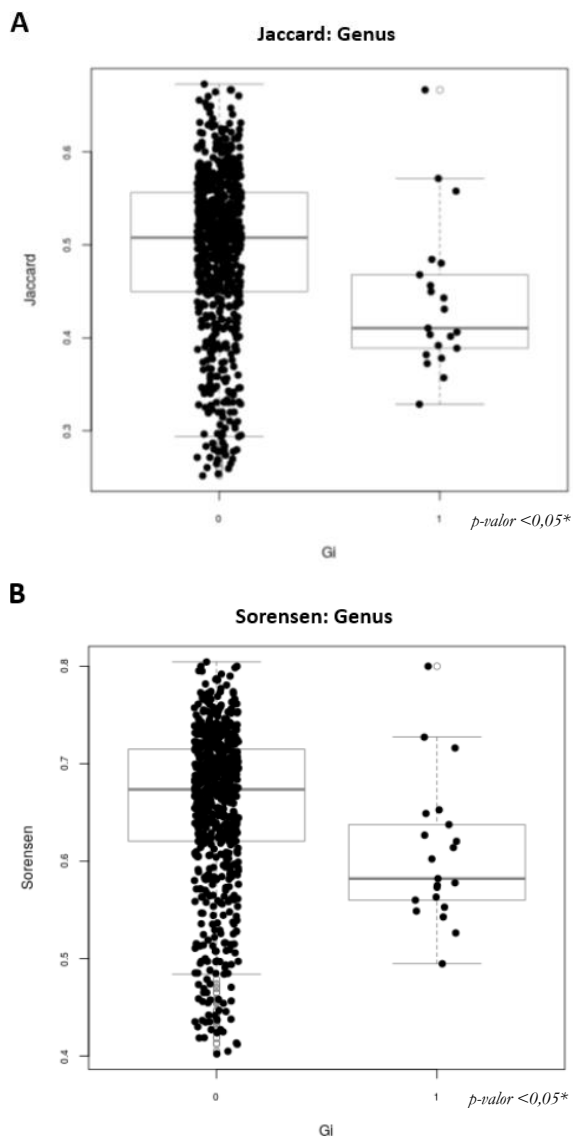


Figura 22. Representación en diagrama de cajas de los índices de diversidad beta en sujetos no colonizados (0) frente a colonizados por *G. intestinalis* (1). A: distribución del índice Jaccard. B: distribución del índice Sorensen.

Finalmente, los gráficos de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) muestran gráficamente las diferencias en la arquitectura de la estructura bacteriana que están condicionadas por las distintas diversidades beta. Cuando los sujetos se agruparon según la colonización intestinal por eucariotas unicelulares, la gráfica PCoA generada no reveló una separación clara de las muestras que permitiera discriminar un patrón diferencial. En la Figura 23 se muestra el PcoA de la estructura bacteriana en función de la colonización y del tipo de especie parásita colonizadora.

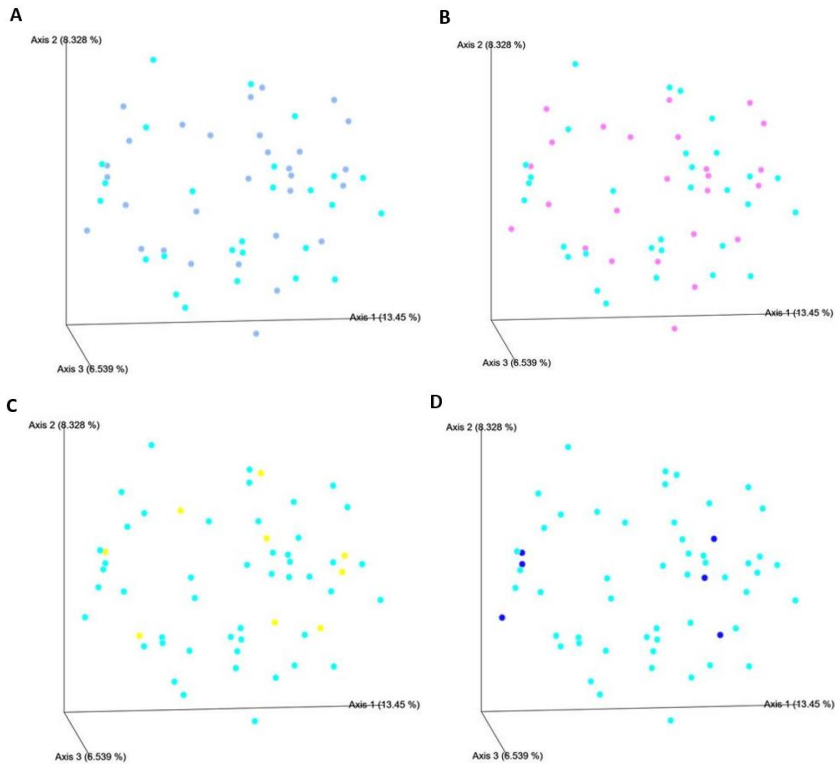


Figura 23. PCoA (Principal Coordinates Analysis) de las comunidades bacterianas intestinales. A: sujetos colonizados (azul zafiro) frente a no colonizados (azul celeste). B: sujetos colonizados por *Blastocystis* sp. (rosa) frente al resto (azul celeste). C: sujetos colonizados por *G. intestinalis* (amarillo) frente al resto (azul celeste). D: sujetos colonizados por *D. fragilis* (azul oscuro) frente al resto (azul celeste).

La Figura 24, por su parte, muestra el PcoA de los sujetos parasitados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* frente al resto de participantes del estudio.

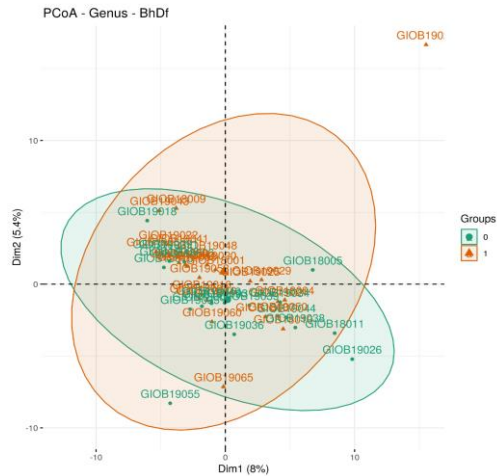


Figura 24. Análisis PCoA de las comunidades bacterianas intestinales estratificada por la presencia (1) y ausencia (0) de colonización por *Blastocystis* sp./*D. fragilis*. Cada punto corresponde a un sujeto donde el color indica su categoría (verde: negativo para colonización; naranja: positivo para colonización).

4.10.1.3.2 En función de la situación metabólica del sujeto

Al comparar los índices de diversidad alfa entre sujetos en función de las diferentes comorbilidades metabólicas recogidas en el estudio, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, la evidencia existente apunta hacia que padecer síndrome metabólico se asocia a un microbioma intestinal menos saludable. Por ello, para un análisis más completo de la diversidad alfa, se agrupó a los participantes del estudio en cuatro subgrupos, determinados tanto por la presencia de colonización por un microeucariota, como por el padecimiento o no de síndrome metabólico (Tabla 38). En este análisis, los valores más altos de alfa diversidad se hallaban en el grupo de participantes metabólicamente sanos y que además albergaban *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* en su ecosistema intestinal; por el contrario, los valores más bajos fueron identificados en aquellos pacientes con síndrome metabólico y sin parásitos intestinales. No obstante, no se alcanzó la significación estadística en estas comparaciones. En la Tabla 38 no se muestran los datos metabólicos combinados de los participantes positivos para *G. intestinalis*, debido a que el bajo número de casos individuales en cada subgrupo no permitió realizar las comparaciones.

Tabla 38. Índices de alfa diversidad a nivel de género categorizados por la presencia de síndrome metabólico y la colonización por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*.

	Síndrome metabólico		Metabólicamente sano	
	No colonizado	B/DF	No colonizado	B/DF
<i>Chao1</i>	104,9	112,5	116,3	124,5
<i>Shannon</i>	2,86	2,74	2,94	3,09

B/DF = positivos a *Blastocystis* sp, y/o *D. fragilis* después de excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*.

A continuación, llevamos a cabo un subanálisis similar atendiendo a la presencia de EHGNA en combinación con la variable de colonización intestinal. De forma coherente con los resultados anteriores, la mayor diversidad se obtuvo en sujetos sin esteatosis hepática (EHGNA negativos) y que eran positivos para la colonización con *Blastocystis* sp, y/o *D. fragilis* (resultados mostrados en la Tabla 39).

Tabla 39. Índices de alfa diversidad a nivel de género categorizados por la presencia de EHGNA y la colonización por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*.

	EHGNA		No EHGNA	
	No colonizado	<i>B/DF</i>	No colonizado	<i>B/DF</i>
<i>Chao1</i>	107,4	110,9	120,0	129,6
<i>Shannon</i>	2,90	2,75	2,89	3,09

B/DF = *Blastocystis* sp, y/o *D. fragilis* positivos después de excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*, EHGNA= enfermedad de hígado graso no alcohólico.

Las diferencias detectadas en los índices de diversidad alfa en función de la colonización y la presencia de comorbilidades metabólicas vienen representadas gráficamente en las siguientes figuras.

La Figura 25 muestra la distribución de los índices de alfa diversidad en función de la presencia de síndrome metabólico. Es destacable que la mediana del valor de los índices es más baja para el subgrupo de positivos a *G. intestinalis* en todos los subgrupos, y la del subgrupo *B/DF* más elevada en todos, salvo en el caso del índice Shannon en sujetos con síndrome metabólico.

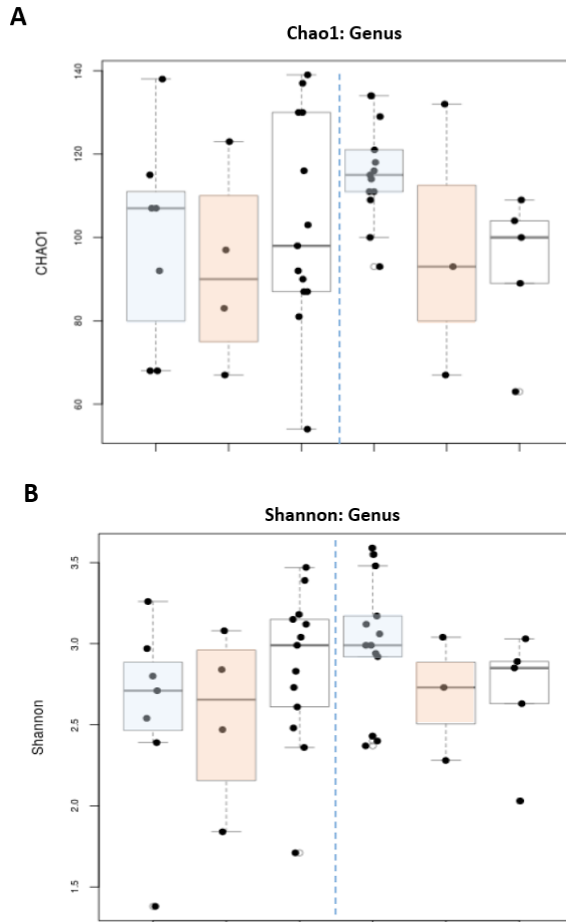


Figura 25. Diagrama de cajas mostrando los índices de alfa diversidad a nivel de género en función de la presencia de síndrome metabólico (izquierda: sujetos con síndrome metabólico; derecha: sujetos metabólicamente sanos) y de colonización por parásitos intestinales (azul: positivos a *Blastocystis* sp., y/o *D. fragilis*; rojo: positivos a *G. intestinalis*; blanco: no colonizados). Las líneas horizontales indican medianas. A: distribución del índice Chao1. B: distribución del índice Shannon.

Por su parte, la Figura 26 muestra la distribución de los índices de alfa diversidad en función de la presencia de EHGNA. Se puede apreciar el mismo fenómeno que en la figura anterior en cuanto a un patrón diferencial en la distribución de la mediana entre subgrupos.

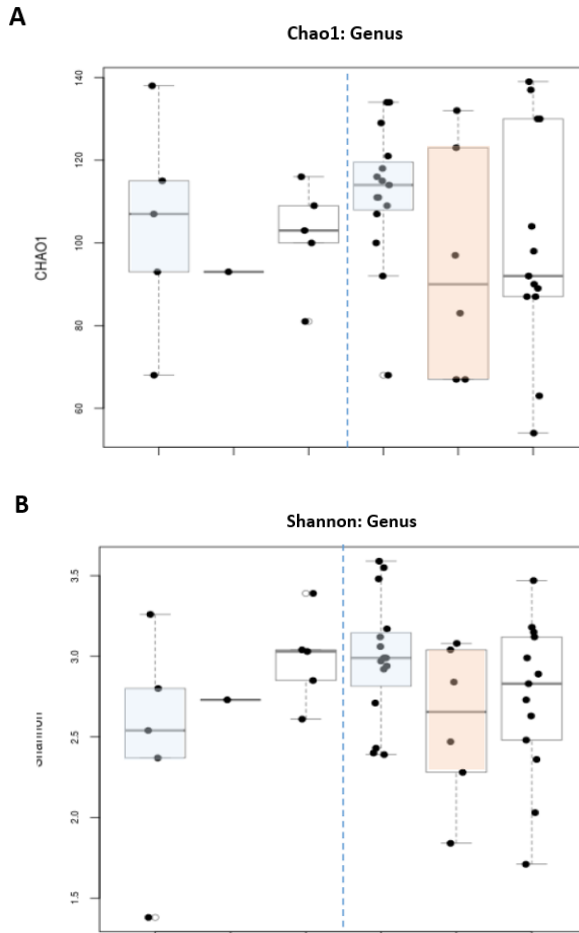


Figura 26. Diagrama de cajas mostrando los índices de alfa diversidad a nivel de género en función de la presencia de EHGNA (izquierda: sujetos con EHGNA; derecha: sujetos sin EHGNA) y de colonización por parásitos intestinales (azul: positivos a *Blastocystis* sp., y/o *D. fragilis*; rojo: positivos a *G. intestinalis*; blanco: no colonizados). Las líneas horizontales indican medianas. A: distribución del índice Chao1. B: distribución del índice Shannon.

Finalmente, se estudió los índices de diversidad alfa atendiendo al resto de comorbilidades metabólicas, de manera estratificada en función de la presencia

de colonización intestinal por eucariotas unicelulares. Si bien no se hallaron diferencias significativas entre subgrupos, la mediana del índice de Chao1 en el positivo para *G. intestinalis* siempre resultaba más baja, y la de los positivos a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* más elevada que la de los no colonizados, que parecían situarse en una situación intermedia de alfa-diversidad (Figura 27).

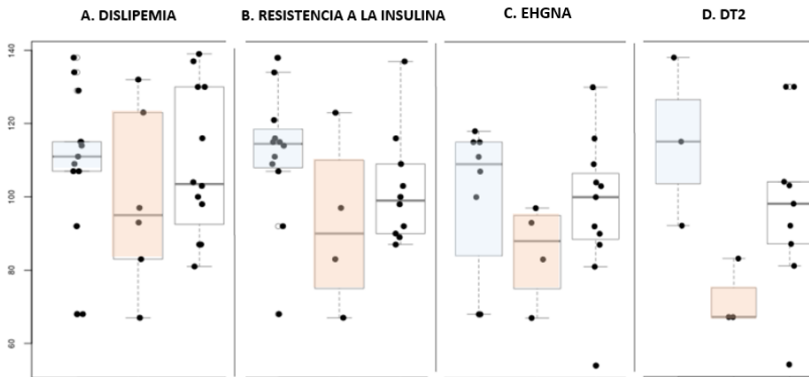


Figura 27. Diagrama de cajas comparando la alfa diversidad a nivel de género mediante índice Chao1 entre sujetos con comorbilidad metabólica, en función de la colonización por parásitos intestinales (azul: positivos a *Blastocystis* sp., y/o *D. fragilis*; rojo: positivos a *G. intestinalis*; blanco: no colonizados). Las líneas horizontales indican medianas.

Para acabar, atendiendo a los índices de diversidad beta, al compararlos por subgrupos en función de las comorbilidades metabólicas padecidas no se identificaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en los pacientes que padecían dislipidemia, esteatosis hepática, resistencia a la insulina y DT2 sí que se detectó un patrón diferencial al estratificarlos en función de la especie parásita colonizadora (Tabla 40). Los índices de Jaccard y de Sorensen medios arrojaban los resultados más bajos en el subgrupo de pacientes positivos para *G. intestinalis*, con diferencias estadísticamente significativas al ser comparados con los sujetos no colonizados en todos los casos. Además, en el colectivo de pacientes con dislipemia y resistencia a la insulina, los resultados de los índices eran estadísticamente más elevados en sujetos positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* que en los no colonizados.

Tabla 40. Índices de beta diversidad a nivel de género en función de las comorbilidades metabólicas y la colonización por especies parásitas intestinales concretas.

	Índice Jaccard		
	No colonizados	B/DF	GI
Síndrome metabólico	0,429	0,400	0,320*
Dislipidemia	0,459	0,475*	0,384*
EHGNA	0,430	0,425	0,331*
Resistencia a la insulina	0,444	0,481*	0,320*
DT2	0,412	0,341	0,279*
	Índice Sorensen		
	No colonizados	B/DF	GI
Síndrome metabólico	0,582	0,542	0,445*
Dislipidemia	0,610	0,622*	0,522*
EHGNA	0,579	0,567	0,459*
Resistencia a la insulina	0,598	0,627*	0,445*
DT2	0,559	0,451	0,393*

EHGNA= enfermedad de hígado graso no alcohólico; DT2= diabetes tipo 2; GI= positivos a *G. intestinalis*; B/DF = positivos a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* después de excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*, *Diferencia estadísticamente significativa con valores $p < 0,05$ al comparar con los no colonizados.

4.10.1.4 Abundancia relativa de taxones en la comunidad bacteriana intestinal

Los filos bacterianos más abundantes en la población estudiada fueron: Bacteroidetes (50,0%), Firmicutes (40,1%), Proteobacteria (6,6%), Actinobacteria (1,2%) y Verrucomicrobia (1,2%). La ratio Firmicutes/Bacteroidetes media fue de 0,95. En la Figura 28 se muestra una representación cuantitativa de la abundancia relativa de filos en cada sujeto incluido en el estudio.

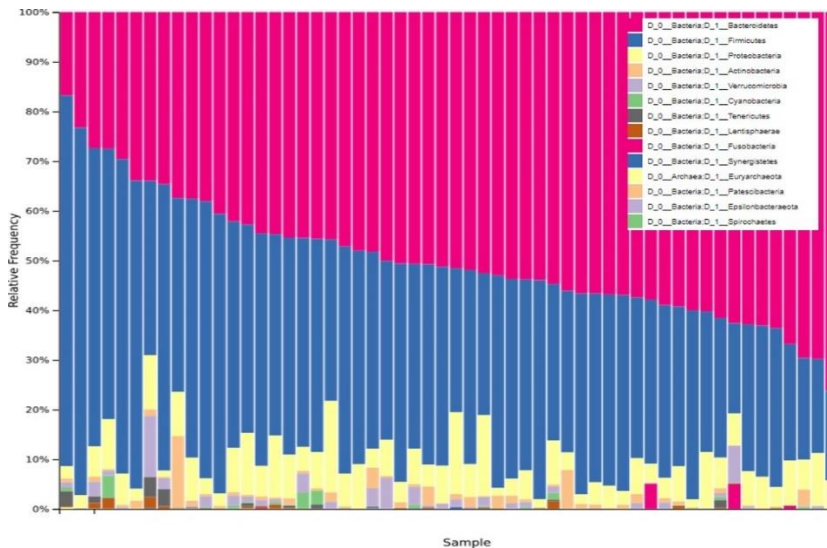


Figura 28. Abundancia relativa de filos en cada participante.

4.10.1.4.1 En función de la colonización intestinal por eucariotas unicelulares

Cuando se realizó un análisis comparativo de los taxones bacterianos del ecosistema intestinal en función de la presencia de los parásitos eucariotas unicelulares, se obtuvieron abundancias relativas y filos dominantes similares entre el grupo de colonizados y de no colonizados. No obstante, dado que las diferentes especies parásitas pueden ejercer modificaciones de la estructura de la microbiota intestinal muy dispares, los resultados se reanalizaron

estratificando a los participantes en función de la especie parásita colonizadora.

De este modo, en el caso de los positivos para *G. intestinalis* se observó una mayor abundancia relativa de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria en comparación con los no colonizados, mientras que lo contrario ocurría con los filos Firmicutes y Actinobacteria (Tabla 41). En cuanto a la ratio Firmicutes/Bacteroidetes, los participantes que albergaban este protozoo mostraron un valor medio más bajo con respecto a los no colonizados por ningún parásito, derivado tanto de la menor abundancia de Firmicutes, como por una mayor de Bacteroidetes. Para los individuos positivos para *Blastocystis* sp./*D. fragilis* se observaron diferencias muy leves en cuanto a la distribución de filos con respecto a los sujetos negativos.

Tabla 41. Abundancia relativa de los principales filos en función del estado de colonización intestinal.

Filos (%)	No colonizados	B/DF	<i>G. intestinalis</i>
Firmicutes	40,1	42,2	35,0
Bacteroidetes	49,8	48,6	53,8
Proteobacteria	6,2	6,5	8,1
Actinobacteria	1,6	0,9	0,8
Verrucomicrobia	1,4	1,0	1,1
Ratio F/B (media ± DE)	0,97 ± 0,8	1,0 ± 0,7	0,68 ± 0,2

B/DF = positivos a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* después de excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*. F/B= Firmicutes/Bacteroidetes; DE= desviación estándar.

En la Figura 29 se muestra gráficamente una distribución de los principales filos del ecosistema intestinal de manera comparativa en función de la positividad para el parásito más frecuentemente hallado, *Blastocystis* sp., sin apreciarse grandes diferencias entre grupos.

