



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

**ASOCIACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL CON EL DESARROLLO DE
LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN UN MODELO MURINO**

TESIS

PRESENTA

LN CARLOS ENRIQUE GÓMEZ MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

Director de tesis

Dra. Delia Vanessa López Guerrero

Comité Tutorial

Dr. Ramón Alberto Batista García

Dr. Juan José Acevedo Fernández

Dra. María Araceli Ortiz Rodríguez

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2020

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, por darme la oportunidad de trabajar con ella a lo largo de dos años, quien con su conocimiento, apoyo y paciencia me guio a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

También quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico con la beca 2018-000068-2NACF-04998, así mismo, agradecer al Instituto de Biotecnología de la UNAM, específicamente al bioterio a cargo de la Dra. Elizabeth Mata por apoyarme con las herramientas que fueron imprescindibles para lograr este objetivo; de igual manera quiero extender mis agradecimientos al Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, a cargo del laboratorio de inmunología viral de la facultad de medicina de la UAEM, así como al M. en C. Juan Carlos Villegas García, técnico académico del mismo laboratorio, por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Agradezco infinitamente a Karla García (Karlita) pues fue ella quien se encargó de instruirme con mucha paciencia en cada uno de los procesos metodológicos que tenía que realizar, además de enseñarme a trabajar en un laboratorio. Por si fuera poco, siempre estuvo ahí cuando tenía dudas e incluso cuando llegue a desesperarme, estoy seguro que sin tu ayuda y guía nada de esto hubiera sido posible. Espero que mientras tú me enseñabas tanto, yo haya sido capaz de dejar un poco de lo que sé en ti.

Es importante para mi agradecer a Zulema Bueno, una excelente amiga, compañera, colega y un maravilloso ser humano, quien llevo al laboratorio con la intención de que yo pudiera enseñarle algo, y sin saberlo, vino a hacerme muy feliz y a enseñarme lo que es un amigo de verdad. Espero que lo poquito que pude enseñarte haya sido suficiente para que logres muchas metas más. Debes saber que sin ti a mi lado todo este último año hubiera sido muy complicado para mí, gracias por acompañarme.

Finalmente quiero agradecer a mi mamá y papá que nunca dudaron de mi capacidad de afrontar este reto y culminarlo. A mi esposo Alejandro Trejo, por escucharme y darme ánimo cuando me sentía decepcionado de mí mismo, y a mis amigos que siempre estuvieron ahí para apoyarme, y hacerme saber que yo podía realizar este proyecto.

Resumen

Existe evidencia que relaciona la microbiota intestinal con el desarrollo y mantenimiento de DM2, encontrando disbiosis en las poblaciones bacterianas de estos individuos. Recuperar la eubiosis podría ayudar a mejorar el tratamiento de esta enfermedad, siendo la transferencia de microbiota fecal una alternativa al manejo y tratamiento de esta afección. Por ello, es importante evaluar estas intervenciones en modelos animales, previo a su implementación en humanos. En este proyecto decidimos determinar si la transferencia de microbiota disbiótica participa en el desarrollo de DM2 y evaluar si la transferencia de microbiota eubiótica puede revertir sus efectos en ratones diabetizados. Para ello, utilizamos ratones machos de la cepa CD1 sanos para la transferencia de microbiota de ratón diabetizado, y ratones diabetizados con estreptozotocina, para la transferencia de microbiota de ratón sano. Se evaluó glucosa sérica, consumo de alimento, y peso, antes y después de las transferencias. Se determinó significancia estadística con un valor de $p < 0.05$ utilizando la prueba t de Student. Primeramente, se evaluó la transferencia de microbiota de ratón diabetizado en ratones sanos y se observó que las concentraciones de glucosa aumentaron con respecto a las basales, igualmente en las CTOG. Respecto al peso no se observó ninguna diferencia entre las intervenciones, no siendo así en el consumo de alimento, ya que mostraron una ingesta mayor, aunque no estadísticamente significativa. Posteriormente se evaluó la transferencia de microbiota sana en ratones diabetizados, aquí se observó que los ratones disminuyeron las concentraciones de glucosa después de la intervención, igualmente en las CTOG. Respecto al peso y el consumo de alimento no se observó diferencia entre intervenciones. Concluimos que la transferencia de microbiota fecal altera el metabolismo de la glucosa tanto en ratones sanos como diabetizados, y no contribuye significativamente en el consumo de alimento ni en la ganancia de peso.

Abstract

There is evidence that relates the intestinal microbiota with the development and maintenance of DM2, finding dysbiosis in the bacterial populations of these individuals. Recovering eubiosis could help improve the treatment of this disease, with the transfer of fecal microbiota being an alternative to the management and treatment of this condition. Therefore, it is important to evaluate these interventions in animal models, prior to their implementation in humans. In this project, we decided to determine if the transfer of the dysbiotic microbiota participates in the development of DM2 and to evaluate whether the transfer of the eubiotic microbiota can reverse its effects in diabetic mice. For this, we used healthy CD1 male mice for the transfer of diabetic mouse microbiota, and streptozotocin-diabetic mice for the transfer of healthy mouse microbiota. Serum glucose, food intake, and weight were evaluated before and after the transfers. Statistical significance was determined with a value of $p < 0.05$ using the Student's t test. First, the transfer of the diabetic mouse microbiota was evaluated in healthy mice and the glucose concentrations increased with respect to the basal ones were applied, also in the CTOG. Regarding weight, no difference is applied between the interventions, not being the case for food consumption, since a higher intake has been made, although not statistically significant. Subsequently, the transfer of healthy microbiota in diabetic mice was evaluated, here it is made that the mice decreased the glucose concentrations after the intervention, also in the CTOG. Regarding weight and food consumption, they did not differentiate between interventions. We conclude that the transfer of fecal microbiota alters glucose metabolism in both healthy and diabetic mice, and does not contribute significantly to food consumption or weight gain.

Índice	
Índice de figuras.....	VI
Índice de gráficas.....	VII
Lista de siglas, símbolos y abreviaturas	IX
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Microbiota	1
1.1.1 Composición de la microbiota intestinal	4
1.2 Microbiota en el ratón	5
1.3 Funciones de la microbiota	7
1.4 Microbiota en enfermedades metabólicas.....	10
1.4.1 Microbiota intestinal y Obesidad	11
1.4.2 Microbiota intestinal y enfermedad cardiovascular	12
1.4.3 Microbiota intestinal y Diabetes mellitus tipo 2.....	12
1.5 Trasplante fecal como alternativa para el tratamiento de disbiosis.....	16
1.6 Modelos animales para el estudio de la diabetes	17
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	23
5.1 Animales	23
5.2 Inducción de diabetes con estreptozotocina	23
5.3 Evaluación del estado metabólico	23
5.4 Transferencia de sobrenadante con microbiota a ratones experimentales	24
5.5 Evaluación de la transferencia de microbiota	24
5.6 Análisis estadístico.....	25
5.7 Estrategia Experimental	26
6. RESULTADOS	27
6.1 Transferencia de microbiota de ratones diabetizados a ratones sanos	27
6.1.1 Evaluación de las concentraciones de glucosa.....	27
6.1.2 Evaluación de las Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)	30
6.1.3 Evaluación del peso.....	34

6.1.4 Evaluación del consumo de alimento.....	37
6.2 Transferencia de microbiota de ratones sanos a ratones diabetizados.	39
6.2.1 Evaluación de las concentraciones de glucosa.....	39
6.2.2 Evaluación de las Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)	42
6.2.3 Evaluación de CTOG por grupo y por tipo de transferencia	45
6.2.4 Evaluación del peso.....	48
6.2.5 Evaluación del consumo de alimento.....	51
7. DISCUSIÓN	54
8. CONCLUSIONES	58
9. REFERENCIAS	59
10. ANEXOS	64
Anexo 1 Operacionalización de variables	64
Anexo 2 Cuadro de causalidad	69

Índice de figuras

Figura 1. Diferencias en la composición del microbioma por sitio anatómico.....	3
Figura 2. Vías de catabolismo de los hidratos de carbono.....	7
Figura 3. Efecto de la microbiota intestinal sobre el metabolismo de la glucosa.	15
Figura 4. Estrategia experimental.....	26

Índice de gráficas

	Página
Gráfica 1	Concentración de glucosa respecto de las semanas de intervención..... 29
Grafica 2	Porcentaje de variación de la glucosa respecto de las semanas de intervención..... 29
Gráfica 3	CTOG pre-transferencia..... 31
Gráfica 4	CTOG post-transferencia..... 32
Gráfica 5	Curvas de tolerancia oral a la glucosa RS-TMDM2..... 34
Gráfica 6	Evaluación del peso respecto de las semanas de intervención..... 36
Gráfica 7	Porcentaje de variación del peso respecto de las semanas de intervención..... 36
Gráfica 8	Evaluación del consumo de alimento respecto de las semanas de intervención..... 38
Grafica 9	Porcentaje de variación en el consumo de alimento respecto de las semanas de intervención..... 38
Gráfica 10	Concentración de glucosa respecto a las semanas de intervención..... 41
Gráfica 11	Porcentaje de variación de la glucosa respecto de las semanas de intervención..... 42
Gráfica 12	CTOG pre-transferencia..... 43
Gráfica 13	CTOG post-transferencia..... 44
Gráfica 14	Curvas de tolerancia oral a la glucosa en el grupo RD-TMDM2..... 46
Gráfica 15	Curvas de tolerancia oral a la glucosa en el grupo RD-ST..... 47
Gráfica 16	Curvas de tolerancia oral a la glucosa en el grupo RD-TMS.. 48
Gráfica 17	Evaluación del peso respecto de las semanas de intervención..... 50