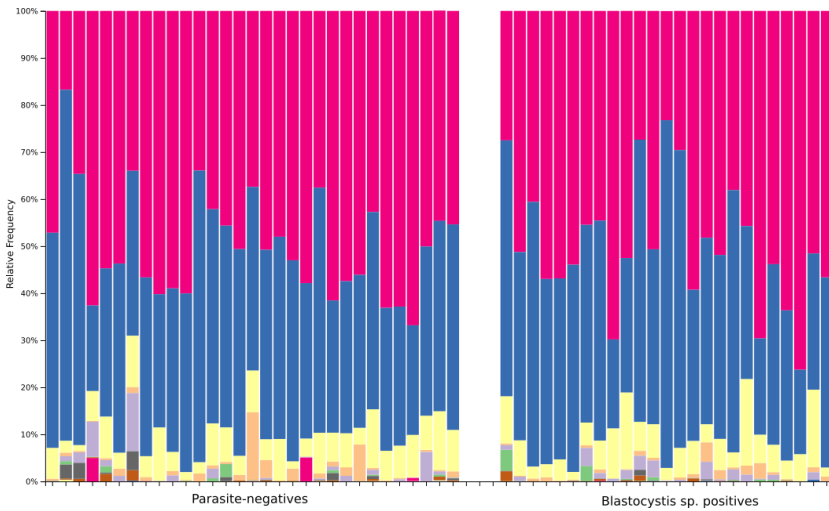


Figura 29. Abundancia relativa de los principales filos agrupados por la colonización por *Blastocystis* sp.

Al comparar la abundancia relativa de taxones a nivel de género, se obtuvieron resultados similares independientemente de la colonización con un eucariota unicelular. Sin embargo, al analizar la presencia especies parásitas concretas, hallamos algunas diferencias significativas entre subgrupos.

- Los positivos para *Blastocystis* sp. presentaron mayores abundancias relativas de los géneros *Pyramidobacter* ($p= 0,022$), *Peptococcus* ($p= 0,027$), *Anaerofilum* ($p= 0,037$) y *Negativibacillus* ($p= 0,04$), y menores abundancias relativas de *Citrobacter* ($p= 0,034$), *Enorma* ($p= 0,04$) y *Ezakiella* ($p=0,04$).
- Los sujetos colonizados por *D. fragilis* mostraron una mayor abundancia relativa de los géneros *Aggregatibacter* ($p= 0,0031$), *Brachyspira* ($p= 0,0075$), *Phoceca* ($p= 0,012$), *Butyrivibrio* ($p= 0,017$), *Pseudoflavonifractor* ($p= 0,01$), *Saccharimonas* ($p= 0,02$) y *Adlercreutzia* ($p= 0,04$), y una menor frecuencia relativa de *Papilibacter* ($p= 0,008$), *Paraprevotella* ($p= 0,035$) y *Snegalimassilia* ($p= 0,04$).
- Finalmente, la presencia de *G. intestinalis* mostró una mayor abundancia relativa de los géneros *Murdochiella* ($p= 0,0009$), *Finegolia*

($p= 0,0009$), *Eubacterium* ($p= 0,005$), *Flavonifractor* ($p= 0,008$), *Sarcina* ($p= 0,01$), *Succiniclasticum* ($p= 0,02$), *Paraeggerthella* ($p= 0,02$), *Oscilibacter* ($p= 0,03$), *Campylobacter* ($p= 0,03$), *Synergistes* ($p= 0,04$) y *Ezakiella* ($p= 0,04$).

Atendiendo a la abundancia relativa de ciertos géneros bacterianos seleccionados, si ésta se comparaba entre grupos en función de la colonización por los parásitos intestinales se observaba la tendencia siguiente: los colonizados por *Blastocystis/D. fragilis* presentaban un aumento tanto en los géneros *Roseburia* como *Lactobacillus*, y una disminución en *Akkermansia*, *Bifidobacterium* y *Escherichia*. La presencia de *G. intestinalis* se asociaba con un patrón de abundancia de géneros diferente, con mayor presencia de *Bacteroides* y menor de *Faecalibacterium* y *Prevotella* (Tabla 42).

Tabla 42. Abundancia relativa (%) de géneros en función del estado de colonización y las especies parásitas.

Géneros	No colonizados	B/DF	<i>G. intestinalis</i>
<i>Faecalibacterium</i> spp.	3,6	3,8	2,0
<i>Roseburia</i> spp.	2,9	3,6	2,2
<i>Akkermansia</i> spp.	1,3	0,9	1,1
<i>Bacteroides</i> spp.	21,3	20,5	27,1
<i>Prevotella</i> spp.	11,5	11,0	10,5
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,09	0,82	0,03
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0,68	0,28	0,51
<i>Escherichia</i> spp.	0,68	0,25	0,67

B/DF = positivos a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* después de excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*.

Con respecto a la proporción *Bacteroides/Prevotella* y *Faecalibacterium/Escherichia*, globalmente no identificamos diferencias significativas determinadas por la positividad a los parásitos intestinales. No obstante, sí se hallaron tendencias divergentes al comparar estas ratios entre subgrupos en función de la especie colonizadora. De este modo, los positivos para *G. intestinalis* presentaron la ratio *Bacteroides/Prevotella* más elevada de entre los participantes, mientras que la más baja se encontraba entre los positivos para *Blastocystis/D. fragilis* (Tabla

43). En relación con estos resultados, se puede afirmar que la presencia de *G. intestinalis* estaba asociada una mayor presencia del género *Bacteroides*, principal representante del filo *Bacteroidetes*, coherente con los datos mostrados por las anteriores tablas (Tabla 41 y Tabla 42). Respecto a la ratio *Faecalibacterium/Escherichia*, se vio incrementada en el grupo de participantes positivos para parásitos intestinales, ya fueran *Blastocystis/D. fragilis* o *G. intestinalis*, aunque de forma más marcada en estos últimos (84,6 vs. 40,6).

Tabla 43. Diferencias en las principales ratios en función del estado de colonización y las especies parásitos.

Ratios		Mediana [1C, 3C]		
		No colonizados	<i>B/DF</i>	<i>G. intestinalis</i>
<i>Bacteroides</i>	spp.	460	200	1,625,0
<i>/Prevotella</i>	spp.	[0,3, 11.300]	[0,3, 4.681]	[0,9, 3.687,1]
<i>Faecalibacterium</i>	spp.	40,6	63,5	84,6
<i>/Escherichia</i>	spp.	[9,0, 107,6]	[1,9, 277,8]	[0,9, 345,0]

B/DF = positivos a *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* tras excluir las coinfecciones con *G. intestinalis*. 1C, 3C: primer y tercer cuartiles.

4.10.1.4.2 En función de la situación metabólica

A continuación, se analizó la abundancia relativa de taxones en función de la presencia de las principales comorbilidades metabólicas. Así, se identificó una ratio significativamente más alta de Firmicutes/Bacteroidetes entre los sujetos que sufrían de EHGNA, condicionada tanto por una mayor abundancia relativa del filo Firmicutes como menor del filo Bacteroidetes (Tabla 44). Este hallazgo se encontraba en probable relación con una estadísticamente significativa sobrerrepresentación de los géneros *Faecalibacterium* y *Clostridium*, ambos miembros del filo predominante.

Tabla 44. Diferencias en taxones bacterianos del ecosistema intestinal en función de la presencia de EHGNA.

	Con EHGNA	Sin EHGNA	p-valor
Firmicutes/Bacteroidetes	1,4	0,8	0,041*
Bacteroidetes (%)	43,5	52,9	0,031*
Firmicutes (%)	47,5	37,1	0,031*
<i>Faecalibacterium</i> spp. (%)	4,3	3,1	0,038*
<i>Clostridium</i> spp. (%)	0,5	0,08	0,002*

* Diferencia estadísticamente significativa entre subgrupos.

Por otro lado, se analizó la distribución de taxones atendiendo a la situación del metabolismo hidrocarbonado, obteniéndose múltiples diferencias estadísticamente significativas entre subgrupos (Tabla 45). De este modo, la condición de resistencia a la insulina se asoció con una frecuencia significativamente menor del género *Blautia* y superior de *Desulfovibrio*. Por otro lado, los sujetos con un metabolismo hidrocarbonado normal frente a los que lo tenían alterado (DT2 y prediabéticos) mostraron una mayor abundancia relativa de los géneros *Faecalibacterium* y *Clostridium* y menor de *Escherichia*, sin llegar a la significación estadística en una mayor ratio *Faecalibacterium/Escherichia* por la elevada dispersión de los valores obtenidos. Estos resultados se afinaron al comparar a los participantes con DT2 frente a los sujetos con metabolismo hidrocarbonado normal y prediabetes: los participantes con diabetes en este caso mostraban una ratio *Faecalibacterium/Escherichia* significativamente menor, debida a una sobrerrepresentación del género *Escherichia* (sin modificarse la cantidad de

Faecalibacterium); se reprodujo en este subgrupo la menor abundancia relativa de *Clostridium* y se añadió una mayor de *Lactobacillus*; finalmente, existía una tendencia hacia una menor representación de *Akkermansia*.

Tabla 45. Abundancia relativa (%) de taxones bacterianos del ecosistema intestinal en función de la situación del metabolismo hidrocarbonado.

	Insulin -sensibles	Insulin -resistentes	p-valor
<i>Blautia</i> spp.	0,89	0,39	0,015*
<i>Desulfovibrio</i> spp.	0,25	1,00	0,032*
	MHC normal	MHC alterado	p-valor
<i>Faecalibacterium</i> spp.	3,86	3,12	0,032*
<i>Clostridium</i> spp.	0,30	0,12	0,026*
<i>Escherichia</i> spp.	0,11	0,77	0,038*
Ratio <i>Faecalibacterium</i> / <i>Esche- richia</i>	451,45	234,18	0,051
	No DT2	DT2	p-valor
<i>Faecalibacterium</i> spp.	3,44	3,36	0,134
<i>Escherichia</i> spp.	0,16	1,19	0,002*
<i>Clostridium</i> spp.	0,27	0,04	0,002*
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,05	0,13	0,02*
<i>Akkermansia</i> spp.	1,3	0,5	0,336
Ratio <i>Faecalibacterium</i> / <i>Esche- richia</i>	354,93	250,62	0,01*

MHC= metabolismo hidrocarbonado; DT2= diabetes tipo 2; MHC alterado incluye situaciones de DT2 y de prediabetes; * Diferencia estadísticamente significativa entre subgrupos.

No se detectaron diferencias en la composición de la microbiota intestinal asociadas a la presencia de dislipidemia, hiperuricemia, hipertensión arterial o síndrome metabólico.

4.10.1.4.3 En función de otras variables clínicas

La estructura de la microbiota intestinal mostró algunos resultados significativos cuando se comparaba a los participantes en función de otras variables registradas durante la entrevista clínica.

En primer lugar, procedimos a un análisis comparativo de la abundancia relativa de taxones en función de la presencia de síntomas abdominales. Con ello se identificó que los sujetos con molestias intestinales presentaban una menor presencia del filo Verrucomicrobia y mayor de Firmicutes, sin cambios apreciables en la cantidad de Bacteroidetes. A nivel de género esto se correspondía con una menor prevalencia de *Akkermansia* spp. (principal representante del filo Verrucomicrobia) y con una tendencia hacia una mayor representación de *Faecalibacterium* spp. (datos recogidos en la Tabla 46). Cuando se analizaban los síntomas referidos de manera independiente, la presencia de flatulencias se asociaba de manera estadísticamente significativa ($p=0,008$) con una mayor abundancia relativa de *Faecalibacterium* spp.

Tabla 46. Abundancia relativa (%) de taxones en función de la clínica abdominal.

	Síntomas abdominales		
	Presentes	Ausentes	<i>p</i> -valor
Firmicutes	43,75	37,4	0,035*
Verrucomicrobia	0,52	1,68	0,044*
<i>Akkermansia</i>	0,44	1,57	0,031*
<i>Faecalibacterium</i>	4,4	2,6	0,053

* Diferencia estadísticamente significativa entre subgrupos.

Por otro lado, el antecedente de colecistectomía se correlacionó a nivel de filo con una menor frecuencia relativa de Proteobacteria ($p= 0,02$); a nivel de género con una mayor presencia relativa de *Roseburia* ($p= 0,02$) y de *Blautia* ($p= 0,03$), y también de géneros subrepresentados como *Proteus* ($p= 0,001$), *Peptoclostridium* ($p = 0,001$), *Epulopiscium* ($p= 0,001$), *Enorma* ($p= 0,01$), *Romboutsia* ($p= 0,01$) y *Anaerostipes* ($p= 0,02$).

En segundo lugar, los individuos que consumían sustitutos de comidas durante el mes previo a la recogida de muestras fecales mostraron una menor abundancia relativa del género *Clostridium* ($p= 0,007$), y la presencia de géneros infrecuentes, como *Fusecatenibacter* ($p< 0,001$) y *Ralstonia* ($p< 0,01$).

Otra variable que proporcionó resultados significativos fue la toma regular de inhibidores de la bomba de protones, con una mayor frecuencia relativa del género *Parabacteroides* ($p= 0,02$) y una sobrerrepresentación de géneros infrecuentes como: *Neisseria* ($p<0,001$), *Brachyspira* ($p= 0,01$), *Fructobacillus* ($p= 0,01$), *Peptosclostridium* ($p= 0,01$) y *Oscillospira* ($p= 0,03$).

La colonización activa con *H. pylori* se asoció a una menor abundancia relativa de los géneros *Akkermansia* ($p= 0,02$), *Collinsella* ($p= 0,02$), *Coprobacter* ($p= 0,03$) y *Bifidobacterium* ($p= 0,04$).

Por último, el tabaquismo activo confirmó una menor cantidad relativa de los géneros *Barnesiella* ($p= 0,01$) y *Haemophilus* ($p= 0,04$).

4.10.1.5 Correlación entre la microbiota intestinal y la dieta habitual

Se realizó un análisis metagenómico comparativo de la comunidad bacteriana intestinal con respecto a variables dietéticas, a saber: ingesta calórica total, cumplimiento de la ingesta recomendada para los tres macronutrientes principales y cumplimiento de la ingesta diaria de requerimientos de micronutrientes. No se encontró correlación significativa alguna entre estas variables y los índices de alfa diversidad.

En cuanto a la abundancia relativa de taxones, pudimos detectar las siguientes tendencias: menor abundancia de *Faecalibacterium* spp. entre sujetos con deficiencia de omega-3 ($p= 0,024$); menor abundancia de *Actinobacterias* entre los deficientes en omega-6 ($p= 0,026$); entre sujetos con deficiencia de vitamina A, menor abundancia de *Parabacteroides* ($p= 0,029$), *Lactobacillus* spp. ($p= 0,008$) y *Collinsella* spp. ($p= 0,012$); y menor abundancia de *Lactobacillus* spp. entre los deficientes en vitamina B12 ($p= 0,029$).

5 *Discusión*

5.1 *Discusión conjunta de resultados*

Durante décadas se ha contemplado la fisiopatología del exceso de peso como un mero desequilibrio entre los aportes calóricos dietéticos y el consumo energético diario. En la actualidad, parece que este enfoque resulta demasiado simplista, y que la diferencia entre la cantidad de ingesta y el gasto calórico no siempre equivale los cambios ponderales de un sujeto. Es bien sabido que multitud de otros factores participan modificando este balance energético y condicionando el desarrollo de la obesidad y de sus complicaciones sistémicas.

Por otro lado, hasta la fecha se ha considerado a la obesidad como una enfermedad relacionada con un estilo de vida concreto (caracterizado por el sedentarismo y por el consumo de dietas hipercalóricas), pero en los últimos años está cogiendo fuerza la hipótesis de que un factor infeccioso tenga un papel etiopatogénico relevante en su desarrollo. El explosivo incremento en su prevalencia podría explicarse por este motivo, y no sería la primera enfermedad en cuya fisiopatología participan agentes infecciosos que se descubren tardíamente. A fin de cuentas, no hace tanto que se identificó como clave el papel de *H. pylori* en el desarrollo de una enfermedad como la úlcera péptica.

Asimismo, actualmente sabemos que la obesidad es un síndrome que engloba a personas y situaciones metabólicamente muy diversas, asociadas a un diferente riesgo cardiovascular y de evolucionar hacia complicaciones graves, pero no está tan claro qué factores determinan esta distinción. En este sentido, hemos obviado durante demasiado tiempo la existencia de un complejo y rico ecosistema biológico en el interior del intestino humano, y las nuevas evidencias apuntan hacia que la importancia de estos pequeños seres puede ser crucial para decantar la balanza en el sentido de la homeostasis o de la enfermedad. Probablemente también sea simplista considerar a todos los microorganismos eucariotas que acceden al ecosistema intestinal como patógenos, ya que pueden comportarse como comensales o incluso aportar beneficios al hospedador. Después de todo, el ser humano ha evolucionado durante miles de años en compañía de estos microorganismos y sólo ha sido

en el último siglo cuando una menor exposición ambiental los ha erradicado de nuestra microbiota intestinal.

5.1.1 Colonización por eucariotas unicelulares intestinales en población obesa

En nuestra población de estudio, la prevalencia de colonización del ecosistema intestinal por los eucariotas unicelulares analizados fue claramente superior a la esperada, del 51%. Desconocemos si esta prevalencia es representativa de la población general en nuestro medio, o si bien la colonización es especialmente frecuente en sujetos con obesidad, lo cual podría explicarse por la inmunopatología que se le asocia y que favorece la cronificación de las infecciones (tanto bacterianas como protozoarias) (129,152).

Con diferencia, el microorganismo más frecuentemente aislado en nuestra muestra fue *Blastocystis* sp. (44,2% del total), y sería interesante conocer la prevalencia de colonización por este protista en poblaciones más amplias de sujetos con obesidad. La mayor abundancia relativa de esta especie frente a las otras dos halladas en nuestra población (*D. fragilis* y *G. intestinalis*) condiciona que todos los resultados obtenidos dentro del grupo de colonizados estén más influenciados por la presencia de *Blastocystis* sp. que por la de los otros dos protozoos. Por tanto, hay que considerar que a partir de esta pequeña muestra resulta complicado conocer qué efectos pueden ejercer las especies más infrarrepresentadas sobre las variables estudiadas, que por lo que sabemos, bien podrían ser diametralmente opuestos a los ejercidos por *Blastocystis* sp.

La presencia de colonización múltiple por microorganismos que se adquieren por la misma vía de transmisión es relativamente frecuente. La combinación de *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. ha sido descrita con anterioridad, particularmente en el contexto del estudio del síndrome diarreico (337), mientras que la coinfección por *Blastocystis* sp. junto con *D. fragilis* es frecuentemente contemplada como no patogénica (338,339). En nuestro caso, la frecuencia global de multicolonización alcanzó el 13,5%, en todos los casos estando presente *Blastocystis* sp. como agente infeccioso más prevalente, y con un caso único de colonización triple. Las implicaciones de esta circunstancia sobre la composición de la microbiota intestinal y las repercusiones clínicas sobre el

hospedador no han sido exploradas hasta la actualidad, por lo que sería necesario profundizar en ellas, en poblaciones más amplias.

Atendiendo a los factores asociados a la mayor frecuencia de colonización parasitaria, pudimos identificar la ingesta de verduras y frutas de origen ecológico como una situación de significativo aumento de riesgo. Esta situación refuerza la necesidad de extremar las medidas de higiene al consumir productos crudos de esta procedencia. Entendemos como verduras, hortalizas y frutas de origen ecológico a aquellos alimentos procedentes de cultivo o huerto propio (en los que no se usaron pesticidas ni agua de riego potable) o de pequeñas superficies (no supermercados) que ofertan alimentos de origen similar. El aumento del riesgo descrito, que viene respaldado por estudios publicados recientemente (340), puede ser explicado por la mayor carga parasitaria asociada a esta forma de producción y de procesamiento de los alimentos, al tipo de fertilizante empleado y a la calidad de las aguas utilizadas para el regadío.

Por otro lado, no fuimos capaces de detectar en nuestra población un aumento del riesgo de colonización asociado al resto de factores recogidos en el estudio, y que no obstante han sido descritos como de riesgo en la literatura: la mayor tasa de viajes al extranjero, la mayor exposición a niños menores de 10 años, a animales domésticos o de ganado, ni la profesión con exposición a excretas humanas. Esta información es indicativa de que la colonización de los participantes en el estudio se adquirió en nuestro medio y a través de acciones cotidianas, sugiriendo por ello que la exposición a fuentes de colonización es frecuente en la población general.

5.1.2 Manifestaciones clínicas de los eucariotas unicelulares intestinales

Como se ha comentado anteriormente, la colonización intestinal humana por parásitos eucariotas se ha descrito acompañada de un amplio espectro clínico, con manifestaciones fundamentalmente abdominales, pero en ocasiones también extraintestinales (168,216,223). Además, la disbiosis intestinal humana se ha relacionado con la aparición de clínica abdominal en forma de dolor, e incluso con una mayor frecuencia de síndrome de intestino irritable (341,342). Para estudiar si la presencia de los microorganismos de estudio tuviera un papel en su aparición se recogieron en la entrevista clínica los síntomas abdominales gastrointestinales, siendo valorados por los pacientes a tal fin mediante escalas analógicas visuales.

En este estudio, la colonización intestinal por eucariotas unicelulares no sólo no se asoció con un incremento de la frecuencia de síntomas abdominales, sino que de manera significativa mostró una relación inversa con algunos de ellos; concretamente, con una menor percepción de flatulencias y de distensión abdominal. Este hallazgo resultó llamativo, dado que hay estudios publicados que objetivan una mayor frecuencia de sintomatología abdominal en sujetos parasitados por *Blastocystis* sp., e incluso se ha relacionado su colonización con la fisiopatología del síndrome de intestino irritable (233,234). No obstante, esta asociación no ha podido ser comprobada en muchos otros estudios (235-237) y tampoco somos los primeros en sugerir que la presencia de este microorganismo se asocia a menor clínica intestinal (203,338). Asimismo, en nuestra muestra objetivamos una significativa menor frecuencia deposicional diaria entre los sujetos colonizados, y menos casos de deposiciones diarreicas.

Por otro lado, aunque algunos participantes refirieron a la anamnesis dirigida ciertas intolerancias alimentarias concretas, en ningún caso se pudieron detectar diferencias significativas en su aparición entre colonizados y no colonizados. Concretamente, la colonización por *G. intestinalis* se ha correlacionado con anterioridad con malabsorción de fructosa (186), pero en nuestra pequeña muestra con positividad a este parásito no se reprodujo este trastorno funcional.

De lo anterior concluimos que, en nuestra población de sujetos con obesidad, la presencia intestinal de los microorganismos estudiados resultaba asintomática o incluso protectora para la clínica gastrointestinal. No obstante, contemplamos la posibilidad de que esta afirmación no sea aplicable a todo el conjunto de especies parasitarias encontradas, sino que cada una de ellas tenga un comportamiento diferente sobre el hospedador sano. En nuestra muestra, la representación de parasitados por *G. intestinalis* fue baja, por lo que posibles síntomas provocados por este microorganismo podrían no haber alcanzado la significación estadística al ser comparados entre subgrupos.

Finalmente, en el subgrupo de sujetos en los que se realizó el análisis metagenómico (n=56) se comparó la prevalencia de sintomatología abdominal en función de la abundancia relativa de los diferentes taxones bacterianos. Los resultados obtenidos mostraron que las molestias abdominales eran más frecuentes en presencia de una mayor abundancia relativa del filo Firmicutes, lo cual viene a respaldar los resultados previamente publicados por otros autores (343,344). También se detectó una menor abundancia relativa del género *Akkermansia*, cuyo principal representante es *A. muciniphila*, entre los participantes que aquejaban síntomas abdominales. Este microorganismo es conocido por jugar un importante papel en mejorar las funciones metabólicas y la respuesta inmunitaria en el hospedador humano (324,345) y su presencia dentro del ecosistema intestinal también ha sido ampliamente estudiada y relacionada con diferentes trastornos. Entre otras cosas, una menor abundancia relativa de esta bacteria se ha relacionado con situaciones de disbiosis intestinal, que podrían justificar las diferencias en las molestias abdominales referidas en nuestra población, e incluso con la aparición de enfermedad inflamatoria intestinal (346,347).

5.1.3 Implicaciones nutricionales de los eucariotas unicelulares intestinales

La población incluida en este estudio presentaba obesidad grado III en su mayoría (media IMC $45,9 \pm 6,6$ kg/m²), como era esperable por los criterios de inclusión. La positividad a los microorganismos analizados no condicionó ninguna diferencia significativa en la composición corporal de los participantes, valorada mediante bioimpedancia eléctrica. La distribución por subgrupos de colonización fue equivalente en cuanto a IMC, perímetro abdominal, % y kilos de grasa corporal, % y kilos de masa muscular, estimación del área grasa visceral y ángulo de fase. Estos resultados se interpretaron como que la presencia de colonización en los sujetos estudiados no se acompañó de cambios en la composición corporal.

Por otro lado, los índices de masa libre de grasa (es decir, FFM/talla²) obtenidos en esta población fueron bastante elevados (media de 24,4 kg/m² en hombres; 21,4 kg/m² en mujeres). Este dato va a favor de que la masa magra entre los participantes estaba bastante bien preservada, y no apuntaría hacia una elevada prevalencia de obesidad sarcopénica. Probablemente las características basales que debían cumplir los pacientes para someterse a cirugía bariátrica y para ser incluidos en el estudio (es decir: edad joven, falta de comorbilidades mayores y buena adherencia a las recomendaciones dietéticas y de estilo de vida) son responsables de esta buena salud muscular en la población incluida. No obstante, es de destacar que los puntos de corte para sarcopenia no están bien estandarizados en población con obesidad (348). También cabe recalcar que en este estudio no se valoró la fuerza muscular mediante dinamometría, que es uno de los criterios que permiten emitir el diagnóstico de sarcopenia, ni la funcionalidad, mediante los correspondientes tests validados.

Otro de los principales objetivos de este estudio era valorar si la colonización intestinal por los microorganismos de interés condicionaba alteración de la absorción intestinal de nutrientes, y con ello si se condicionaban diferencias en los parámetros nutricionales analíticos, como apuntan varios estudios (223,230,349). En este sentido, en nuestra población no se registraron diferencias en función de la colonización intestinal en los niveles plasmáticos de proteínas viscerales, vitaminas hidrosolubles, vitaminas liposolubles ni los oligoelementos analizados. Este último hecho orienta hacia que la

colonización asintomática en estos sujetos no condujo a malabsorción de los principales macro ni micronutrientes. No obstante, es destacable que en el subgrupo de pacientes parasitados por *G. intestinalis* se detectó una tendencia no significativa hacia niveles más bajos de vitamina A, coherente con lo descrito en algún trabajo previo (186). Esto es explicable por la ubicación mucho más proximal dentro del tracto gastrointestinal de este protozoo, pudiendo ejercer a nivel duodenal un consumo competitivo de este micronutriente con el hospedador.

5.1.4 Implicaciones metabólicas de los eucariotas unicelulares intestinales

La obesidad es una enfermedad claramente metabólica, y su desarrollo se encuentra en estrecha relación con la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal. Por tanto, siendo los microorganismos de estudio parte del ecosistema intestinal, otro de los principales objetivos se focalizaba en explorar la situación metabólica de los participantes en función de la colonización.

En este sentido, el hallazgo más relevante fue un significativo menor índice HOMA-R en el grupo de participantes colonizados por un parásito intestinal. Este parámetro es un valor numérico obtenido a partir de una sencilla fórmula validada, que relaciona los niveles de glucemia y de insulinemia basal de un sujeto (350). Es ampliamente empleado para cuantificar la resistencia a la insulina, y se correlaciona con el riesgo de desarrollar síndrome metabólico. En población valenciana, se ha validado el punto de corte $>3,8$ de este índice como indicativo de situación de insulín-resistencia (336), que fue el valor que se empleó en este estudio.

Las diferencias detectadas en el índice HOMA-R en función de la colonización intestinal no fueron atribuibles a discrepancias en el porcentaje de masa grasa corporal, dado que los pacientes fueron estudiados mediante bioimpedancia eléctrica para conocer su composición corporal, y ésta era completamente comparable entre los dos grupos.

Puesto que la resistencia a la insulina se contempla como el eje vertebrador de los trastornos metabólicos y cardiovasculares asociados a la obesidad, el hallazgo de un menor índice HOMA-R entre individuos positivos para colonización lo interpretamos como indicativo de un perfil cardio-metabólico más saludable. De forma coherente, en este mismo subgrupo de sujetos se objetivó una tendencia (no significativa) hacia una menor prevalencia de síndrome metabólico (49 *vs.* 64,7%) y de algunos de sus componentes, particularmente la diabetes mellitus (24,5 *vs.* 39,2%) y la positividad a los índices de esteatohepatitis no alcohólica (13,2 *vs.* 21,5%). En el subgrupo de pacientes en los que se realizó análisis metagenómico (n=54) se mantenía esta tendencia: prevalencia menor en sujetos colonizados de síndrome metabólico (48,4%) y de diabetes mellitus (25,8%) frente a los no colonizados (56% y 44%

respectivamente). En esta subpoblación del estudio estos resultados eran particularmente llamativos, porque los sujetos colonizados eran significativamente más obesos que los no colonizados, y pese a ello, presentaban menor comorbilidad metabólica. Por su parte, en la subpoblación en la que se analizaron los parámetros inflamatorios y redox (n=97), sí que se alcanzó la diferencia estadística en la menor prevalencia de diabetes tipo 2 entre los sujetos no colonizados.

Si se tenía en cuenta la especie concreta de microorganismo colonizador, se observaban tendencias metabólicas opuestas entre aquellos con *Blastocystis* sp. o *D. fragilis* y los que presentaban *G. intestinalis*. Así, los primeros eran los que globalmente mostraban un perfil más saludable, con la prevalencia más baja de síndrome metabólico entre los sujetos colonizados por *Blastocystis* sp. (47,8%), así como la más baja de diabetes mellitus tanto entre éstos como entre los colonizados por *D. fragilis* (21,8% y 8,3% respectivamente, llegando las diferencias a la significación estadística al compararse con los no colonizados. Estos últimos también tenían una significativa menor prevalencia de hiperuricemia (16,7%). Coherentemente con el perfil metabólico más saludable, en este subgrupo de pacientes también existía una tendencia hacia la menor gravedad de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, así como hacia una menor positividad en los índices predictivos de esteatohepatitis no alcohólica (10,9% y 0% respectivamente).

Por su parte, los portadores de *G. intestinalis* presentaban una prevalencia de síndrome metabólico mayor (55,5%), y la más alta del estudio tanto de diabetes mellitus (44,4%) como de positividad en los índices de EHNA (22,2%). Esta tendencia metabólica opuesta también se mantenía en el subgrupo de pacientes en los que se realizó análisis metagenómico (prevalencias de síndrome metabólico y diabetes de 45,5% y 18,2% en sujetos colonizados por *Blastocystis* sp. frente a 55,6% y 44,4% en los que presentaban colonización por *G. intestinalis*). Sin embargo, si se atendía a la variable del índice HOMA-R no existía esta divergencia entre especies parásitas, dado que la colonización por las tres se asociaba con la misma tendencia descendente; de hecho, el subgrupo de positivos para *G. intestinalis* fue el que obtuvo el valor más bajo de este índice (4,71).

No hemos encontrado en la literatura estudios similares al nuestro que evalúen la relación entre la presencia de parásitos intestinales y estas variables metabólicas, y que por tanto puedan respaldar nuestros resultados.

En conclusión, la presencia de colonización intestinal por los parásitos estudiados mostró una asociación significativa con variables metabólicas, sugiriendo que podrían modular la homeostasis del hospedador en este sentido, y que este efecto sería dependiente de la especie parásita. No obstante, por la naturaleza descriptiva de este estudio no fue posible establecer si la existencia de estos microorganismos intestinales era lo que condicionaba la mayor sensibilidad a la insulina; podría ocurrir que este efecto lo ejercieran otros factores, los cuales paralelamente favorecieran la colonización intestinal por los protozoos, y al mismo tiempo protegieran del síndrome metabólico. En este contexto, la presencia intestinal de los microorganismos estudiados sería un mero epifenómeno.

5.1.5 Hallazgos obtenidos a partir de la valoración nutricional

Como parte del estudio, en la primera visita se solicitó a los participantes que cumplimentaran dos cuestionarios dietéticos de los que extraer información cuantitativa y cualitativa sobre la dieta que seguían de forma habitual. Estos fueron, como se ha especificado anteriormente: el cuestionario de 12 ítems de adherencia a la dieta mediterránea (307) y un registro dietético de 5 días no consecutivos. A partir de esta información, y haciendo uso de un software validado a tal fin (308), se obtuvo información valiosa sobre los aportes nutricionales diarios de cada sujeto, atendiendo a: aporte calórico total, porcentaje de cada uno de los macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) y de aporte de micronutrientes de interés (oligoelementos y vitaminas). Asimismo, se estimó en cada individuo si en base a esta información se cubrían los requerimientos nutricionales diarios de los principales macro y micronutrientes, o si de lo contrario los hábitos dietéticos se alejaban de lo que las actuales guías internacionales recomiendan (309).

5.1.5.1 Calidad nutricional de la dieta habitual de los participantes

Los resultados obtenidos en la muestra de pacientes analizada mostraron una extremadamente baja calidad en la dieta habitual, alejándose completamente del modelo de dieta mediterránea que se recomienda en la actualidad. La práctica totalidad de los participantes presentaba un patrón de dieta de tipo occidental, caracterizado por la abundancia de azúcares simples, grasas saturadas y proteínas origen animal, con escaso aporte de fibra dietética y antioxidantes en forma de frutas y verduras. Respecto a los micronutrientes, las cantidades diarias recomendadas no se cubrían en la inmensa mayoría de los sujetos.

Estos resultados fueron llamativos y descorazonadores, teniendo en cuenta que se trataba de pacientes en un programa intensivo de reeducación nutricional y de estilo de vida, que se oferta previamente a la cirugía bariátrica. Esto apoya, una vez más, la idea de que la obesidad es una enfermedad crónica una vez se ha instaurado, y que tiene un origen multifactorial. Por tanto, estrategias terapéuticas simplistas centradas en un único factor etiopatogénico están probablemente abocadas al fracaso a largo plazo. Para evitarlo sería

necesario un abordaje terapéutico multidimensional, que contemple la reeducación nutricional y psicológica como un pilar fundamental del tratamiento.

5.1.5.2 Relación con la composición de la microbiota intestinal

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la composición cualitativa de la dieta es uno de los factores más importantes que intervienen en la configuración de la estructura del ecosistema bacteriano intestinal (351,352). Este efecto modulador se ejerce tanto en las etapas precoces de la vida (contribuyendo a conformar la huella microbiótica individual) como con posterioridad, pudiendo variar la abundancia relativa de unos taxones sobre otros de manera cíclica (353,354). Se ha visto que los cambios en el tipo de aporte de nutrientes provocan paralelamente modificaciones rápidas de la composición de la microbiota intestinal, aunque no del todo consistentes entre individuos (355), y reversibles tras finalizar la modificación dietética (356).

Uno de los factores más relevantes a la hora de configurar el ecosistema intestinal es el aporte de fibra dietética (polisacáridos complejos), que sirve de sustrato metabólico para ciertos taxones bacterianos, y que selecciona a algunos géneros sobre otros. En función del aporte de este nutriente se han podido detectar profundos cambios en la diversidad y la composición de la microbiota intestinal, particularmente en los géneros *Prevotella* y *Bacteroides*. La abundancia de *Prevotella* spp. ha sido ampliamente descrita como ligada a una dieta con abundante aporte de fibra; es decir, a un modelo dietético propio de zonas rurales. En cambio, la mayor abundancia de *Bacteroides* spp. se ha correlacionado con un modelo dietético de tipo occidental (rico en grasas y proteínas de origen animal y con menor aporte de fibra dietética). Adicionalmente, estos dos géneros bacterianos frecuentemente presentan una abundancia relativa inversamente proporcional en el ecosistema intestinal humano. Este hecho ha motivado el uso (en este y en otros trabajos) de la ratio *Bacteroides/Prevotella* como indicador del tipo de dieta seguida por el hospedador, y su valor se acompaña de profundas diferencias en toda la estructura del ecosistema bacteriano y, probablemente, también de su función. Tanto es así, que algunos autores han propuesto una clasificación de la

microbiota intestinal humana en categorías (denominadas “enterotipos”) en función de la abundancia relativa de unos pocos géneros bacterianos (329,352,357-359). Se considera que estos taxones son mutuamente excluyentes, conformando una comunidad bacteriana definida y equilibrada, y con un metaboloma específico.

En lo que se refiere a este trabajo, como se ha indicado anteriormente, en todos los participantes en los que se realizó el estudio metagenómico el patrón dietético seguido se encuadraba en el de tipo occidental. Por lo tanto, no se pudo realizar una comparación de la diversidad y composición de la microbiota por subgrupos en función de un patrón dietético diferencial, y en general las diferencias metagenómicas halladas entre sujetos se han atribuido a la colonización por microorganismos parásitos o a otros factores ambientales. No obstante, sí que se detectaron diferencias en la abundancia relativa de ciertos géneros en función de variables dietéticas concretas, como se ha referido en el apartado resultados, pero su interpretación va más allá del objetivo del presente estudio.

5.1.5.3 Relación con los parámetros de estrés oxidativo

Además de ser un factor modulador de la microbiota intestinal, la composición cualitativa de la dieta es considerada una de las principales fuentes de poder antioxidante del ser humano, y con capacidad de modular el balance redox de todo el organismo. Algunos factores descritos como relevantes sobre la capacidad antioxidante dietética son: la carga antioxidante de los alimentos (ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides, flavonoides, algunos oligoelementos que actúan como cofactores de enzimas de efecto antioxidante...) o la proporción entre ácidos grasos omega 6 (predispuestos a padecer peroxidación lipídica, y por tanto fuente de consumo de antioxidantes) y omega 3 (de efectos antiinflamatorios). En general, la dieta mediterránea reúne todos los anteriores elementos antioxidantes, y esto se ha relacionado con una mayor capacidad antioxidante total del plasma y con los beneficios que aporta sobre la salud (360).

Por otro lado, se ha atribuido a ciertos alimentos la capacidad de generar una sobrecarga de estrés oxidativo postprandial, que se suma al generado de forma

endógena por el organismo (360,361). Según esta hipótesis, la ingesta de nutrientes que precipitan situaciones de hiperglucemia o hiperlipidemia sostenida favorecería el estrés oxidativo y la inflamación a nivel sistémico, al superar la capacidad de las enzimas antioxidantes para contrarrestarlo. Si bien es poco claro el mecanismo molecular por el que se produce este fenómeno, hay estudios que apuntan hacia que el aumento de biomarcadores de estrés oxidativo sería mayor en sujetos con obesidad por este motivo (362). Asimismo, también se ha descrito la existencia de moléculas que, siendo aportadas con la dieta (hidroperóxidos, oxiesteroles), poseen capacidad de inducir peroxidación lipídica y la expresión de citoquinas proinflamatorias (363).

Finalmente, se ha denominado la “capacidad antioxidante total dietética” al parámetro que integra el efecto de todos estos factores prooxidantes y antioxidantes presentes en la dieta (364). Su valor en sujetos sanos se ha relacionado inversamente tanto con los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo, como con la adiposidad central (365), y con parámetros asociados al síndrome metabólico (366).

En base a la información recogida y a las herramientas de cálculo disponibles en el presente estudio, no fue posible estimar la capacidad antioxidante total dietética de los participantes. No obstante, como ya se ha comentado, los sujetos analizados mostraron un aporte dietético de moléculas antioxidantes globalmente bajo, por debajo de la ingesta diaria recomendada, coherente con la baja ingesta de productos frescos como frutas y verduras. Al ser este hallazgo común a toda la muestra, creemos que el efecto de la dieta sobre la capacidad antioxidante total resultó escaso, y que por tanto no interfirió en la interpretación de los resultados de parámetros redox y en su comparación entre subgrupos en función del estado de colonización.

5.1.6 Hallazgos obtenidos sobre el ecosistema bacteriano intestinal

5.1.6.1 Binomio microbiota intestinal y eucariotas unicelulares

Los microorganismos objeto de estudio en el presente trabajo encuentran su nicho biológico en el tracto gastrointestinal humano, y por tanto constituyen una parte significativa del ecosistema intestinal. Aquí interactúan con las diferentes comunidades bacterianas, con las que establecen una relación bidireccional. Por un lado, hay evidencias de que la microbiota intestinal es capaz de modular la colonización por eucariotas unicelulares, favoreciendo la cronificación o la eliminación del parásito (225,226). En este sentido, ya se ha comentado con anterioridad la capacidad de ciertas cepas de *Lactobacillus* spp. de inhibir la proliferación de los trofozoítos de *G. intestinalis* (192,193), así como, en el caso de *Blastocystis* sp., la dependencia de la composición de la microbiota intestinal para llegar a establecer una colonización persistente a largo plazo. Considerando este hecho, si asumiéramos que todos los sujetos de nuestro estudio hubieran estado expuestos a la fuente infecciosa, la distinta composición de sus microbiotas intestinales habría condicionado que sólo algunos adquirieran colonización estable por los microorganismos estudiados.

Por otro lado, la presencia estable de estos microorganismos como miembros del ecosistema intestinal tiene la capacidad de reconfigurar las estructuras bacterianas y de modular la función de la microbiota intestinal. No obstante, todavía es poco conocida la relación establecida entre los eucariotas unicelulares y la composición y funcionalidad del resto de la microbiota intestinal, aunque ya hay algún trabajo que se centra en definirla (367). Ha habido autores que apuntaban hacia que los efectos sobre el ecosistema bacteriano podrían ser muy dependientes de la intensidad de colonización y de la especie parásita concreta (278,368). Así, en función del parásito, los efectos ejercidos sobre el hospedador pueden ser diametralmente opuestos.

En el caso de *G. intestinalis*, diferentes trabajos le han atribuido un papel perjudicial sobre el ecosistema intestinal, al favorecer la disbiosis (171,180,181,369,370). Además, se ha descrito que su presencia se correlaciona de manera inversa con la diversidad bacteriana intestinal (368). De manera opuesta, en múltiples publicaciones la colonización por *Blastocystis* se ha asociado a una microbiota más diversa y, por tanto, más saludable (212-215,367,371,372). También en el caso de *D. fragilis*, en el estudio de Krogsgaard

et al. (238) su presencia (con o sin coinfección con *Blastocystis* sp.) se asociaba con un microbioma más rico y diverso que en los individuos no colonizados.

5.1.6.1.1 Resultados de los índices de diversidad del ecosistema bacteriano

Los índices de alfa diversidad expresan la variedad de taxones bacterianos detectados en un mismo ecosistema intestinal; los índices de beta diversidad, por su parte, indican la variabilidad en la diversidad de taxones entre sujetos dentro del mismo subgrupo. Un resultado de estos índices más elevado se interpreta como correspondiente a una microbiota más diversa y por ello más sana (292).

Apoyando los resultados de los estudios anteriormente expuestos, en este trabajo se observó un claro patrón diferencial en la diversidad de la microbiota intestinal dentro del subgrupo de sujetos colonizados, atendiendo a la especie parásita colonizadora. No obstante, este patrón no se reproducía si lo que se comparaba era el conjunto de colonizados por cualquier especie frente a los no colonizados.

De este modo, los obesos portadores crónicos de *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* (tras excluir a los positivos a *G. intestinalis*) presentaron microbiotas de características más eubióticas que el resto de participantes, como fueron: una mayor riqueza valorada por el recuento de taxones procariotas (estadísticamente significativa en el subgrupo de positivos a *Blastocystis* sp.), una clara tendencia (aunque no significativa) hacia unos índices de alfa diversidad Chao1 y Shannon más elevados, y con unos índices de beta diversidad Jaccard y Sorensen también más altos al compararse con los no colonizados. Contrariamente, los índices de alfa y beta diversidad más bajos de toda la muestra correspondían a las microbiotas de los participantes colonizados por *G. intestinalis*, aunque sin llegar a diferencias con significación estadística, por el escaso número de sujetos en este último subgrupo.

Los gráficos PCoA (análisis de coordenadas principales) son una representación gráfica tridimensional que muestra la semejanza de la comunidad bacteriana intestinal entre sujetos dentro de un mismo subgrupo. Las diferencias apreciadas en la distribución de la nube de puntos y en la

morfología de las elipses son indicativas de la diferente estructura de la comunidad bacteriana. En este estudio han sido empleadas para representar de manera más visual la información que traducen los índices de beta diversidad a nivel de géneros bacterianos, pero no se logró apreciar una clara diferenciación entre grupos.

Cuando se repitieron las comparaciones de los índices de diversidad a nivel de género en función de la colonización intestinal en sujetos participantes afectados de algunas comorbilidades metabólicas (síndrome metabólico, dislipidemia, EHGNA, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2) sí que se alcanzó la significación estadística en algunos resultados. De este modo, los índices de diversidad beta de los pacientes positivos para *G. intestinalis* resultaron significativamente menores que los de los no colonizados, y los índices de los participantes positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* todavía mayores que los de los no colonizados. Estos resultados eran consistentes en todos los subgrupos metabólicos.

Por su parte, atendiendo a los índices de alfa diversidad, se obtuvo un patrón consistente en todas las categorías, por el cual existía una clara tendencia hacia valores más elevados en los sujetos parasitados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*, menores en los colonizados por *G. intestinalis*, e intermedios en los no portadores de ningún parásito. Este patrón se observaba tanto en el subgrupo de obesos metabólicamente sanos, como en aquellos afectados por síndrome metabólico, en los diagnosticados de EHGNA, dislipemia, resistencia a la insulina y diabetes mellitus. Curiosamente, los resultados de alfa-diversidad más altos se obtuvieron en el subgrupo de sujetos metabólicamente sanos y que estaban colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*; los más bajos se hallaron en los que presentaban síndrome metabólico y colonización por *G. intestinalis*.

En base a todo lo anterior, consideramos que existe una innegable conexión entre los índices de diversidad bacteriana y la colonización intestinal por eucariotas unicelulares, con un claro patrón diferencial entre los que albergan *G. intestinalis* frente a las otras dos especies parásitas. Los resultados de índices más elevados en entre los portadores de *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* son

coherentes con lo ampliamente reportado previamente en la literatura (212-215,238,367,371,372), al igual que el patrón de disbiosis (con menores índices de diversidad) lo es entre los parasitados por *G. intestinalis* (171,180,181,368-370).

Resulta lógico pensar que las diferencias en la estructura de las poblaciones bacterianas asociadas a los protozoos intestinales puedan estar en relación con el perfil metabólico más saludable que mostraban en el estudio los obesos colonizados (expresado por el menor índice HOMA-R). No obstante, en base al carácter descriptivo de este trabajo no es posible saber si la presencia de dichos microorganismos es la que favorece el desarrollo de una microbiota intestinal más diversa y funcionalmente más rica, o si bien esta característica de la microbiota es lo que promueve la persistencia de la colonización protozoaria. Sí que podemos afirmar que la presencia de estos eucariotas unicelulares nos está informando del diferente funcionamiento del ecosistema intestinal entre sujetos obesos, comportándose por ello como un interesante biomarcador de salud del microbioma.

5.1.6.1.2 Resultados de la abundancia relativa de taxones bacterianos

En este estudio, la colonización por eucariotas unicelulares también se asoció a diferencias en la proporción de ciertos taxones de la microbiota intestinal sobre otros.

En primer lugar, a nivel de filo fue destacable que en el caso de los portadores de *G. intestinalis* existía una menor representación de Firmicutes, acompañada de una sobrerrepresentación de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria. Esta circunstancia condicionó que la tan frecuentemente descrita ratio Firmicutes/Bacteroidetes fuera llamativamente más baja en este subgrupo, respecto al resto de participantes. No se identificaron diferencias en la abundancia relativa de taxones entre los no colonizados y los colonizados por las otras dos especies parásitas analizadas. Este hallazgo puede ser interpretado como que los efectos producidos sobre las comunidades bacterianas fueron ejercidos a un nivel más bajo, a nivel de género o especie, sin modificar globalmente la proporción de filos.

A nivel de género, la colonización por los tres parásitos de estudio se asoció con diferencias significativas en la abundancia relativa de multitud de taxones. No obstante, su interpretación va mucho más allá del objetivo de este trabajo, dado que desconocemos su exacta función en el seno del ecosistema intestinal. Por este motivo, nos centramos en definir la abundancia relativa de aquellos géneros que han sido repetidamente asociados en la literatura a situaciones de disbiosis o eubiosis. En este sentido, es destacable la tendencia entre los portadores de *G. intestinalis* a presentar una sobrerrepresentación del género *Bacteroides* spp. (principal representante del filo Bacteroidetes) y una disminución de *Faecalibacterium* spp., *Prevotella* spp. y *Lactobacillus* spp. Esta circunstancia condicionó que el subgrupo indicado presentara ratios *Bacteroides/Prevotella* más altas que el resto. Respecto a la ratio *Faecalibacterium/Escherichia*, la dispersión de valores fue muy elevada, pero la mediana también era discretamente más alta en este subgrupo de colonizados.

La ratio *Bacteroides/Prevotella*, como se ha comentado con anterioridad, se ha asociado a un patrón de alimentación de estilo occidental, rica en grasa y proteína de origen animal y baja en fibra dietética. Por lo tanto, se podría decir que el subgrupo de sujetos colonizados por *G. intestinalis* mostraba rasgos de una microbiota más propia de una alimentación occidental (nutricionalmente

poco saludable). Es factible, por tanto, que a la hora de configurarse la microbiota intestinal de un sujeto obeso tenga lugar un efecto sinérgico entre su patrón dietético y la presencia de *G. intestinalis*.

Por su parte, la ratio *Faecalibacterium/Escherichia* ha sido utilizada con anterioridad como un índice de disbiosis intestinal (181), porque correlaciona la abundancia relativa de un género considerado beneficioso (*Faecalibacterium* spp.) con uno con potencial disbiótico (*Escherichia* spp.). En el caso de *Faecalibacterium* spp., es un género al que se le atribuyen efectos antiinflamatorios debido a su capacidad de disminución de los niveles circulantes de IL-10 (301), y por lo tanto cierta capacidad de contrarrestar la situación de inflamación sistémica producida a partir de una disbiosis intestinal, a través de un intestino permeable. Por su parte, el género *Escherichia* spp. tiene efectos opuestos, ya que las cepas adherentes-invasivas tienen la capacidad de reducir la capa de moco y de atravesar el epitelio intestinal hasta la submucosa, facilitando la inflamación a este nivel (373). Se han reportado ratios *Faecalibacterium/Escherichia* bajas en presencia de protozoos patógenos distintos a los de este estudio, como *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis* (374). Sin embargo, alejándose de lo previamente descrito, en este trabajo esta ratio fue discretamente más alta en el subgrupo portador de *G. intestinalis*, aunque de manera no significativa.

Respecto a los sujetos colonizados por *Blastocystis* spp. y/o *D. fragilis*, los resultados previamente comunicados en referencia a la diferente abundancia relativa de taxones han sido ampliamente variables entre los distintos estudios. No obstante, de forma bastante consistente se ha descrito una microbiota menos dominada por el género *Bacteroides* spp. (171,212,371,375), así como algún grupo ha reportado una mayor representación de los géneros *Faecalibacterium* spp. y *Roseburia* spp., que se consideran elementos beneficiosos para el ecosistema intestinal por su capacidad de producción de ácidos grasos de cadena corta, (212,371); también se ha documentado una presencia mayor del componente Archaea (215). Sin embargo, en este estudio no fuimos capaces de reproducir ninguno de estos hallazgos, ni de establecer claras diferencias en la estructura del ecosistema bacteriano basándonos en la presencia de estas dos especies parásitas.

En conclusión, en lo referente a la abundancia relativa de taxones, no se pudo identificar un patrón común a la situación de colonización intestinal por eucariotas unicelulares. Este hecho probablemente fue debido a que los efectos ejercidos por estos microorganismos son muy dispares entre sí en lo que se refiere a la modulación de la estructura del ecosistema bacteriano, y a que están sujetos a otros factores todavía inexplorados.

5.1.6.2 Comorbilidades metabólicas y microbiota intestinal

Innumerables estudios se han centrado en describir las características de la microbiota intestinal humana en diferentes situaciones de patología, tanto intestinal como metabólica, con la intención de identificar un patrón diferenciador del de la microbiota eubiótica. Sin embargo, los factores que determinan que un microbioma sea disbiótico todavía son muy desconocidos, y queda por averiguar si estas alteraciones son la causa fundamental de la patología, o más bien su consecuencia.

Múltiples trabajos han ligado la existencia del síndrome metabólico con el desarrollo de una barrera intestinal más permeable, lo cual permite la traslocación al torrente circulatorio de lipopolisacáridos de origen bacteriano producidos en la luz, constituyendo la endotoxemia metabólica (105). Por su parte, diferentes alteraciones de la composición y función de la microbiota intestinal, como una menor producción de ácidos grasos de cadena corta, han sido definidas como causantes de esta pérdida de función de barrera de la mucosa intestinal (302).

Todavía no se conocen en profundidad los cambios en la composición y en la actividad metabólica de las comunidades bacterianas intestinales de los sujetos que desarrollan resistencia a la insulina. Sin embargo, muchos estudios publicados han descrito la existencia de profundos cambios en las microbiotas de individuos con prediabetes y diabetes, e incluso se han señalado como factor modificador de los niveles de hormonas peptídicas de origen gastrointestinal (GLP-1, PYY, GIP...). Así, estas moléculas de señalización podrían verse modificadas en función de la producción de ácidos grasos de cadena corta y de ácidos biliares secundarios por la microbiota (40). Adicionalmente, en sujetos con diabetes se ha descrito una menor abundancia de bacterias productoras de butirato (como *Roseburia* spp. o *Faecalibacterium* spp.) y mayor de Clostridiales, que no producen este ácido graso de cadena corta y pueden constituir patógenos oportunistas (376). Este hecho se relaciona con la pérdida de sus funciones protectoras sobre la excesiva permeabilidad de la barrera intestinal, y consecuentemente, con la endotoxemia metabólica. Por otro lado, respecto a la presencia del género *Akkermansia*, cuyo principal representante es *A. muciniphila*, ha sido

ampliamente descrita la relación inversa entre su abundancia relativa y el desarrollo de insulín-resistencia y diabetes mellitus (377-380).

En nuestro estudio, al comparar la microbiota intestinal de los participantes atendiendo a la presencia de las distintas comorbilidades metabólicas, no se evidenciaron diferencias significativas entre subgrupos en los índices de alfa y beta diversidad. En lo que se refiere a la distribución por taxones, las principales diferencias se encontraron a nivel de género en función de la situación del metabolismo hidrocarbonado de los participantes. Así, existía una infrarrepresentación de *Blautia* spp. y sobrerrepresentación de *Desulfovibrio* spp. en los sujetos catalogados como resistentes a la insulina. Por otro lado, destacaban las diferencias en la abundancia relativa de los géneros *Clostridium*, *Faecalibacterium* y *Escherichia*: los dos primeros eran más abundantes entre los participantes con un metabolismo hidrocarbonado normal que en prediabéticos y diabéticos, mientras que *Escherichia* estaba sobrerrepresentada tanto en diabéticos, como en prediabéticos. Consecuentemente, se obtuvo una ratio *Faecalibacterium* spp./*Escherichia* spp. significativamente más baja en los diabéticos que en el resto de los sujetos, que podría interpretarse como indicativa de disbiosis (181). No se identificaron diferencias en la abundancia relativa de *Akkermansia* spp. en función de la situación metabólica, aunque sí existía una tendencia a estar infrarrepresentada entre los diabéticos.

En base a lo anterior, es evidente que la abundancia relativa de taxones bacterianos estuvo modificada por multitud de factores además de los metabólicos (dieta habitual, colonización intestinal, tratamientos farmacológicos, etc.), pudiendo ser sinérgicos o antagónicos entre sí. Esto dificulta mucho la interpretación de los efectos de cada uno por separado, y la identificación de un patrón de microbiota asociado específicamente al estado de colonización intestinal.

5.1.6.3 Enfermedad de hígado graso no alcohólico y microbiota intestinal

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es considerada como una más de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad, particularmente universal en el obeso mórbido (381). Consistente en la infiltración grasa de esta glándula, tiene una fisiopatología todavía muy desconocida, que también se ha relacionado ampliamente en la literatura con situaciones de disbiosis intestinal, inflamación local y aumento de permeabilidad de la barrera intestinal (382-384). Actualmente, se cree que la desregulación del ecosistema intestinal juega un papel fundamental en su desarrollo: por un lado, a través de la producción de diferentes metabolitos bacterianos (acetato, etanol...), que alcanzan el hígado directamente por vía portal; por otro, mediante modificaciones en el patrón de producción de ácidos biliares, que alteran la activación de sus correspondientes receptores intestinales (FXR, TGR-5), con complejas acciones metabólicas, inmunitarias y endocrinas (385); finalmente, por la modificación del patrón de ácidos grasos de cadena corta producidos, que tienen efectos todavía poco conocidos sobre la permeabilidad intestinal y la inflamación sistémica (386). Por este motivo, la manipulación del metaboloma intestinal se ha contemplado como posible diana terapéutica para esta enfermedad (387).

Pese a la gran cantidad de estudios realizados en humanos con este objetivo, todavía no se dispone de un claro patrón de disbiosis intestinal que defina a este trastorno metabólico. Esto es así porque a menudo las alteraciones de la composición de la microbiota que se han descrito han resultado contradictorias entre autores (382). Tampoco se conocen con exactitud los mecanismos que condicionan la progresión hacia la esteatohepatitis no alcohólica (en la cual se produce una inflamación crónica de los hepatocitos) y hacia la temida fibrosis (388).

En el presente estudio, el subgrupo de sujetos con imagen ecográfica de EHGNA mostró algunas diferencias relevantes en la composición de su microbiota intestinal al compararse con el resto de la población estudiada. En primer lugar, de forma significativa se obtuvo un menor recuento de secuencias metagenómicas, lo cual traduce la riqueza de taxones de la muestra. Por otro lado, al analizar la alfa diversidad de forma estratificada según la

existencia de EHGNA, los participantes que presentaban este trastorno obtuvieron unos índices más bajos que su contrapartida sana. Finalmente, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de ciertos taxones, siendo que el patrón de la microbiota de estos pacientes se caracterizaba por una mayor abundancia relativa del filo Firmicutes. Esto vino condicionado por una significativa mayor cantidad de los géneros *Clostridium* spp. y *Faecalibacterium* spp., acompañado de una menor representación del filo Bacteroidetes; como es lógico, esto proporcionó ratios Firmicutes/Bacteroidetes estadísticamente más altas en este subgrupo de participantes. Resultados similares a los nuestros han sido comunicados por algunos autores en el contexto de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (389-391), aunque otros obtuvieron esta ratio con una tendencia opuesta (392).

En su conjunto, estos datos preliminares apoyan la idea de que la fisiopatología de la EHGNA (y de la esteatohepatitis no alcohólica, que en ocasiones le sucede) está probablemente condicionada por multitud de factores todavía no bien conocidos, que dificultan la interpretación de los resultados de los análisis metagenómicos de este trabajo.

5.1.7 Implicaciones inmunológicas de los eucariotas unicelulares intestinales

En las últimas décadas el mundo ha presenciado un llamativo incremento en la incidencia de la obesidad y de las patologías metabólicas, fenómeno en el cual, como se ha comentado anteriormente, algunos autores han querido ver un patrón de diseminación parecido al de las enfermedades infecciosas (271,272). Sea o no un agente infeccioso el causante de la pandemia de la obesidad, es evidente que hay factores ambientales involucrados en el desarrollo de esta enfermedad que están presentes en mayor medida en los países desarrollados. La mayor higiene propia de nuestro medio se ha señalado como uno de estos factores, que lleva asociada la práctica erradicación de parásitos helmínticos y protozoarios del hospedador humano.

Estos seres vivos que catalogamos como parásitos son organismos que han co-evolucionado durante miles de años junto a nuestra especie, adquiriendo mecanismos de evasión de nuestro sistema inmunitario para garantizar su persistencia durante años. Al mismo tiempo, el ser humano se ha servido de su presencia para modular el funcionamiento de su sistema inmunitario y controlar el desarrollo de respuestas inflamatorias excesivas. En este sentido, se ha descrito que perder la inmunomodulación ejercida por parásitos helmínticos predispone al hospedador humano a desarrollar patologías crónicas alérgicas y autoinmunitarias, pero también metabólicas, como el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (393,394). Así, diferentes estudios han encontrado una correlación inversa entre la prevalencia de infecciones producidas por este tipo de organismos y los trastornos metabólicos de su población (395-397) y propuesto el uso de productos derivados de éstos como herramientas terapéuticas contra la resistencia a la insulina y la EHGNA (398).

En la actualidad, se desconoce con precisión qué productos procedentes de los parásitos helmínticos ejercen este efecto protector de la resistencia a la insulina y la diabetes. El hecho que sí está reconocido es que estas infestaciones inducen de forma natural una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en el hospedador, la cual beneficia tanto al parásito como a este último: al tiempo que previene su eliminación definitiva, el helminto protege al organismo hospedador de las respuestas inmunitarias excesivas. Esta respuesta inmunitaria se caracteriza por la intervención de eosinófilos, basófilos y

mastocitos, por la producción de grandes cantidades de IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, y por el estímulo a las células B a generar grandes cantidades de IgE específicas. Al mismo tiempo, se genera sobre las células inmunitarias un bloqueo en la síntesis de las citoquinas propias de la respuesta inflamatoria Th1 (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Este efecto antiinflamatorio se acompaña de una reducción en la activación macrofágica a nivel del tejido adiposo blanco, y de la decantación hacia el fenotipo M2 del macrófago (111). Por lo tanto, estos parásitos tienen la habilidad de modificar la respuesta inflamatoria del hospedador y pueden jugar un importante papel en el desarrollo de la *lipoinflamación*, asociada a la obesidad metabólicamente insana. En este sentido, estudios en modelos animales han asociado las respuestas inmunitarias Th2 inducidas por helmintos con una mejora de la sensibilidad a la insulina, una reducción de la adipogénesis y una prevención de la destrucción de las células beta-pancreáticas (revisado en (393)).

Al margen de los helmintos, ciertos parásitos protozoarios también tienen capacidad de manipular la respuesta inmunitaria del hospedador decantándola hacia una de tipo Th2, mediante la liberación de ciertas moléculas. Así, es conocido que *Leishmania* spp. puede suprimir la producción de algunas citoquinas de la respuesta Th1 y reconducirla hacia un fenotipo Th2, que resulte más favorable a su supervivencia (399). Otros protozoos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp. o *Trypanosoma* spp. también pueden modificar el perfil de citoquinas del hospedador y alterar la respuesta inmunitaria, aunque los mecanismos moleculares implicados todavía están por definir (400). No hemos encontrado estudios previos que hayan valorado esta circunstancia en el caso de los protozoos intestinales que se analizaron en este trabajo.

En este estudio no fuimos capaces de obtener resultados consistentes en lo que se refiere a los niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias analizadas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Por ello, no pudimos comparar a los sujetos en función del estado de colonización y así encontrar diferencias que sugirieran un patrón de respuesta inmunitaria diferente conferida por los protozoos parásitos. Por otro lado, atendiendo a los resultados de las inmunoglobulinas analizadas, no se objetivaron diferencias en los niveles plasmáticos de IgE en función de la presencia de microeucariotas parásitos. La única diferencia

hallada afectó al recuento absoluto de eosinófilos y monocitos (células que se asocian a la respuesta inmunitaria de tipo Th2), que resultó mayor en el subgrupo de pacientes colonizados, pero sin hallarse ningún caso de hipereosinofilia.

Con todo, a fin de estudiar los efectos de la colonización por estos protozoos sobre la respuesta inmunitaria del hospedador sería necesario reproducir el estudio en una nueva población, incluyendo citoquinas representantes tanto de la respuesta inmunitaria Th1 como de la Th2.

5.1.8 *Implicaciones sobre el estado inflamatorio de los eucariotas unicelulares intestinales*

La inflamación sistémica de bajo grado es un rasgo propio de la obesidad crónica, ampliamente descrito en la literatura (85-87) y que, como se ha comentado con anterioridad, se ha asociado a la resistencia a la insulina y a multitud de trastornos metabólicos. Este fenómeno sistémico es evidenciable en los sujetos que la padecen como un aumento de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) (87,96).

Sin embargo, todavía no se conocen bien los mecanismos que conducen a la polarización del macrófago del tejido adiposo blanco hacia un fenotipo M1 en vez del fenotipo M2, y que producen *lipoinflamación*. Tampoco se ha llegado a dilucidar la causa por la que ciertos sujetos con un exceso de adiposidad desarrollan este tipo de respuesta proinflamatoria, mientras que otros permanecen años sin desencadenarla. En nuestra investigación quisimos valorar si la colonización por los microorganismos de estudio podía modular este fenómeno.

Dado que la respuesta inflamatoria es altamente inespecífica, en el reclutamiento de pacientes de este estudio se excluyeron a aquellos individuos que en el momento de la recogida de muestras sanguíneas mostraron una enfermedad intercurrente que supusiera una situación de inflamación con repercusiones sistémicas. Atendiendo a los biomarcadores de inflamación recogidos, obtuvimos niveles medios de proteína C reactiva y de ferritina ligeramente elevados para el rango de referencia del laboratorio (8,4 mg/L y 143,4 ng/mL, respectivamente). Este hallazgo, que es habitual en otros trabajos comunicados, se interpretó como un reflejo de la situación de inflamación crónica de bajo grado propia de la obesidad. De forma coherente, los niveles de proteína C reactiva fueron discretamente más elevados en los subgrupos de sujetos con mayor comorbilidad metabólica (resistentes a la insulina y que padecían EHGNA o hiperuricemia).

En la comparación por subgrupos en función de la presencia de colonización por parásitos, no obtuvimos diferencias en los niveles de biomarcadores de inflamación sistémica, salvo quizá por una tendencia no significativa hacia niveles de proteína C reactiva más elevados en los positivos para *G. intestinalis*

Discusión

(10,7 mg/L). Este hallazgo lo interpretamos como un argumento más a favor de la ausencia de efectos perjudiciales sistémicos asociados a la presencia de estos microorganismos, que más probablemente establecen una relación con el hospedador de tipo comensal.

5.1.9 Implicaciones sobre el estrés oxidativo de los eucariotas unicelulares intestinales

De forma paralela a la respuesta de inflamación crónica de bajo grado, la obesidad se ha asociado ampliamente con una situación de estrés oxidativo exacerbado, y con el desarrollo de sus múltiples comorbilidades: resistencia a la insulina (118-120), hipertensión arterial (123), diabetes mellitus tipo 2 (124), hígado graso no alcohólico (126,127), aterosclerosis (125) o enfermedad cardiovascular (121). En circunstancias como esta, de exposición crónica a especies reactivas de oxígeno, para contrarrestarlas los tejidos humanos tienden a incrementar la expresión de las enzimas del sistema antioxidante de defensa (401). No obstante, a largo plazo estos mecanismos defensivos pueden verse desbordados si la fuente de estrés oxidativo no es controlada, conduciendo finalmente al daño oxidativo. En esta línea, se ha descrito que en sujetos que padecen obesidad crónica están disminuidos los niveles de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, peroxidasa del glutatión y catalasa (270).

Por otro lado, el estrés oxidativo es una respuesta fisiológica desencadenada por los tejidos como mecanismo defensivo ante las infecciones protozoarias, y que va destinado a contenerlas (256-258). La influencia de los protozoos parásitos sobre el estado redox de un individuo con obesidad no ha sido aún explorada, y la confluencia de estos dos factores, ambos origen de estrés oxidativo, podría dar lugar a respuestas antioxidantes en el hospedador que se potenciasen entre sí. La inflamación sistémica de bajo grado y el estrés oxidativo son dos fenómenos que se desarrollan de manera paralela en el tejido adiposo blanco enfermo del obeso, y que contribuyen a la aparición de la resistencia a la insulina y de las complicaciones de la obesidad. Por ello, la participación de los protozoos parásitos en la modulación de la respuesta antioxidante del hospedador podría jugar un papel relevante a la hora de contrarrestar el estrés oxidativo y evitar la progresión hacia estas complicaciones.

En este estudio pudimos objetivar importantes diferencias significativas al valorar los parámetros de estrés oxidativo de forma comparada en función de la colonización intestinal por los microeucariotas parásitos. Éstas consistieron en una hiperactivación de las defensas antioxidantes sistémicas (TAC

significativamente más elevada y tendencia a niveles mayores de SOD-3) junto con ratios GSH/GSSG más bajas en aquellos sujetos que alojaban en su ecosistema intestinal uno de los microorganismos parásitos estudiados. No se hallaron diferencias en el marcador de peroxidación lipídica analizado (MDA), ni en las especies reactivas de nitrógeno (NOX), lo cual refleja que esta situación no se acompañaba de mayor grado de lesión tisular por estrés oxidativo. Al analizar estos resultados de manera estratificada en función de la situación metabólica de los sujetos, los niveles de TAC se mantenían más elevados en el subgrupo de colonizados independientemente de su resistencia a la insulina, mientras que la ratio GSH/GSSG tenía un comportamiento inverso entre resistentes y sensibles a la insulina. Por otro lado, si se analizaban estos datos por especies parásitas, una vez más existían diferencias no significativas entre los colonizados por *G. intestinalis* y los positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*, siendo que estos últimos eran los que mostraban una mayor respuesta antioxidante.

Es bien sabido que el equilibrio redox está condicionado por multitud de variables, que podrían haberse distribuido de manera heterogénea entre los dos subgrupos analizados, aumentando falsamente las diferencias halladas. Sin embargo, las variables clínicas edad, IMC, hábito tabáquico y presencia de comorbilidades metabólicas tenían una prevalencia similar entre los dos grupos comparados (salvo la diabetes tipo 2, con menor prevalencia entre los colonizados), por lo que las diferencias mencionadas no serían atribuibles a estos factores. Por otro lado, tras analizar la composición de la dieta a través de los registros y cuestionarios dietéticos, tampoco se identificó un patrón diferencial en el aporte de antioxidantes entre colonizados y no colonizados que pudiera haber empañado los resultados obtenidos. Lo mismo ocurrió al comparar los niveles plasmáticos de las vitaminas A y E entre subgrupos de colonización.

Una interpretación a la mayor capacidad antioxidante del subgrupo de pacientes con parásitos intestinales es que el hospedador afecto de una colonización crónica desarrollaría una respuesta antioxidante exagerada, a modo de mecanismo de defensa frente a la sobrecarga crónica de estrés oxidativo; secundariamente, y a través de la respuesta Th2 que se asocia a la colonización, el protozoo tendría un papel modulador del daño oxidativo

ejercido sobre el hospedador obeso, quizá protegiéndolo de las complicaciones asociadas a la *lipoinflamación* y de la resistencia a la insulina. Este dato explicaría el valor más bajo de índice HOMA-IR que obtuvimos en el subgrupo de obesos colonizados, y la tendencia a la menor cantidad de complicaciones metabólicas.

Sin embargo, no es posible concluir una relación causa-efecto, dado que la detección de estos microeucariotas en algunos sujetos también podría ser contemplada como un mero indicador de una respuesta defensiva menos marcada, que facilitaría la colonización intestinal crónica. En este escenario, los sujetos con una predisposición a desarrollar respuestas inmunitarias de tipo Th2 (mediadas por la IL-10) eliminarían con más dificultad los parásitos frente a las infecciones protozoarias, pero también asociarían una menor polarización hacia el fenotipo M1 del macrófago adipocitario, menor inflamación sistémica, y *por ende* estarían más protegidos frente al síndrome metabólico.

En definitiva, todavía existe mucho desconocimiento sobre cómo tiene lugar la cascada de inflamación y de estrés oxidativo que se desencadena en respuesta a la obesidad y a la colonización intestinal por eucariotas unicelulares intestinales. También sería necesario estudiar la contribución sobre el balance redox de cada especie parásita por separado, ya que, en base a los indicios disponibles, podrían ejercer acciones muy distintas.

5.1.10 Interpretación conjunta de los resultados

En base a todo lo expuesto, existen suficientes evidencias como para considerar que la colonización intestinal por los microeucariotas estudiados no supone un perjuicio grave para el hospedador humano con obesidad (ni en la aparición de sintomatología abdominal, ni en la alteración de su estado nutricional, ni en condicionar una mayor inflamación sistémica), por lo que no habría motivo para su erradicación indiscriminada.

Por otro lado, diferentes resultados obtenidos apuntan hacia el hecho de que esta colonización puede reportar diferentes beneficios al hospedador: tanto a nivel de resistencia a la insulina y desarrollo de complicaciones metabólicas, como de diversidad alfa y beta del ecosistema intestinal y de aumento de la capacidad antioxidante total. No obstante, existen diferencias en esta afirmación en función de la especie colonizadora, siendo que los beneficios metabólicos se concentran en el subgrupo de pacientes positivos para *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*. En cambio, existen datos de un posible efecto nocivo asociado a la presencia de *G. intestinalis*: niveles más bajos de vitamina A; tendencia no significativa hacia la mayor prevalencia de diabetes tipo 2, de síndrome metabólico y de positividad en los índices de EHNA; tendencia hacia una menor capacidad antioxidante total; así como menores índices de alfa y beta diversidad y patrones intestinales más disbióticos. Con todo, sería necesario estudiar la relación entre estas variables y la colonización de cada uno de los microorganismos por separado, para poder aislar el efecto concreto de cada especie.

En resumen, ante los resultados de este trabajo no es posible concluir si las diferencias metabólico-oxidativas que se observaron asociadas a la presencia de los microeucariotas (y más concretamente, a *Blastocystis* sp.) son consecuencia directa de su colonización, dado que podrían ser circunstancias coexistentes sin estar ligadas por la causalidad. Sería más conveniente, por ello, contemplar el papel de estos protozoos unicelulares como biomarcadores de un ecosistema intestinal más o menos saludable, y desterrar el uso del término “parásito” para definirlos. En su lugar, tal vez podría sustituirse por el término “patobionte”, empleado para denominar a aquellos microorganismos que colonizan nuestra especie y que carecen de patogenicidad demostrada, y que incluso (como ya sugieren estudios recientes sobre colonización en individuos

sintomáticos y asintomáticos) pueden ejercer un efecto beneficioso sobre el hospedador (402).

Con todo, en este novedoso campo de investigación todavía son más frecuentes las incógnitas que las certezas, por lo que animamos a otros investigadores a reproducir nuestros hallazgos y a continuar explorando el trinomio obesidad, microbiota y microeucariotas intestinales.

5.2 Limitaciones del estudio

Parte de la información empleada en el actual estudio fue recopilada a partir de entrevistas clínicas llevadas a cabo con cada uno de los participantes. En éstas se recogió información referida sobre la exposición previa a factores de riesgo parasitológico y se les solicitó una valoración subjetiva de su sintomatología gastrointestinal en base a escalas analógicas visuales. Somos conscientes de que puede haber existido un sesgo de memoria atendiendo a exposiciones remotas a factores de riesgo microbiológico, así como variabilidad interindividual en la valoración de la sintomatología abdominal, que pueden haber afectado a los resultados.

Considerando que uno de los criterios de inclusión para la población de este estudio era presentar obesidad grave, resultó llamativo que la prevalencia de complicaciones metabólicas y antecedentes de enfermedad cardiovascular fuese relativamente baja en el momento de la valoración, lo que limitó la potencia estadística en las comparaciones realizadas entre subgrupos. Atribuimos este hecho a la baja edad media de los sujetos incluidos en el estudio, que tuvo lugar por azar. En este sentido, sería interesante estudiar la presencia intestinal de eucariotas unicelulares en poblaciones más extensas de sujetos con obesidad, para poder comparar la prevalencia e incidencia de estos trastornos metabólico-cardiovasculares con mayor potencia estadística, y establecer si existen diferencias significativas.

En la actualidad, se considera que los métodos de diagnóstico molecular son los más fiables para el diagnóstico microbiológico, tanto de especies concretas de bacterias como de protozoos. Pese a que la sensibilidad de estas técnicas es muy elevada, es dependiente de la excreción fecal de fragmentos de DNA relativamente bien conservados. Por lo tanto, la posibilidad de haber obtenido falsos negativos para alguno de los microorganismos valorados existe, especialmente para las especies como *G. intestinalis*, que habitan en los segmentos más proximales del intestino.

Por otro lado, la variabilidad inter-observador que presentan las exploraciones ecográficas es ampliamente conocida. En la población con obesidad mórbida esta prueba pierde todavía más precisión debido a la existencia del grueso panículo adiposo, que dificulta la exploración abdominal. Por tanto, algunos

participantes de este estudio pudieron ser catalogados con un grado incorrecto de esteatosis hepática. Sin embargo, de tener lugar este sesgo habría estado presente en todos los sujetos por igual, independientemente del estado de colonización intestinal.

Finalmente, somos conscientes de la posibilidad de sesgos en la recogida de datos dietéticos por parte de los participantes del estudio. Los registros y cuestionarios dietéticos empleados requieren de la capacidad del usuario para recordar la frecuencia de consumo de alimentos y de su motivación para rellenar adecuadamente los documentos. El rigor de la información obtenida fue muy heterogéneo entre participantes. No obstante, es posible que la estimación de los aportes nutricionales realizada a partir de estos cuestionarios no haya sido del todo precisa. Sería por tanto recomendable diseñar estudios que confirmen los resultados del presente estudio en los que la variable dietética estuviera más controlada desde un inicio.

5.3 Líneas de investigación futuras

En base a todo lo expuesto, considero que actualmente es necesario seguir ahondando en el efecto que ejerce la presencia de los protozoos estudiados tanto sobre la composición y función de la microbiota intestinal, como sobre la *lipoinflamación* sistémica, el estrés oxidativo y las comorbilidades asociadas a la obesidad.

Por un lado, sería preciso discernir las repercusiones que tienen cada una de las especies parásitas sobre el hospedador humano de manera independiente. Por otro, la existencia de parasitaciones mixtas es frecuente y la coexistencia de dos de los parásitos estudiados puede ejercer efectos imprevisibles sobre el hospedador, desde neutralizantes a potenciadores entre sí; por tanto, sería necesario estudiar las multiparasitaciones de manera adicional.

Finalmente, en el caso de *Blastocystis* sp. es prioritario establecer si la colonización por un subtipo u otro podría ser responsable de efectos divergentes sobre la homeostasis del hospedador, lo que obligaría a subtiparlo tras su detección, para orientar la actitud terapéutica.

En este sentido, previo a los estudios en humanos, el uso de animales gnotobióticos (libres de gérmenes) podría ayudar a evaluar el impacto directo de estos parásitos unicelulares eucariotas sobre la composición de la microbiota intestinal y sobre en la modulación del sistema inmunitario, metabólico y endocrino del hospedador.

6 Conclusiones

Tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se detallan a continuación las conclusiones extraídas:

1. Existe una elevada (51%) prevalencia de colonización intestinal por microorganismos eucariotas unicelulares en la población de estudio. Concretamente, la especie más frecuente es *Blastocystis* sp. (44,2%), seguida de *Dientamoeba fragilis* (11,5%) y de *Giardia intestinalis* (8,7%). No se detectan casos positivos *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* ni *Cryptosporidium* spp.
2. El consumo habitual de comida de cultivo ecológico es un factor de riesgo epidemiológico de adquisición y colonización intestinal por los microeucariotas estudiados. No hay correlación con el contacto con niños ni animales domésticos, ni con la realización de viajes al extranjero, ni con profesiones que implican contacto con excretas humanas.
3. La colonización intestinal por los microeucariotas parásitos se asocia con una menor frecuencia deposicional diaria, y con menores quejas de sintomatología abdominal (concretamente, hinchazón abdominal y flatulencias); la menor frecuencia de molestias gastrointestinales entre los colonizados está condicionada por el grupo de sujetos positivos para *Blastocystis* sp., sin presentar este patrón diferencial los colonizados por los otros dos parásitos.
4. No existe asociación entre la colonización intestinal por microeucariotas y una diferente composición corporal analizada por bioimpedancia eléctrica.
5. La colonización intestinal por parásitos eucariotas unicelulares se asocia con índices HOMA-R significativamente menores, con una tendencia no significativa hacia una menor prevalencia de comorbilidades metabólicas, y con una tendencia hacia una EHGNA más leve. La DT2 es menos frecuente en sujetos colonizados por *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis*.

6. La colonización por parásitos intestinales no condiciona diferencias significativas en los niveles plasmáticos de ninguno de los micronutrientes recogidos.
7. La colonización intestinal por los microeucariotas no provoca cambios en los biomarcadores de inflamación sistémica analizados: niveles plasmáticos de proteína C reactiva, ferritina, IL-1 β , IL-6 o TNF- α .
8. Los sujetos colonizados a nivel intestinal por los microorganismos estudiados presentan una hiperactivación de las defensas antioxidantes, manifiesta por niveles más altos de TAC y una tendencia hacia la mayor actividad de la SOD-3, sin cambios en el marcador de peroxidación lipídica MDA.
9. En el análisis de diversidad alfa y beta de la microbiota intestinal se evidencia un patrón diferencial en función de la especie parásita colonizadora: los participantes portadores de *Blastocystis* sp. y/o *D. fragilis* muestran índices más elevados y una microbiota intestinal más rica, expresada por el número de recuento de taxones, frente a los parasitados por *G. intestinalis*. Este patrón es consistente tras estratificar por la situación metabólica del sujeto.
10. En el análisis metagenómico, no se identifican diferencias en la abundancia relativa de los principales filos, familias y géneros del ecosistema bacteriano intestinal que vengan determinadas por la colonización intestinal por los eucariotas unicelulares.
11. La valoración cualitativa de la dieta seguida por los participantes del estudio muestra una baja calidad nutricional de manera prácticamente universal. No existen diferencias cuantitativas ni cualitativas por macro ni micronutrientes en función de la variable colonización. No se objetivan diferencias claras en la estructura del ecosistema bacteriano intestinal ni con los biomarcadores de estrés oxidativo en función de esta variable.

7 *Bibliografía*

- (1) National Heart, Lung and Blood Institute in cooperation with the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US). Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report. National Heart, Lung, and Blood Institute; 1998.
- (2) Patel P, Abate N. Body Fat Distribution and Insulin Resistance. *Nutrients* 2013 Jun 05;5(6):2019-2027.
- (3) Lapidus L, Bengtsson C, Larsson BO, Pennert K, Rybo E, Sjöström L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;289(6454):1257-1261.
- (4) Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr* 2004;79(3):379-384.
- (5) Sharma AM, Kushner RF. A proposed clinical staging system for obesity. *International Journal of Obesity* 2009 Mar;33(3):289-295.
- (6) Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity. *Endocrine practice* 2016 Jul;22 Suppl 3(Supplement 3):1-203.
- (7) Lecube A, Monereo S, Rubio MA, Martínez-de-Icaya P, Martí A, Salvador J, et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. *Endocrinología, diabetes y nutrición* 2017;64(1):15-22.
- (8) Garvey WT, Mechanick JI. Proposal for a scientifically correct and medically actionable disease classification system (ICD) for obesity. *Obesity* 2020;28(3):484-492.
- (9) Costa-Font J, Mas N. 'Globesity'? The effects of globalization on obesity and caloric intake. *Food Policy* 2016;64:121-132.
- (10) Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* 2019;92:6-10.
- (11) Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet (British edition)* 2011;378(9793):804-814.

- (12) Aranceta J, Rodrigo CP, Majem LS, Barba LR, Izquierdo JQ, Vioque J, et al. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Medicina clínica* 2003;120(16):608-612.
- (13) Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008–2010: the ENRICA study. *Obesity reviews* 2012;13(4):388-392.
- (14) Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012;55(1):88.
- (15) Félix-Redondo FJ, Grau M, Baena-Díez JM, Dégano IR, de León AC, Guembe MJ, et al. Prevalence of obesity and associated cardiovascular risk: the DARIOS study. *BMC public health* 2013 Jun 05;13(1):542.
- (16) Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, Lázaro-Masedo S. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Revista Española de Cardiología* 2016;69(6):579-587.
- (17) Tremmel M, Gerdtham NG, Nilsson PM, Saha S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 04-19;14(4).
- (18) Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *The Lancet* 2011 -02-12;377(9765):557.
- (19) Kelly T, Yang W, Chen C, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity* 2008 Sep;32(9):1431-1437.
- (20) Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obesity facts* 2015;8(6):402-424.
- (21) Wharton S, Lau DC, Vallis M, Sharma AM, Biertho L, Campbell-Scherer D, et al. Obesity in adults: a clinical practice guideline. *CMAJ* 2020;192(31):E875-E891.
- (22) Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine* 2013;368(14):1279-1290.

- (23) Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases* 2008;18(2):158-168.
- (24) Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443(7109):289-295.
- (25) Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404(6778):661-671.
- (26) Jordan SD, Könnner AC, Brüning JC. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cellular and molecular life sciences* 2010;67(19):3255-3273.
- (27) Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature reviews endocrinology* 2019;15(9):507-524.
- (28) Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology* 2011;11(2):85-97.
- (29) Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and obesity: role and clinical implication. *Frontiers in Endocrinology* 2021;12:585887.
- (30) Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 2015;64(1):35-46.
- (31) Fang H, Judd RL. Adiponectin regulation and function. *Comprehensive Physiology* 2011;8(3):1031-1063.
- (32) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* 2001;7(8):941-946.
- (33) Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases* 2006;16(8):569-574.
- (34) Loh R, Kingwell BA, Carey AL. Human brown adipose tissue as a target for obesity management; beyond cold-induced thermogenesis. *Obesity reviews* 2017;18(11):1227-1242.
- (35) Bhatt PS, Dhillo WS, Salem V. Human brown adipose tissue—function and therapeutic potential in metabolic disease. *Current opinion in pharmacology* 2017;37:1-9.
- (36) Hillman JB, Tong J, Tschop M. Ghrelin biology and its role in weight-related disorders. *Discovery medicine* 2011;11(61):521-528.

- (37) Perry B, Wang Y. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition & diabetes* 2012;2(1):e26.
- (38) Polyzos SA, Anastasilakis AD, Efstathiadou ZA, Makras P, Perakakis N, Kountouras J, et al. Irisin in metabolic diseases. *Endocrine* 2018;59(2):260-274.
- (39) Nadal A, Quesada I, Tudurí E, Nogueiras R, Alonso-Magdalena P. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nature Reviews Endocrinology* 2017;13(9):536-546.
- (40) Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2013;27(1):73-83.
- (41) Long SL, Gahan CG, Joyce SA. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2017;56:54-65.
- (42) Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal* 2016 May;92(1087):286-300.
- (43) Eid HM, Wright ML, Anil Kumar NV, Qawasmeh A, Hassan STS, Mocan A, et al. Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medicinal Plant and Food Ingredients. *Frontiers in pharmacology* 2017;8:387.
- (44) Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology and Therapeutics* 2011;130(2):202-212.
- (45) Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes* 2014;5(1):3-17.
- (46) E. Blum H. The Human Microbiome: An Emerging Key Player in Health and Disease. *Archives of Clinical and Biomedical Research* 2017;1(2):85-95.
- (47) Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical Design* 2009;15(13):1546-1558.
- (48) Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO molecular medicine* 2011;3(9):559-572.
- (49) Vandenbroeck IP, Goossens J, Clemens M. Building the obesity system map. *Foresight Tackling Obesity: Future Choices* 2007.

- (50) Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care* 2008;31(9):1898-1904.
- (51) Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. Components of the “metabolic syndrome” and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51(10):3120-3127.
- (52) Isomaa BO, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24(4):683-689.
- (53) Lakka H, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288(21):2709-2716.
- (54) Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease models & mechanisms* 2009;2(5-6):231-237.
- (55) Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine* 2011;9(1):1-13.
- (56) Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2012;35(11):2402-2411.
- (57) Becker S, Dossus L, Kaaks R. Obesity related hyperinsulinaemia and hyperglycaemia and cancer development. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2009;115(2):86-96.
- (58) Jehan S, Zizi F, Pandi-Perumal SR, Wall S, Auguste E, Myers AK, et al. Obstructive sleep apnea and obesity: implications for public health. *Sleep medicine and disorders: international Journal* 2017;1(4).
- (59) Kulkarni K, Karssiens T, Kumar V, Pandit H. Obesity and osteoarthritis. *Maturitas* 2016;89:22-28.
- (60) Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2007;2(3):550-562.
- (61) Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *New England Journal of Medicine* 2002;347(5):305-313.
- (62) Darvall K, Sam RC, Silverman SH, Bradbury AW, Adam DJ. Obesity and thrombosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2007;33(2):223-233.

- (63) Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, et al. Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49(5):565-571.
- (64) Stender S, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Elevated body mass index as a causal risk factor for symptomatic gallstone disease: a Mendelian randomization study. *Hepatology* 2013;58(6):2133-2141.
- (65) Álvarez-Castro P, Sangiao-Alvarellos S, Brandón-Sandá I, Cordido F. Endocrine function in obesity. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* 2011;58(8):422-432.
- (66) Poddar M, Chetty Y, Chetty VT. How does obesity affect the endocrine system? A narrative review. *Clinical obesity* 2017;7(3):136-144.
- (67) Walsh JS, Bowles S, Evans AL. Vitamin D in obesity. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 2017;24(6):389-394.
- (68) Escobar-Morreale HF, Santacruz E, Luque-Ramírez M, Botella Carretero JI. Prevalence of 'obesity-associated gonadal dysfunction' in severely obese men and women and its resolution after bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2017;23(4):390-408.
- (69) Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI, San Millán JL, Escobar-Morreale HF. Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. *Archives of Internal Medicine* 2006;166(19):2081-2086.
- (70) Xanthakos SA. Nutritional deficiencies in obesity and after bariatric surgery. *Pediatric Clinics* 2009;56(5):1105-1121.
- (71) Kim TN, Choi KM. The implications of sarcopenia and sarcopenic obesity on cardiometabolic disease. *Journal of Cellular Biochemistry* 2015;116(7):1171-1178.
- (72) Choi KM. Sarcopenia and sarcopenic obesity. *Endocrinology and Metabolism* 2013, 28(2), 86-89.
- (73) Stenholm S, Harris TB, Rantanen T, Visser M, Kritchevsky SB, Ferrucci L. Sarcopenic obesity-definition, etiology and consequences. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2008;11(6):693.
- (74) Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *The New England Journal of Medicine* 2010 Dec 02:363(23):2211-2219.
- (75) Barroso M, Goday A, Ramos R, Marín-Ibañez A, Guembe MJ, Rigo F, et al. Interaction between cardiovascular risk factors and body mass index and

10-year incidence of cardiovascular disease, cancer death, and overall mortality. *Preventive medicine* 2018 Feb;107:81-89.

(76) Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of All-Cause Mortality With Overweight and Obesity Using Standard Body Mass Index Categories: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA: the Journal of the American Medical Association* 2013 Jan 02;309(1):71-82.

(77) Di Angelantonio E, Bhupathiraju SN, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, de Gonzalez AB, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *The Lancet* 2016;388(10046):776-786.

(78) Meigs JB, Wilson PW, Fox CS, Vasan RS, Nathan DM, Sullivan LM, et al. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;91(8):2906-2912.

(79) Rey-Lopez JP, De Rezende LF, Pastor-Valero M, Tess BH. The prevalence of metabolically healthy obesity: a systematic review and critical evaluation of the definitions used. *Obesity reviews* 2014;15(10):781-790.

(80) Jung CH, Lee WJ, Song K. Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *The Korean Journal of Internal Medicine* 2017;32(4):611.

(81) Marini MA, Succurro E, Frontoni S, Hribal ML, Andreozzi F, Lauro R, et al. Metabolically healthy but obese women have an intermediate cardiovascular risk profile between healthy nonobese women and obese insulin-resistant women. *Diabetes Care* 2007;30(8):2145-2147.

(82) Eckel N, Meidtner K, Kalle-Uhlmann T, Stefan N, Schulze MB. Metabolically healthy obesity and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Preventive Cardiology* 2016;23(9):956-966.

(83) Schröder H, Ramos R, Baena-Díez JM, Mendez MA, Canal DJ, Fíto M, et al. Determinants of the transition from a cardiometabolic normal to abnormal overweight/obese phenotype in a Spanish population. *European Journal of Nutrition* 2015 -05;53(6):1345.

(84) Heyward VH, Wagner DR. Applied body composition assessment. *Human Kinetics*; 2004.

(85) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2003 Dec 15;112(12):1821-1830.

- (86) Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006 Dec 14;444(7121):860-867.
- (87) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante J, Anthony W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 2003 Dec;112(12):1796-1808.
- (88) O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin II, et al. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN- γ in inflammation in human adipose tissue. *International Journal of Obesity* 2009;33(9):978-990.
- (89) Eguchi K, Nagai R. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *The Journal of Clinical Investigation* 2017;127(1):14-23.
- (90) Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society* 2011;70(4):408-417.
- (91) Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, Leclercq IA. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010;298(1):G107-G116.
- (92) Bouzakri K, Zierath JR. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(11):7783-7789.
- (93) Obstfeld AE, Soguru E, Thearle M, Francisco A, Gayet C, Ginsberg HN, et al. CC chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes* 2010;59(4):916-925.
- (94) Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Frontiers in immunology* 2016;6:637.
- (95) Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation* 2007 Jan;117(1):175-184.
- (96) Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2017 Jan 3;127(1):1-4.
- (97) Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. *International Journal of Endocrinology* 2015;2015.

- (98) Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C, et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Frontiers in physiology* 2019;10:1607.
- (99) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259(5091):87-91.
- (100) Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular sciences* 2019;20(9):2358.
- (101) Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of Clinical Investigation* 2011;121(6):2094-2101.
- (102) Lee YS, Kim J, Osborne O, Sasik R, Schenk S, Chen A, et al. Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 2014;157(6):1339-1352.
- (103) Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 2006;116(11):3015-3025.
- (104) McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2017 Jan 3;127(1):5-13.
- (105) Patrice D. Cani, Rodrigo Bibiloni, Claude Knauf, Aurélie Waget, Audrey M. Neyrinck, Nathalie M. Delzenne, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 2008 Jun 1;57(6):1470-1481.
- (106) Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine* 2009;15(8):930-939.
- (107) O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Winters BR, Diggs BS, Zhu X, et al. Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN- γ knockout mice. *Metabolism* 2012;61(8):1152-1161.
- (108) Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature Medicine* 2009;15(8):921-929.
- (109) Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 2012;486(7404):549-553.

- (110) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8 effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 2009;15(8):914-920.
- (111) Wu D, Molofsky AB, Liang H, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 2011;332(6026):243-247.
- (112) Sittipo P, Lobionda S, Lee YK, Maynard CL. Intestinal microbiota and the immune system in metabolic diseases. *Journal of Microbiology* 2018;56(3):154-162.
- (113) Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly* 2012;142:w13659.
- (114) Keaney JF, Larson MG, Vasani RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and Systemic Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003;23(3):434-439.
- (115) Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences* 2011;12(5):3117-3132.
- (116) Karaouzene N, Merzouk H, Aribi M, Merzouk SA, Berrouiguet AY, Tessier C, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: a comparison of older with young men. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2011;21(10):792-799.
- (117) Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2012;68(4):701-711.
- (118) Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440(7086):944-948.
- (119) Facchini FS, Hua NW, Reaven GM, Stoohs RA. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? *Free Radical Biology and Medicine* 2000;29(12):1302-1306.
- (120) Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2008;19(8):491-504.

- (121) Karimi Galougahi K, Antoniadis C, Nicholls SJ, Channon KM, Figtree GA. Redox biomarkers in cardiovascular medicine. *European Heart Journal* 2015 Jul 1;36(25):1576-1582.
- (122) Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences* 2009;84(21-22):705-712.
- (123) Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991;88(22):10045-10048.
- (124) Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews immunology* 2011;11(2):98-107.
- (125) Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic Journal of Cardiology* 2009;50(5):402-409.
- (126) Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2005;22:71-73.
- (127) Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, Farooq S, Ravikumar R, Mohan V, et al. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clinical Biochemistry* 2010;43(10-11):815-821.
- (128) Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2006;6(10):772-783.
- (129) Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *The Lancet infectious diseases* 2006;6(7):438-446.
- (130) Bamgbade OA, Rutter TW, Nafiu OO, Dorje P. Postoperative complications in obese and nonobese patients. *World Journal of Surgery* 2007;31(3):556-560.
- (131) Bercault N, Boulain T, Kuteifan K, Wolf M, Runge I, Fleury J. Obesity-related excess mortality rate in an adult intensive care unit: A risk-adjusted matched cohort study. *Critical Care Medicine* 2004;32(4):998-1003.
- (132) Nasraway Jr SA, Albert M, Donnelly AM, Ruthazer R, Shikora SA, Saltzman E. Morbid obesity is an independent determinant of death among surgical critically ill patients. *Critical Care Medicine* 2006;34(4):964-70; quiz 971.
- (133) Dossett LA, Heffernan D, Lightfoot M, Collier B, Diaz JJ, Sawyer RG, et al. Obesity and pulmonary complications in critically injured adults. *Chest* 2008;134(5):974-980.

- (134) Akinnusi ME, Pineda LA, El Solh AA. Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality: a meta-analysis. *Critical Care Medicine* 2008;36(1):151-158.
- (135) Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, et al. Influence of obesity on immune function. *Journal of the American Dietetic Association* 1999;99(3):294-299.
- (136) Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004;110(12):1564-1571.
- (137) Milner JJ, Beck MA. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proceedings of the Nutrition Society* 2012;71(2):298-306.
- (138) Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012;94(10):2082-2088.
- (139) La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology* 2004;4(5):371-379.
- (140) Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;93(25):14564-14568.
- (141) Caldefie-Chezet F, Poulin A, Vasson M. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radical Research* 2003;37(8):809-814.
- (142) Montecucco F, Bianchi G, Gnerre P, Bertolotto M, Dallegri F, Ottonello L. Induction of neutrophil chemotaxis by leptin: crucial role for p38 and Src kinases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1069(1):463-471.
- (143) Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;298(3):297-302.
- (144) Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *The Journal of Clinical Investigation* 1999;104(8):1051-1059.
- (145) Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clinical & Experimental Immunology* 2003;133(1):11-19.

- (146) Claycombe K, King LE, Fraker PJ. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(6):2017-2021.
- (147) Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;110(8):1093-1103.
- (148) Defronzo RA, Soman V, Sherwin RS, Hendler R, Felig P. Insulin binding to monocytes and insulin action in human obesity, starvation, and refeeding. *The Journal of Clinical Investigation* 1978;62(1):204-213.
- (149) Viardot A, Grey ST, Mackay F, Chisholm D. Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology* 2007;148(1):346-353.
- (150) Yang H, Youm Y, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, et al. Obesity accelerates thymic aging. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2009;114(18):3803-3812.
- (151) Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research* 2003;44(3):479-486.
- (152) Torres L, Martins VD, Faria AMC, Maioli TU. The intriguing relationship between obesity and infection. *Journal of Infectiology* 2018;1(1).
- (153) Reeves GM, Postolache TT, Mazaheri S, Snitker S, Langenberg P, Giegling I, et al. A positive association between *T. gondii* seropositivity and obesity. *Frontiers in public health* 2013;1:73.
- (154) Wright SG. Protozoan infections of the gastrointestinal tract. *Infectious disease clinics* 2012; 26(2):323-339.
- (155) Galán-Puchades MT, Trelis M, Sáez-Durán S, Cifre S, Gosálvez C, Sanxis-Furió J, et al. One Health Approach to Zoonotic Parasites: Molecular Detection of Intestinal Protozoans in an Urban Population of Norway Rats, *Rattus norvegicus*, in Barcelona, Spain. *Pathogens* 2021;10(3):311.
- (156) Lhotská Z, Jirků M, Hložková O, Brožová K, Jirsová D, Stensvold CR, et al. A study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech Republic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2020;10.
- (157) El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the

intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. BMC infectious diseases 2016;16(1):1-11.

(158) Rudzińska M, Kowalewska B, Wąż P, Sikorska K, Szostakowska B. *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland—a single center study. Infection, Genetics and Evolution 2019;75:103926.

(159) Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. Journal of Applied Microbiology 2007;102(3):619-629.

(160) Ryan U, Hijjawi N, Feng Y, Xiao L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. International Journal of Parasitology 2019;49(1):1-11.

(161) Amorós I, Alonso JL, Cuesta G. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. Journal of Food Protection 2010;73(6):1138-1140.

(162) Li J, Wang Z, Karim MR, Zhang L. Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. Parasites & Vectors 2020;13(1):1-19.

(163) Paulos S, Köster PC, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Cardona GA, Fernández-Crespo JC, et al. Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. Zoonoses and public health 2018;65(8):993-1002.

(164) Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nature Reviews Microbiology 2010;8(6):413-422.

(165) Soto JM, Dreiling DA. *Giardia lamblia*. American Journal of Gastroenterology (Springer Nature) 1977;67(3).

(166) Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. World Journal of Gastroenterology 2013;19(47):8974.

(167) Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘neglected diseases initiative’. Trends in Parasitology 2006;22(5):203-208.

(168) Minetti C, Chalmers RM, Beeching NJ, Probert C, Lamden K. Giardiasis. BMJ 2016;355.

(169) Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunology 2003;25(5):259-270.

- (170) Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* 2007 Mar;56(3):316-317.
- (171) Allain T, Amat CB, Motta J, Manko A, Buret AG. Interactions of *Giardia* spp. with the intestinal barrier: epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers* 2017;5(1):e1274354.
- (172) Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott K. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* 2002;125(1):11-19.
- (173) Farthing MJ. The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1997;24(1):79-88.
- (174) Tandon BN, Tandon RK, Satpathy BK. Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut* 1977;18(3):176-181.
- (175) Farthing MJ, Keusch GT, Carey MC. Effects of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*. Possible implications for pathogenesis of intestinal disease. *The Journal of Clinical Investigation* 1985;76(5):1727-1732.
- (176) Halliday C, Clark C, Farthing M. *Giardia*-bile salt interactions in vitro and in vivo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988;82(3):428-432.
- (177) Scott KG, Yu LC, Buret AG. Role of CD8 and CD4 T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity* 2004;72(6):3536-3542.
- (178) Troeger H, Epple H, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard G, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 2007;56(3):328-335.
- (179) O'Hara JR, Buret AG. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2008;13(5):7008-7021.
- (180) Beatty JK, Akierman SV, Motta J, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ, et al. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *International Journal for Parasitology* 2017 May;47(6):311-326.
- (181) Iebba V, Santangelo F, Totino V, Pantanella F, Monsia A, Di Cristanziano V, et al. Gut microbiota related to *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp. and *Blastocystis hominis* infections in humans from Côte d'Ivoire. *Journal of Infection in Developing Countries* 2016;10(9):1035-1041.

- (182) Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000prime reports 2015;7.
- (183) Morken MH, Nysaeter G, Strand EA, Hausken T, Berstad A. Lactulose breath test results in patients with persistent abdominal symptoms following *Giardia lamblia* infection. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2008;43(2):141-145.
- (184) Morken MH, Lind RA, Valeur J, Wilhelmsen I, Berstad A. Subjective health complaints and quality of life in patients with irritable bowel syndrome following *Giardia lamblia* infection: A case control study. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2009;44(3):308-313.
- (185) Hanevik K, Wensaas K, Rortveit G, Eide GE, Mørch K, Langeland N. Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after *Giardia* infection: a controlled prospective cohort study. Clinical Infectious Diseases 2014;59(10):1394-1400.
- (186) Trelis M, Taroncher-Ferrer S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Osuna A, et al. *Giardia intestinalis* and fructose malabsorption: a frequent association. Nutrients 2019;11(12):2973.
- (187) Naess H, Nyland M, Hausken T, Follestad I, Nyland HI. Chronic fatigue syndrome after *Giardia* enteritis: clinical characteristics, disability and long-term sickness absence. BMC gastroenterology 2012;12(1):1-7.
- (188) Wahlström A, Sayin SI, Marschall H, Bäckhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. Cell metabolism 2016;24(1):41-50.
- (189) Ridlon JM, Kang D, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. Journal of Lipid Research 2006;47(2):241-259.
- (190) Scott KG, Meddings JB, Kirk DR, Lees–Miller SP, Buret AG. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase–dependent fashion. Gastroenterology 2002;123(4):1179-1190.
- (191) Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Buret AG. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003;100(19):11104-11109.
- (192) Travers M, Sow C, Zirah S, Deregnaucourt C, Chaouch S, Queiroz RM, et al. Deconjugated bile salts produced by extracellular bile-salt hydrolase-like activities from the probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 inhibit *Giardia duodenalis* in vitro growth. Frontiers in Microbiology 2016;7:1453.

- (193) Allain T, Chaouch S, Thomas M, Travers M, Valle I, Langella P, et al. Bile salt hydrolase activities: A novel target to screen anti-*Giardia* Lactobacilli? *Frontiers in Microbiology* 2018;9:89.
- (194) Zhou Y, Zhao N, Yang Y, Li Y, Zhang X, Chen J, et al. Molecular identification and subtype analysis of *Blastocystis* in captive Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*) in China's Heilongjiang and Fujian Provinces. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022:1276.
- (195) Stensvold CR, Clark CG. Pre-empting Pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in Parasitology* 2020;36(3):229-232.
- (196) Popruk S, Adao DEV, Rivera WL. Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: a review. *Infection, Genetics and Evolution* 2021;95:105085.
- (197) Hublin JS, Maloney JG, Santin M. *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science* 2021;135:260-282.
- (198) Abarca N, Santín M, Ortega S, Maloney JG, George NS, Molokin A, et al. Molecular detection and characterization of *Blastocystis* sp. and *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Northern Spain. *Veterinary Sciences* 2021;8(9):191.
- (199) Muadica AS, Köster PC, Dashti A, Bailo B, Hernández-de-Mingo M, Reh L, et al. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms* 2020;8(4):466.
- (200) Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* sp. *Clinical Microbiology Reviews* 2008;21(4):639-665.
- (201) El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC infectious diseases* 2014 Mar 25;14(1):164.
- (202) Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Chapter One - Recent Developments in *Blastocystis* Research. *Advances in Parasitology* 2013,1-32.
- (203) Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Vos d, W.M, O'Toole PW, et al. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbial Ecology* 2014;90(1):326-330.
- (204) Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitology Research* 2011;109(2):321-327.

- (205) Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research* 2005;97(5):386-389.
- (206) Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infection and Immunity* 2006;74(7):4114.
- (207) Long H, Handschack A, König W, Ambrosch A. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research* 2001;87(12):1029-1030.
- (208) Lim MX, Png CW, Tay CYB, Teo JDW, Jiao H, Lehming N, et al. Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infection and Immunology* 2014;82(11):4789-4801.
- (209) Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* sp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens* 2012;8(3):e1002545.
- (210) Mirza H, Wu Z, Teo JD, Tan KS. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cellular Microbiology* 2012;14(9):1474-1484.
- (211) Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, MacAry PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* sp. *Current Infectious Disease Reports* 2010;12(1):28-35.
- (212) Audebert C, Even G, Cian A, Loywick A, Merlin S, Viscogliosi E, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports* 2016;6(1):25255.
- (213) Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiology Ecology* 2015;91(7):1-9.
- (214) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013 Jan 1;500, 541–546:541-6.
- (215) Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Cacciò SM, Segata N. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *The ISME Journal* 2017;11(12):2848-2863.
- (216) Scanlan, Pauline D., Stensvold, Christen R. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology* 2013;29(11):523-529.

- (217) Garcia LS. *Dientamoeba fragilis*, one of the neglected intestinal protozoa. *Journal of Clinical Microbiology* 2016 Sep;54(9):2243-2250.
- (218) Formenti F, Valerio M, Guerriero M, Perandin F, Pajola B, Mistretta M, et al. Molecular biology can change the classic laboratory approach for intestinal protozoan infections. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:2191.
- (219) Clark CG, Röser D, Stensvold CR. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: pinworm or cysts? *Trends in Parasitology* 2014;30(3):136-140.
- (220) Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, et al. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitology Research* 2010;107(3):679-684.
- (221) Röser D, Nejsum P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Experimental Parasitology* 2013;133(1):57-61.
- (222) Chabé M, Lokmer A, Ségurel L. Gut Protozoa: friends or foes of the human gut microbiota? *Trends in Parasitology* 2017;33(12):925-934.
- (223) Moya-Camarena SY, Sotelo N, Valencia ME. Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;66(3):255-259.
- (224) Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal of Parasitology* 2001;31(8):822-826.
- (225) Bär A, Phukan N, Pinheiro J, Simoes-Barbosa A. the interplay of host microbiota and parasitic protozoans at mucosal interfaces: implications for the outcomes of infections and diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015 Dec;9(12):e0004176.
- (226) Burgess SL, Gilchrist CA, Lynn TC, Petri Jr WA. Parasitic protozoa and interactions with the host intestinal microbiota. *Infection and Immunology* 2017;85(8):101.
- (227) Knoll EW, Howell KM. Studies on *Dientamoeba fragilis*: its incidence and possible pathogenicity. *American Journal of Clinical Pathology* 1945;15(5):178-183.
- (228) Barratt JLN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes* 2011 Jan 1;2(1):3-12.

- (229) Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Ruiz MY, Clavel A. Vitamin B12 and folic acid in children with intestinal parasitic infection. *Journal of the American College of Nutrition* 2002;21(2):109-113.
- (230) Zarebavani M, Dargahi D, Einollahi N, Dashti N, Mohebbali M, Rezaeian M. Serum levels of zinc, copper, vitamin B12, folate and immunoglobulins in individuals with giardiasis. *Iranian Journal of Public Health* 2012;41(12):47.
- (231) Karakas Z, Demirel N, Tarakcioglu M, Mete N. Serum zinc and copper levels in southeastern Turkish children with giardiasis or amebiasis. *Biological Trace Element Research* 2001;84(1):11-18.
- (232) Kilic E, Yazar S, Saraymen R. Serum zinc and magnesium levels in patients with blastocystosis. *Biological Trace Element Research* 2004;98(1):21-26.
- (233) Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1999;18(6):436-439.
- (234) Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, et al. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology Research* 2012;110(3):1269-1275.
- (235) Surangsriat S, Thamrongwittawatpong L, Piyaniran W, Naaglor T, Khoprasert C, Taamasri P, et al. Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet Thangphaet* 2010;93:119.
- (236) Tungtrongchitr A, Manatsathit S, Kositchaiwat C, Ongrotchanakun J, Munkong N, Chinabutr P, et al. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2004;35:705-710.
- (237) Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO. Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. *BMC Gastroenterology* 2012;12(1):1-6.
- (238) Krogsgaard LR, Andersen L, Johannesen TB, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, et al. Characteristics of the bacterial microbiome in association with common intestinal parasites in irritable bowel syndrome. *Clinical and Translational Gastroenterology* 2018;9(6).
- (239) Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Jimenez JC, Rojas R, Gil M, et al. Association between giardiasis and allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 1998;81(3):261-265.

- (240) Trelis M, Taroncher-Ferrer S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Osuna A, et al. *Giardia intestinalis* and fructose malabsorption: a frequent association. *Nutrients* 2019;11(12):2973.
- (241) Abdallah DSA, Denkers EY. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Frontiers in Immunology* 2012;3:382.
- (242) Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunology* 2000;68(1):170-175.
- (243) Liu Z, Yadav PK, Su J, Wang J, Fei KE. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2009;15(46):5784.
- (244) Faubert G. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000 Jan 1;13(1):35-54.
- (245) Partida-Rodríguez O, Serrano-Vázquez A, Nieves-Ramírez ME, Moran P, Rojas L, Portillo T, et al. Human Intestinal Microbiota: Interaction Between Parasites and the Host Immune Response. *Archives of Medical Research* 2017 Nov;48(8):690-700.
- (246) Sullivan PB, Neale G, Cevallos AM, Farthing M. Evaluation of specific serum anti-Giardia IgM antibody response in diagnosis of giardiasis in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1991;85(6):748-749.
- (247) Zinneman HH, Kaplan AP. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *American Journal of Digestive Diseases* 1972;17(9):793-797.
- (248) Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2009;47(1):93-97.
- (249) Perez O, Lastre M, Bandera F, Díaz M, Domenech I, Fagundo R, et al. Evaluation of the immune response in symptomatic and asymptomatic human giardiasis. *Archives of Medical Research* 1994;25(2):171-177.
- (250) Li E, Zhou P, Petrin Z, Singer SM. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunology* 2004;72(11):6642-6649.
- (251) Santos JId, Vituri CdL. Some hematimetric findings in human *Giardia lamblia* infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1996;38(2):91-95.
- (252) Melo-Reis PRd, Diniz-Filho JAF, Dias-Penna KGB, Costa SHN, Mesquita MMd, Silva Jbd, et al. Correlação entre eosinofilia e protozoose

por *Giardia lamblia* em crianças. Revista brasileira de análises clínicas 2007;237-239.

(253) Gray TJ, Kwan YL, Phan T, Robertson G, Cheong EY, Gottlieb T. *Dientamoeba fragilis*: a family cluster of disease associated with marked peripheral eosinophilia. Clinical Infectious Diseases 2013;57(6):845-848.

(254) Jiménez JC, Fontaine J, Grzych J, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. Clinical and Vaccine Immunology 2004;11(1):152-160.

(255) Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. Trends in Parasitology 2018-02-10;18(6):272.

(256) Demirci M, Delibas N, Altuntas I, Oktem F, Yönden Z. Serum iron, zinc and copper levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis. Journal of Health, Population and Nutrition 2003:72-75.

(257) Van Assche T, Deschacht M, da Luz, Raquel A Inocêncio, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. Free Radical Biology and Medicine 2011;51(2):337-351.

(258) Al-Azzaay A. Evaluation of erythrocyte malondialdehyde, glutathione concentration and serum nitric oxide levels in patients with *Toxoplasma gondii*. Ibn AL-Haitham journal for pure and applied science 2016;24(1).

(259) Clark IA, Chaudhri G, Cowden WB. Some roles of free radicals in malaria. Free Radical Biology and Medicine 1989;6(3):315-321.

(260) Bosch SS, Kronenberger T, Meissner KA, Zimbres FM, Stegehake D, Izui NM, et al. Oxidative stress control by apicomplexan parasites. BioMed Research International 2015;2015.

(261) Kilic E, Yazar S, Saraymen R, Ozbilge H. Serum malondialdehyde level in patients infected with *Ascaris lumbricoides*. World Journal of Gastroenterology 2003;9(10):2332.

(262) Cotton J, Amat C, Buret A. Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the gastrointestinal Tract. Pathogens (Basel) 2015;4(4):764-792.

(263) Cifre S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Merino JF, Trelis M. *Blastocystis* subtypes and their association with irritable bowel syndrome. Medical Hypotheses 2018;116:4-9.

(264) Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. PloS one 2014;9(11):e111868.

- (265) Piche T, Barbara G, Aubert P, Des Varannes SB, Dainese R, Nano J, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009;58(2):196-201.
- (266) Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, et al. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;122(7):1778-1783.
- (267) Owen JB, Butterfield DA. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. Protein misfolding and cellular stress in disease and aging: Springer; 2010. p. 269-277.
- (268) Tsikas D, Gutzki F, Stichtenoth DO. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2006;62(1):51-59.
- (269) Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1999;1411(2-3):217-230.
- (270) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 2017;114(12):1752-1761.
- (271) Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clinic Proceedings: Elsevier*; 2007.
- (272) Vasilakopoulou A, Le Roux CW. Could a virus contribute to weight gain? *International Journal of Obesity* 2007;31(9):1350-1356.
- (273) Van Ginneken V, Sitnyakowsky L, Jeffery JE. "Infectobesity: viral infections (especially with human adenovirus-36: Ad-36) may be a cause of obesity. *Medical Hypotheses* 2009;72(4):383-388.
- (274) Salem DA, Salem NA, Hendawy SR. Association between *Toxoplasma gondii* infection and metabolic syndrome in obese adolescents: a possible immune-metabolic link. *Parasitology International* 2021;83:102343.
- (275) Van Best N, Hornef MW, Savelkoul PH, Penders J. On the origin of species: factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2015;105(4):240-251.
- (276) Dieterich W, Schink M, Zopf Y. Microbiota in the gastrointestinal tract. *Medical Sciences* 2018;6(4):116.
- (277) Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, et al. The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology* 2014;146(6):1470-1476.

- (278) Stensvold CR, van der Giezen M. Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in Parasitology* 2018 May;34(5):369-377.
- (279) Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JL. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005;102(31):11070-11075.
- (280) Turnbaugh PJ, Hamady M, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature (London)* 2009;457(7228):480-484.
- (281) Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012;148(6):1258-1270.
- (282) Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: gut microbiota, the neglected endocrine organ. *Molecular endocrinology* 2014;28(8):1221-1238.
- (283) Yatsunenko T, Rey FE, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature (London)* 2012;486(7402):222-227.
- (284) Heiss CN, Olofsson LE. Gut microbiota-dependent modulation of energy metabolism. *Journal of Innate Immunity* 2018;10(3):163-171.
- (285) Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC immunology* 2017;18(1):1-25.
- (286) Ratajczak W, Ryl A, Mizerski A, Walczakiewicz K, Sipak O, Laszczyńska M. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochimica Polonica* 2019;66(1):1-12.
- (287) Cheng H, Guan X, Chen D, Ma W. The Th17/Treg cell balance: a gut microbiota-modulated story. *Microorganisms* 2019;7(12):583.
- (288) Ivanov II, de Llanos Frutos R, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe* 2008;4(4):337-349.
- (289) Sanz Y, Moya-Pérez A. Microbiota, inflammation and obesity. *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease* 2014:291-317.
- (290) Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012;148(5):852-871.

- (291) Caesar R, Fåk F, Bäckhed F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *Journal of Internal Medicine* 2010;268(4):320-328.
- (292) Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host & microbe* 2012;12(5):611-622.
- (293) Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101(44):15718-15723.
- (294) Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104(3):979-984.
- (295) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444(7122):1027-1031.
- (296) Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 2013 Sep 6;;341(6150).
- (297) Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'sullivan O, Fouhy F, et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* 2010;59(12):1635-1642.
- (298) Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe* 2008;3(4):213-223.
- (299) Patil DP, Dhotre DP, Chavan SG, Sultan A, Jain DS, Lanjekar VB, et al. Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals. *Journal of Biosciences* 2012;37(4):647-657.
- (300) Ferrer M, Ruiz A, Lanza F, Haange S, Oberbach A, Till H, et al. Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure. *Environmental Microbiology* 2013;15(1):211-226.
- (301) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(43):16731-16736.

- (302) Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters* 2009;294(1):1-8.
- (303) Van Kalleveen MW, Budding AE, Benninga MA, Savelkoul PH, van Gool T, van Maldeghem I, et al. Intestinal microbiota in children with symptomatic *Dientamoeba fragilis* infection: a case-control study. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 2020.
- (304) Hidalgo L, Salvador F, Sulleiro E, López I, Balladares M, García E, et al. Evaluation of risk factors associated to detection of *Blastocystis* sp. in fecal samples in population from Barcelona, Spain: a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2019;38(7):1241-1247.
- (305) Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1997;32(9):920-924.
- (306) Handelsman Y, Bloomgarden ZT, Grunberger G, Umpierrez G, Zimmerman RS, Bailey TS, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology-Clinical Practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan-2015. *Endocrine Practice* 2015;21(Supplement 1):1-87.
- (307) Martínez-González MA, García-Arellano A, Toledo E, Salas-Salvadó J, Buil-Cosiales P, Corella D, et al. A 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool and Obesity Indexes among High-Risk Subjects: The PREDIMED Trial. *PLoS one* 2012;7(8):e43134.
- (308) Ortega RM, López-Sobaler AM, Andrés P, Requejo AM, Aparicio A, Molinero LM. DIAL software for assessing diets and food calculations (for Windows, version 3.0.0.5). <http://www.alceingenieria.net/nutricion.htm> 2013.
- (309) Lupton JR, Brooks J, Butte NF, Caballero B, Flatt JP, Fried SK. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. National Academy Press: Washington, DC, USA 2002;5:589-768.
- (310) Ness-Abramof R, Apovian CM. Waist circumference measurement in clinical practice. *Nutrition in Clinical Practice* 2008;23(4):397-404.
- (311) Faria S, Faria O, Cardeal M, Ito M. Validation study of multi-frequency bioelectrical impedance with dual-energy X-ray absorptiometry among obese patients. *Obesity Surgery* 2014 Sep;24(9):1476-1480.
- (312) Gomez-Arbelaiz D, Bellido D, Castro AI, Ordoñez-Mayan L, Carreira J, Galban C, et al. Body composition changes after very-low-calorie ketogenic diet in obesity evaluated by 3 standardized methods. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2017 Feb;102(2):488-498.

- (313) Loeza-del-Castillo A, Paz-Pineda F, Oviedo-Cárdenas E, Sánchez-Avila F, Vargas-Vorácková F. AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis. *Annals of Hepatology* 2008;7(4):350-357.
- (314) Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007;45(4):846-854.
- (315) Papagianni M, Sofogianni A, Tziomalos K. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology* 2015 Apr 8;7(4):638-648.
- (316) Ampuero J, Aller R, Gallego-Durán R, Banales J, Crespo J, Vilar-Gomez E, et al. Hepamet Score: a new non-invasive method for NAFLD-related fibrosis screening in clinical practice. *Journal of Hepatology* 2018;68:S97-S98.
- (317) Autier B, Gangneux J, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ Gastrointestinal Panel—Parasite Assay for Protozoa Detection in Stool Samples: A Retrospective and Prospective Study. *Microorganisms* 2020;8(4):569.
- (318) Kim B, Kim HS, Kim JJ, Park YJ, Kim D, Yong D. Detection of Intestinal Protozoa in Korean Patients Using BD MAX Enteric Parasite Panel and Seegene Allplex Gastrointestinal Parasite Assay. *Laboratory Medicine Online* 2020;10(3):221-226.
- (319) Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research* 2013 Jan 07;41(1):e1.
- (320) Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2011;27(6):863-864.
- (321) Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 Jul;13(7):581-583.
- (322) Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 2013 Jan;41(Database issue):D590-D596.
- (323) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 2010;7(5):335-336.
- (324) Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a

dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016;65(3):426-436.

(325) Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, et al. *Roseburia* spp.: a marker of health? *Future Microbiology* 2017;12(2):157-170.

(326) Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2011;149(1):88-105.

(327) Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira D, Rosado EL, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *International Journal of Obesity* 2017;41(11):1607-1614.

(328) Ley RE. *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology* 2016;13(2):69-70.

(329) Christensen L, Roager HM, Astrup A, Hjorth MF. Microbial enterotypes in personalized nutrition and obesity management. *American Journal of Clinical Nutrition* 2018;108(4):645-651.

(330) Lepczyńska M, Chen W, Dzika E. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* sp.? *International Journal of Dermatology* 2016;55(3):259-266.

(331) Hasan S, Maachee M, Córdova OM, de la Guardia, R Díaz, Martins M, Osuna A. Human secretory immune response to fatty acid-binding protein fraction from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunology* 2002;70(4):2226-2229.

(332) Rosales-Borjas DM, Díaz-Rivadeneira J, Doña-Leyva A, Zambrano-Villa SA, Mascaró C, Osuna A, et al. Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infection and Immunology* 1998;66(2):756-759.

(333) Bell RG. IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunology and Cell Biology* 1996;74(4):337-345.

(334) Carretero A, León Z, García-Cañaveras JC, Zaragoza Á, Gómez-Lechón MJ, Donato MT, et al. In vitro/in vivo screening of oxidative homeostasis and damage to DNA, protein, and lipids using UPLC/MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014;406(22):5465-5476.

(335) Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.

(336) Ascaso JF, Real JT, Priego A, Carmena R, Romero P, Valdecabres C. Cuantificación de insulinoresistencia con los valores de insulina basal e índice

HOMA en una población no diabética. *Medicina Clínica* 2001;117(14):530-533.

(337) Hamdy DA, Abd El Wahab, Wegdan Mohamed, Senosy SA, Mabrouk AG. *Blastocystis* sp. and *Giardia intestinalis* co-infection profile in children suffering from acute diarrhea. *Journal of Parasitic Diseases* 2020;44(1):88-98.

(338) Krogsgaard, LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen, HV, Bytzer, P. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2015;13(3):507-513.e2.

(339) Dullaert-de Boer M, Schuurs TA, Vermeer M, Ruijs GJ, van der Zanden, Adri GM, Weel JF, et al. Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* species in gastroenteritis: results from a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2020;39(1):197-203.

(340) Trelis M, Sáez-Durán S, Puchades P, Castro N, Miquel A, Gozalbo M, et al. Survey of the occurrence of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in green leafy vegetables marketed in the city of Valencia (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 2022;379:109847.

(341) Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, Crouzet L, Del'homme C, Marquet P, et al. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2012 -02-08;35(7):828.

(342) Duboc H, Rainteau D, Rajca S, Humbert L, Farabos D, Maubert M, et al. Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility* 2012;24(6):513-e247.

(343) Rajlić-Stojanović M, Biagi E, Heilig, Hans G. H. J, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology (New York, N.Y. 1943)* 2011;141(5):1792-1801.

(344) Krogus-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, Aarnikunnas J, Tuimala J, Paulin L, et al. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC gastroenterology* 2009 Dec 17;9(1):95.

(345) Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, Matamoros S, Ramírez S, Delzenne NM, et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and

metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports* 2015 -11-13;5(1).

(346) Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Official Journal of the American College of Gastroenterology* 2010;105(11):2420-2428.

(347) Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflammatory Bowel Diseases* 2013;19(3):481-488.

(348) Kyle UG, Schutz Y, Dupertuis YM, Pichard C. Body composition interpretation: contributions of the fat-free mass index and the body fat mass index. *Nutrition* 2003;19(7-8):597-604.

(349) Cordingley FT, Crawford G. *Giardia* infection causes vitamin B12 deficiency. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 1986;16(1):78-79.

(350) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412-419.

(351) Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, González A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 2011;332(6032):970-974.

(352) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107(33):14691-14696.

(353) Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED, Gonzalez CG, Lichtman JS, Reid G, et al. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science* 2017;357(6353):802-806.

(354) Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal* 2011;5(2):220-230.

(355) Johnson AJ, Vangay P, Al-Ghalith GA, Hillmann BM, Ward TL, Shields-Cutler RR, et al. Daily sampling reveals personalized diet-microbiome associations in humans. *Cell host & microbe* 2019;25(6):789-802. e5.

(356) David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505(7484):559-563.

- (357) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334(6052):105-108.
- (358) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473(7346):174-180.
- (359) Costea PI, Hildebrand F, Manimozhayan A, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology* 2017;3(1):8-16.
- (360) Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82(3):694-699.
- (361) Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *Journal of Nutrition* 2005;135(5):969-972.
- (362) Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Sia CL, Viswanathan P, Mohanty P, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor- κ B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92(11):4476-4479.
- (363) Leonarduzzi G, Sevanian A, Sottero B, Arkan MC, Biasi F, Chiarotto E, et al. Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF- β 1 by oxysterols: a mechanistic link between cholesterol and atherosclerosis. *The FASEB Journal* 2001;15(9):1619-1621.
- (364) Wang Y, Yang M, Lee S, Davis CG, Koo SI, Chun OK. Dietary total antioxidant capacity is associated with diet and plasma antioxidant status in healthy young adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2012;112(10):1626-1635.
- (365) Hermsdorff HHM, Puchau B, Volp ACP, Barbosa KB, Bressan J, Zulet M, et al. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. *Nutrition & Metabolism* 2011;8(1):1-8.
- (366) Puchau B, Zulet MA, de Echávarri AG, Hermsdorff HHM, Martínez JA. Dietary total antioxidant capacity: a novel indicator of diet quality in healthy young adults. *Journal of the American College of Nutrition* 2009;28(6):648-656.
- (367) Kodio A, Menu E, Ranque S. Eukaryotic and prokaryotic microbiota interactions. *Microorganisms* 2020;8(12):2018.

- (368) Mejia R, Damania A, Jeun R, Bryan PE, Vargas P, Juarez M, et al. Impact of intestinal parasites on microbiota and cobalamin gene sequences: a pilot study. *Parasites & Vectors* 2020 Apr 19;13(1):200.
- (369) Barash NR, Maloney JG, Singer SM, Dawson SC. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infection and Immunity* 2017 Jun 1;85(6).
- (370) Tzu-Ling Chen, Shin Chen, Hsiu-Wei Wu, Tsung-Chun Lee, Yen-Zhen Lu, Li-Ling Wu, et al. Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathogens* 2013 Jan 1;5(1):26.
- (371) Kodio A, Coulibaly D, Koné AK, Konaté S, Doumbo S, Guindo A, et al. *Blastocystis* colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy malian children. *Microorganisms* 2019 -12-04;7(12).
- (372) Forsell J, Bengtsson-Palme J, Angelin M, Johansson A, Evengård B, Granlund M. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiology* 2017 -12;17(1).
- (373) Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20(43):16079.
- (374) Calderón de la Barca, Ana M, Castillo-Fimbres RS, Mejía-León ME, Quihui-Cota L, Ochoa-Leyva A, Aguayo-Patrón SV. Enteric parasitic infection disturbs bacterial structure in Mexican children with autoantibodies for type 1 diabetes and/or celiac disease. *Gut Pathogens* 2020;12(1):1-9.
- (375) Andersen L, Karim AB, Roager HM, Vignæs LK, Krogfelt KA, Licht TR, et al. Associations between common intestinal parasites and bacteria in humans as revealed by qPCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2016;35(9):1427-1431.
- (376) Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490(7418):55-60.
- (377) Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine* 2019;25(7):1096.
- (378) Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110(22):9066-9071.

- (379) Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 2014 -07-30;64(6).
- (380) Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2015 -06-22;65(3):426.
- (381) Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism* 2019;92:82-97.
- (382) Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, microbiota, obesity, and NAFLD: a dangerous quartet. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17(4):481.
- (383) Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2016;13(7):412-425.
- (384) Lau LH, Wong SH. Microbiota, obesity and NAFLD. *Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer* 2018:111-125.
- (385) Yuan L, Bambha K. Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology* 2015;7(28):2811.
- (386) Canfora EE, Meex RC, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nature Reviews in Endocrinology* 2019;15(5):261-273.
- (387) Chen J, Vitetta L. Gut microbiota metabolites in NAFLD pathogenesis and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(15):5214.
- (388) Jayakumar S, Loomba R. Review article: emerging role of the gut microbiome in the progression of nonalcoholic fatty liver disease and potential therapeutic implications. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2019;50(2):144-158.
- (389) Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2013 Jul;58(1):120-127.
- (390) Wong VW, Tse C, Lam TT, Wong GL, Chim AM, Chu WC, et al. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis—a longitudinal study. *PloS one* 2013;8(4):e62885.

- (391) Nistal E, Saenz de Miera, Luis E, Ballesteros Pomar M, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Álvarez-Cuenllas B, et al. An altered fecal microbiota profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with obesity. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2019.
- (392) Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. the severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 2016.
- (393) Berbudi A, Ajendra J, Wardani AP, Hoerauf A, Hübner MP. Parasitic helminths and their beneficial impact on type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2016;32(3):238-250.
- (394) Wiria AE, Djuardi Y, Supali, T, Sartono E, Yazdanbakhsh M. Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe? *Seminars in Immunopathology*: Springer 2012 (Vol. 34, No. 6, pp. 889-901).
- (395) Hussaarts L, García-Tardón N, van Beek L, Heemskerk MM, Haeberlein S, van der Zon, Gerard C, et al. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *The FASEB Journal* 2015;29(7):3027-3039.
- (396) Aravindhan V, Mohan V, Surendar J, Muralidhara Rao M, Pavankumar N, Deepa M, et al. Decreased prevalence of lymphatic filariasis among diabetic subjects associated with a diminished pro-inflammatory cytokine response (CURES 83). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010;4(6):e707.
- (397) Chen Y, Lu J, Huang Y, Wang T, Xu Y, Xu M, et al. Association of previous schistosome infection with diabetes and metabolic syndrome: a cross-sectional study in rural China. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;98(2):E283-E287.
- (398) Bhargava P, Li C, Stanya KJ, Jacobi D, Dai L, Liu S, et al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nature Medicine* 2012;18(11):1665-1672.
- (399) Contreras I, Estrada JA, Guak H, Martel C, Borjian A, Ralph B, et al. Impact of *Leishmania mexicana* infection on dendritic cell signaling and functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014;8(9):e3202.
- (400) Crowe J, Lumb FE, Harnett MM, Harnett W. Parasite excretory-secretory products and their effects on metabolic syndrome. *Parasite Immunology* 2017;39(5):e12410.

(401) Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14(5):10497-10538.

(402) Muadica ASO. Epidemiología molecular y factores de riesgo de protistas enteroparásitos asociados a diarrea en poblaciones pediátricas sintomáticas y asintomáticas en España y Mozambique. 2020.

Anexos

Anexo A. Producción científica de la doctoranda

A1. Artículos científicos publicados en revistas indexadas

A1.1 Presence and significance of intestinal unicellular parasites in a morbidly obese population.

- ✓ Autores: **J. Caudet**, M. Trelis, S. Cifre, J.M. Soriano, J.F. Merino-Torres.
- ✓ Revista de publicación: *International Journal of Obesity*.
- ✓ Fecha de publicación: 14 de octubre 2021.
- ✓ Doi: <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00980-6>.
- ✓ Impacto de la publicación atendiendo a las métricas de citación de la revista en 2021:
 - Factor de impacto de la revista: 5,551 (2 años previos), 5,686 (5 años previos)
 - Ranking JCR (Journal Citation Reports): 23° de 89 revistas de Nutrición y Dietética; 38° de 145 revistas de Endocrinología y Metabolismo. Se engloba dentro del Q1.
- ✓ **Abstract:** Background: Obesity is a chronic disease whose pathogenesis has been related to changes in the intestinal microbiota. Yet, the role of protozoa and other unicellular eukaryotic parasites in this microenvironment is still largely unknown. Their presence within the gut ecosystem in obese subjects warrants further study, as well as their influence on the host metabolism and comorbidities. Methods: Herein, a single center, cross-sectional study of 104 obese individuals was performed to assess the presence of six intestinal unicellular parasites in stool using a commercially available kit, and to evaluate its relationship with the presence of abdominal symptoms, metabolic comorbidities, variations in body composition and nutritional deficiencies. Results: The overall parasitic colonization rate was 51%, with *Blastocystis* sp., identified as the most frequent (44.2%), followed by *Dientamoeba fragilis* (11.5%) and *Giardia intestinalis*

(8.7%), and significantly related to the consumption of ecological fruits and vegetables. Contrary to what previous studies pointed out, colonization with parasites species was significantly associated with fewer abdominal symptoms and depositions per day. The presence of parasites did not correlate with any nutritional deficiencies nor differences in body composition, while it did with significant lower HOMA-IR levels and a lower trend towards metabolic syndrome. Conclusion: Obese subjects frequently harbor unicellular enteric parasites, apparently without clinical nor nutritional harm. This evidence suggests that carrying these microorganisms, from an endocrinological perspective, has a beneficial effect, especially on insulin resistance and possibly on the development of related comorbidities.

A1.2 Interplay between Intestinal Bacterial Communities and Unicellular Parasites in a Morbidly Obese Population: a Neglected Trinomial.

- ✓ Autores: **J. Caudet**, M. Trelis, S. Cifre, J.M. Soriano, H. Rico, J.F. Merino-Torres.
- ✓ Revista de publicación: *Nutrients*.
- ✓ Fecha de publicación: 05 de agosto 2022.
- ✓ Doi: <https://doi.org/10.3390/nu14153211>.
- ✓ Impacto de la publicación atendiendo a las métricas de citación de la revista en 2022:
 - Factor de impacto de la revista: 6,706 (2021), 7,185 (5 años previos)
 - Ranking JCR (Journal Citation Reports): Q1 en Nutrición y Dietética.
- ✓ **Abstract:** Obesity is an epidemic causing a metabolic health crisis. Herein, the interactions between the gut prokaryotic and eukaryotic communities, metabolic comorbidities and diet were studied. Stool samples from 56 subjects, 47 with type III obesity and 9 with type II obesity and cardiovascular risk or metabolic disease, were assessed for the richness, diversity and ecology of the bacterial gut community through metagenomics, together with the study of the presence of common unicellular eukaryote parasites (*Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis* and *Giardia intestinalis*) by qPCR. Clinical information regarding metabolic comorbidities and non-alcoholic hepatic fatty liver disease was gathered. To assess the quality of the patients' diet, each participant filled in three dietary questionnaires. The most prevalent parasite *Blastocystis* sp. (46.4%), together with *D. fragilis* (8.9%), was found to be associated with higher mean diversity indexes regarding non-colonized subjects; the opposite of that which was observed in those with *G. intestinalis* (16.1%). In terms of phyla relative abundance, with *Blastocystis* sp. and *D. fragilis*, very slight differences were observed; on the contrary, *G. intestinalis* was related to an increase in Bacteroidetes and Proteobacteria, and a decrease in Firmicutes

and Actinobacteria, presenting the lowest Firmicutes/Bacteroidetes ratio. At genus level, *Blastocystis* sp. and/or *D. fragilis* was accompanied with an increase in *Lactobacillus* spp., and a decrease in *Akkermansia* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Escherichia* spp., while *G. intestinalis* was associated with an increase in *Bacteroides* spp., and a decrease in *Faecalibacterium* spp., *Prevotella* spp. and *Lactobacillus* spp., and the highest *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. ratio. Participants with non-alcoholic hepatic fatty liver presented a higher Firmicutes/Bacteroidetes ratio, and those with type 2 diabetes displayed a significantly lower *Faecalibacterium* spp./*Escherichia* spp. ratio, due to an overrepresentation of the genus *Escherichia* spp. The presence of parasites was associated with variations in the richness, diversity and distribution of taxa in bacterial communities, confirming a gain in diversity associated with *Blastocystis* sp. and providing different functioning of the microbiota with a potential positive effect on comorbidities such as type 2 diabetes, insulin resistance and metabolic syndrome. Future basic and clinical studies should assess the beneficial or pathogenic effect of these eukaryotes on obese subjects and focus on deciphering whether they may imply a healthier metabolic profile.

A1.3 Do intestinal unicellular parasites have a role in the inflammatory and redox status among the severely obese?

- ✓ Autores: **J. Caudet**, M. Trelis, S. Cifre, G. Tapia, J.M. Soriano, R. Rodrigo, J.F. Merino-Torres.
- ✓ Revista de publicación: en revisión en *Antioxidants*.
- ✓ Impacto de la publicación atendiendo a las métricas de citación de la revista en 2021:
 - Factor de impacto de la revista: 7,675 (2021), 7,886 (5 años previos).
 - Ranking JCR (Journal Citation Reports): Q1 en Bioquímica y Biología Molecular.

- ✓ **Abstract:** The diagnosis of obesity comprises subjects with totally different phenotypes and metabolic profiles. Systemic inflammation and oxidative stress derived from the white adipose tissue are suggested as the link between this disease and the development of insulin-resistance and metabolic comorbidities. Unicellular eukaryotic parasites colonizing the human gut ecosystem is a common circumstance, and yet their influence on the inflammatory and redox status of the obese host has not been assessed. Herein, a set of inflammation and redox biomarkers were assessed together with parasitological analysis on 97 severely obese subjects. Information was also collected on insulin resistance and on the antioxidant composition of diet. The global prevalence of intestinal unicellular parasites was 49.5%, being *Blastocystis* sp. the most prevalent protozoan found (42.3%). Colonized subjects displayed a higher total antioxidant capacity and a trend towards higher extracellular superoxide dismutase activity, regardless of the insulin-resistance status, along with lower reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratios in plasma in the insulin-resistant subgroup. No changes in malondialdehyde levels, nor in inflammatory cytokines in plasma were found in regards of the colonization status. In conclusion, enteric eukaryotic unicellular parasites may play an important role in modulating the antioxidant

defenses of an obese host, thus could have beneficial effects with respect to the development of systemic metabolic disorders.

A2. Otras publicaciones

Publicaciones a Congresos Nacionales como primera firmante:

- ❖ Congreso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad, marzo 2019: “**Frecuencia y diversidad de *Blastocystis* sp. en población española con y sin obesidad**”
- ❖ 60º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, octubre 2019: “**Estudio piloto sobre parasitación por protozoos en población de obesos mórbidos**”
- ❖ XXXII Congreso de la Sociedad Española de Diabetes, junio 2021: “**Valores de leptina y biomarcadores de inflamación en relación al uso de ISGLT2 en obesos mórbidos**”
- ❖ 62º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, octubre 2021: “**Parámetros endocrino-metabólicos al año de la cirugía bariátrica en función de la presencia de parasitación intestinal por eucariotas unicelulares**”

Publicaciones a Congresos Internacionales como primera firmante:

- ❖ 22º Congreso de la Sociedad Europea de Endocrinología, mayo 2020: “**Relationship between *Blastocystis* sp. parasitization and metabolic syndrome in an obese Spanish population**”
- ❖ 24º Congreso de la Sociedad Europea de Endocrinología, mayo 2022: “**Gut microbiota genera regarding carbohydrate metabolism status and GLP-1 treatment**”

A3. Enlace a las páginas web de las publicaciones en revistas indexadas

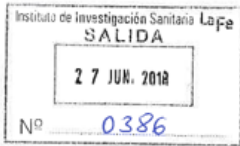
- ❖ Presence and significance of intestinal unicellular parasites in a morbidly obese population.

<https://doi.org/10.1038/s41366-021-00980-6>

- ❖ Interplay between Intestinal Bacterial Communities and Unicellular Parasites in a Morbidly Obese Population: a Neglected Trinomial.

<https://doi.org/10.3390/nu14153211>

Anexo B. Documentos de aprobación del comité ético del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe



Dr. Juan Francisco Merino Torres
Servicio de Endocrinología y
Nutrición

Valencia, 13 de junio de 2018.

Asunto: Autorización Inicio de estudio.

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente** sobre el Proyecto de Investigación titulado "Papel de la parasitación por Giardia intestinalis en la obesidad mórbida. (GIOB)", por usted presentado.

A la vista de los dictámenes emitidos, dicho Proyecto, puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



Dña. Mónica Almiñana Riqué



Dña. Rosaura Folch Marí

PD (Acuerdo Patronato 16 de mayo de 2018)

Valencia a 13 de junio de 2018.

El **Dr. Rafael Botella Estrada**, Presidente de la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación titulado: "Papel de la parasitación por Giardia intestinalis en la obesidad mórbida. (GIOB)" que presenta el/la Dr./Dra. Juan Francisco Merino Torres del Servicio / Unidad / Grupo Acreditado Endocrinología y Nutrición el Hospital U. i P. La Fe contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse positivamente en cuanto a su viabilidad.



Rafael Botella Estrada
Presidente de la Comisión de Investigación

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. María Tordera Baviera, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité, ha evaluado la propuesta del investigador principal, **Dr./ Dra. Juan Francisco Merino Torres**, relativa a la modificación sustancial con nº **MODIFICACIÓN SUSTANCIAL/ PROTOCOLO VERSIÓN 1.0 DE FECHA 15-05-2018**, correspondiente al proyecto de investigación con nº de registro **2017/0486**, titulado: **"PAPEL DE LA PARASITACIÓN POR GIARDIA INTESTINALIS EN LA OBESIDAD MÓRBIDA. (GIOB)."**, que se está llevando a cabo en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, por el/ la **Dr./ Dra. Juan Francisco Merino Torres**, del servicio de **ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN**, como Investigador Principal.

Y considera que:

El CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, en su reunión del 23 de mayo de 2018, tras la evaluación de la siguiente modificación sustancial:

Modificación sustancial: **MODIFICACIÓN SUSTANCIAL/ PROTOCOLO VERSIÓN 1.0 DE FECHA 15-05-2018**

Motivo de la modificación: En vez de aspirado, para los investigadores es mucho más sencillo tomar muestra de biopsia duodenal, así que se han hecho modificaciones en el protocolo y en la Hoja de Información al paciente.

Documentos modificados:

- **Protocolo, versión 1.0 de 15 de MAYO de 2018**
- **Hoja de información al paciente y Consentimiento informado, versión 2.0 de 15 de MAYO de 2018**

emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la modificación sustancial de la solicitud de autorización del estudio, de acuerdo con lo previsto en la legislación vigente.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 13 de mayo de 2018



Fdo.: Dra. María Tordera Baviera
Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos

LaFe
Departament
de Salut

FPNT-07-51-MEO (A)

ANEXO I COMPOSICIÓN CEIm

Presidente:

Dra. Adela Cañete Nieto (Oncología Pediátrica)

Vicepresidente:

Dr. Salvador Aliño Pellicer (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Secretaria Técnica:

Dra. María Tordera Baviera (Farmacéutica del Hospital)

Miembros:

Dr. Bonaventura Casanova Estruch (Neurología)

Dra. M^a Isabel Izquierdo Macián (Neonatología)

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz (Cardiología)

Dra. Paula Ramírez Gallego (Medicina Intensiva - Miembro de la Comisión de Investigación)

Dra. Sara Brugger Frigols (Radiodiagnóstico)

D. Serafín Rodríguez Capellán (Licenciado en derecho - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Dña. María Victoria Paricio Gómez (Enfermería)

Dr. José María Canelles Gamir (Farmacéutico de Atención Primaria)

Dr. Matteo Frasson (Cirugía General y Aparato Digestivo)

Dr. José Vicente Solanas Prats (Atención Primaria)

Dña. Pilar Robles Villalba (Vicepresidenta de la asociación de Miastenia - Miembro ajeno a las profesiones sanitarias)

Dr. Javier Lluna González (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial - Formación acreditada en Bioética)

D. Miguel Ángel Cano Torres (Secretario de ASLEUVAL - Miembro Lego - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Anexo C. Documento de información al paciente

Versión: n°4	Fecha de la versión: junio 2019
Investigadores Principales: Juan Francisco Merino Torres; María Trelis Villanueva	
CENTRO: Servicio de Endocrinología y Nutrición -IISLAFE	
Título del proyecto de investigación: “Estudio GIOB: parasitación intestinal en pacientes con obesidad mórbida” .	

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas. Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Estudio GIOB: parasitación intestinal en pacientes con obesidad mórbida”** que está siendo realizado por el Dr. Juan Francisco Merino Torres del Servicio de Endocrinología y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que se producen aproximadamente 250 millones de nuevos casos al año de giardiosis en el mundo, una infección producida por un parásito intestinal. La frecuencia de presentar esta infección de manera asintomática (sin provocar síntomas) en pacientes con obesidad es desconocida. Asimismo, la presencia de otro tipo de parásito intestinal (*Blastocystis* sp.) está descrita como la más frecuente en las heces del ser humano, y recientemente se la ha empezado a relacionar con implicaciones en el desarrollo de la obesidad. En el actual estudio nos interesa estudiar la presencia de estos y otros parásitos intestinales y si ésta puede relacionarse con el desarrollo tanto de obesidad como de otras enfermedades metabólicas.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio porque ha sido remitido/a (o es probable que se le remita en un futuro próximo) a la Unidad de Cirugía Endocrino-Metabólica para ser sometido/a a cirugía bariátrica como tratamiento de la obesidad. Esto nos ofrece una oportunidad excelente para realizar el estudio completo, aprovechando las pruebas que se le realicen para obtener muestras de heces, tejidos y sangre.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos sus muestras de sangre, heces, biopsias duodenales y de tejido adiposo blanco visceral.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

La toma de muestra de heces y orina no le ocasionará ningún daño ni riesgo para su salud. Los riesgos de la toma de biopsias duodenales son los propios de la endoscopia digestiva alta o gastroscopia: reacciones adversas al sedante y punción accidental del tracto gastrointestinal superior, pero la toma de tejido es indolora.

La toma de muestra de sangre puede ser incómoda y ocasionalmente puede provocar un pequeño hematoma. Es posible que se le vuelva a realizar otra extracción de sangre en el caso de que inicialmente no se hubiese obtenido suficiente muestra o que el material extraído a partir de esa muestra no fuese el adecuado.

Emplearemos la intervención quirúrgica para la toma de biopsias de tejido adiposo de tal modo que no suponga un riesgo adicional al propio de la cirugía.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor el origen de su enfermedad y mejorar el pronóstico y tratamiento de futuros pacientes. Si durante la duración del estudio se le detectara algún parásito intestinal del cual tengamos la certeza que puede resultar dañino para el hombre, se procederá a eliminarlo mediante los antibióticos correspondientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, la Dr. Juan Francisco Merino Torres, con la Dra. Rosa Cámara o con la Dra. Jana Caudet en el teléfono 961245554.

Asimismo, se ha habilitado una dirección de correo electrónico a la cual poder dirigir cualquier tipo de duda y para facilitar la comunicación con el equipo investigador y confirmar las citas en el hospital. El correo al que deberá dirigirse es: proyectoglob@gmail.com .

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le solicitará muestras que serán siempre utilizadas con fines científicos, pudiéndose emplear en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Con este fin, solicitamos su consentimiento para preservar muestras de sangre (3 tubos) en la seroteca de la Unidad Mixta de Investigación de Endocrinología, Nutrición Clínica y Dietética. Dichas muestras serán conservadas durante un periodo de tiempo de 3 años desde su recepción y podrían ser analizadas en el marco de futuros proyectos de investigación. Solicitamos también su consentimiento para analizar en un futuro las muestras de tejido adiposo (grasa) que se obtengan durante la cirugía bariátrica en búsqueda de metales pesados, en otra línea de investigación dentro de la Unidad Mixta.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

Anexo D. Documento de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: **Papel de la parasitación intestinal en la obesidad mórbida.**

Yo, _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____ (*nombre del Investigador*)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante	Firma del Investigador
Nombre: Fecha:	Nombre: Fecha:

Anexo E. Cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea

1. ¿Usas el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?	SI NO
2. ¿Cuánto aceite de oliva consumes en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)?	✓ 4 cucharadas o más ✓ 2-3,9 cucharadas ✓ 0-1,9 cucharadas
3. ¿Cuántas raciones de verdura y hortalizas consumes al día? <i>Las guarniciones o acompañamientos se consideran media ración.</i>	✓ 2 o más raciones ✓ 1-1,9 raciones ✓ 0-0,9 raciones
4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consumes al día?	✓ 3 o más raciones ✓ 1-2,9 raciones ✓ 0-0,9 raciones
5. ¿Cuántas raciones (100-150 g) de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consumes al día?	✓ 1 ración o más ✓ 0-0,9 raciones
6. ¿Cuántas raciones (12 g) de mantequilla, margarina o nata consumes al día?	✓ 1 ración o más ✓ 0-0,9 raciones
7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, <i>bitter</i>) consumes al día?	✓ 1 ración o más ✓ 0-0,9 raciones
8. ¿Cuánto vino consumes a la semana?	✓ 7 vasos o más ✓ 3-6,9 vasos ✓ 0-2,9 vasos
9. ¿Cuántas raciones de legumbres (150 g) consumes a la semana?	✓ 3 o más raciones ✓ 1-2,9 raciones ✓ 0-0,9 raciones
10. ¿Cuántas raciones de pescado (100-150 g) o de mariscos (200 g, 4-5 piezas) consumes a la semana?	✓ 3 o más raciones ✓ 1-2,9 raciones ✓ 0-0,9 raciones

11. ¿Cuántas veces consumes repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulce o pasteles a la semana?	<input checked="" type="checkbox"/> 2 raciones o más <input checked="" type="checkbox"/> 0-1,9 raciones
12. ¿Cuántas veces consumes frutos secos a la semana (<i>ración de 30 g</i>)?	<input checked="" type="checkbox"/> 3 o más raciones <input checked="" type="checkbox"/> 1-2,9 raciones <input checked="" type="checkbox"/> 0-0,9 raciones
13. ¿Consumes preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas?	SI NO
14. ¿Cuántas veces a la semana consumes los vegetales cocinados, la pasta, arroz y otros platos aderezados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?	<input checked="" type="checkbox"/> 3 o más raciones <input checked="" type="checkbox"/> 1-2,9 raciones <input checked="" type="checkbox"/> 0-0,9 raciones

Anexo F. Documento de registro dietético



REGISTRO DIETÉTICO

INSTRUCCIONES:

- Completar el registro durante **una semana**: 3 días entre semana (ej: lunes, martes y miércoles) y 2 días en fin de semana (sábado y domingo).
- Indicar **todo** lo que consume durante la semana de recogida de datos, tanto alimentos y bebidas como platos elaborados o precocinados.
- Indicar la **cantidad aproximada** de dichos alimentos (ej. 2 cucharones, 1 plato hondo, 1 taza, etc.), **cómo** se han cocinado (ej. cocción, fritura, horneado, etc.) e **ingredientes** utilizados.
- Indicar el **lugar**, la **hora** y con **quien** se realiza la ingesta.
- Indicar si los alimentos consumidos les producen **síntomas intestinales** (ej: dolor de estómago, hinchazón, gases, flatulencias, ruidos, diarrea y/o estreñimiento, etc.) u **otros síntomas** (urticarias o dermatitis, dolor de cabeza, etc.)



DÍA DE LA SEMANA:		
	PLATOS y ALIMENTOS	SINTOMATOLOGÍA y COMENTARIOS
DESAYUNO <i>HORA:</i> <i>LUGAR:</i>		
ALMUERZO <i>HORA:</i> <i>LUGAR:</i>		
COMIDA <i>HORA:</i> <i>LUGAR:</i>		
MERIENDA <i>HORA:</i> <i>LUGAR:</i>		
CENA <i>HORA:</i> <i>LUGAR:</i>		
RESOPÓN <i>HORA:</i> <i>LUGAR:</i>		