Gráfica 18 Porcentaje de variación del peso respecto de las semanas de intervención..... 50

Gráfica 19 Consumo de alimento respecto de las semanas de tratamiento..... 53

Gráfica 20 Porcentaje de variación del consumo de alimento respecto a las semanas de intervención..... 53

Lista de siglas, símbolos y abreviaturas

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CTOG	Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EVC	Evento Cerebral Vascular
FFAR2	Receptor de ácidos grasos libres 2
FFAR3	Receptor de ácidos grasos libres 3
GLP-1	Péptido similar al glucagón 1
GPR41	Receptor acoplado a proteína G 41
GPR43	Receptor acoplado a proteína G 43
IgA	Inmunoglobulina A
RD-TMDM2	Ratón Diabetizado Transferido con Microbiota de Ratón Diabetizado
RD-TMS	Ratón Diabetizado Transferido con Microbiota de Ratón Sano
RD-ST	Ratón Diabetizado Sin Transferencia
RS-TMDM2	Ratón Sano Transferido con Microbiota de Ratón Diabetizado
RS-TMS	Ratón Sano Transferido con Microbiota de Ratón Sano
RS-ST	Ratón Sano Sin Transferencia
SCFA	Ácidos Grasos de Cadena Corta
STZ	Estreptozotocina
TMF	Transferencia de Microbiota Fecal

1. ANTECEDENTES

1.1 Microbiota

La microbiota es el conjunto de todos los microorganismos que habitan en el cuerpo humano, mientras que el microbioma humano, es la colección de todos los genes de estos microorganismos, en el microbioma existe una variedad de microorganismos que incluye arqueas, bacterias, hongos, protozoarios y virus. Cuando el microbioma agrupa genomas pertenecientes a diferentes especies, se denomina metagenoma.^{1, 2, 3, 4}

Se ha estimado que el humano tiene diez veces más microorganismos que células pertenecientes a su propio cuerpo. Igualmente, algunas estimaciones mencionan que el microbioma está compuesto por genes de más de 10 000 especies diferentes que habitan particularmente en el tracto gastrointestinal.^{5, 6, 7}

Las especies del microbioma intestinal, poseen una actividad que favorece el estado de salud del huésped, impactando directamente en la homeostasis del sistema inmunológico, en la producción de nutrientes esenciales para el organismo y protección frente a microorganismos patógenos.⁸

La composición de la microbiota en general varía por sitios anatómicos (fig. 1), y esta a su vez dependerá de la variación interpersonal. Dicho de otra manera, la microbiota varía de acuerdo al grupo étnico al que pertenece el individuo, a la etapa de la vida en la que se encuentre, la genética, la temporada estacional y más concretamente durante el día.^{9,10}

Específicamente en el tracto gastrointestinal del ser humano, existen más de 10^{14} bacterias anaerobias, levaduras, hongos y virus que componen su microbiota intestinal. Anteriormente se consideraba que, durante el desarrollo del neonato, este sistema era estéril, sin embargo, hallazgos recientes sugieren que la colonización microbiana comienza antes del nacimiento, como lo revela el perfil del microbioma placentario, que

se haya compuesto principalmente por *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Bacteroidetes* y *Fusobacterias*. Posteriormente se colonizará durante y después del parto, dicha colonización dependerá de diversos factores como lo es la vía de parto y la alimentación posnatal. En la etapa adulta, la microbiota intestinal se puede modificar por la dieta, el uso de antibióticos y la exposición ambiental a microorganismos, potenciando así el riesgo de un desequilibrio bacteriano.^{8, 11}

En el organismo humano, la microbiota posee una capacidad para resistir las perturbaciones, denominada resiliencia. Esta habilidad se ha demostrado en estudios recientes en los que se ha observado que, a pesar de la inoculación por vía oral de productos lácteos fermentados, la microbiota no se ve alterada. En el caso de los adultos, dicha capacidad es aún mayor, pero no es totalmente inalterable, ya que se han observado diferentes grados de alteración de la microbiota por diversos factores.⁹

Recientemente se ha demostrado que la mayoría de las especies que conforman la microbiota intestinal, son abundantes en individuos sanos, mientras que, en otros sujetos, estas mismas se encuentran menos representadas. A parte de la distribución que se presenta a lo largo del tracto gastrointestinal, la microbiota es distinta en los tres hábitats que conforma, es decir, que se encuentra diferenciada tanto en células en el lumen intestinal, en asociación con las células epiteliales, así como en las células adheridas a la capa de moco.

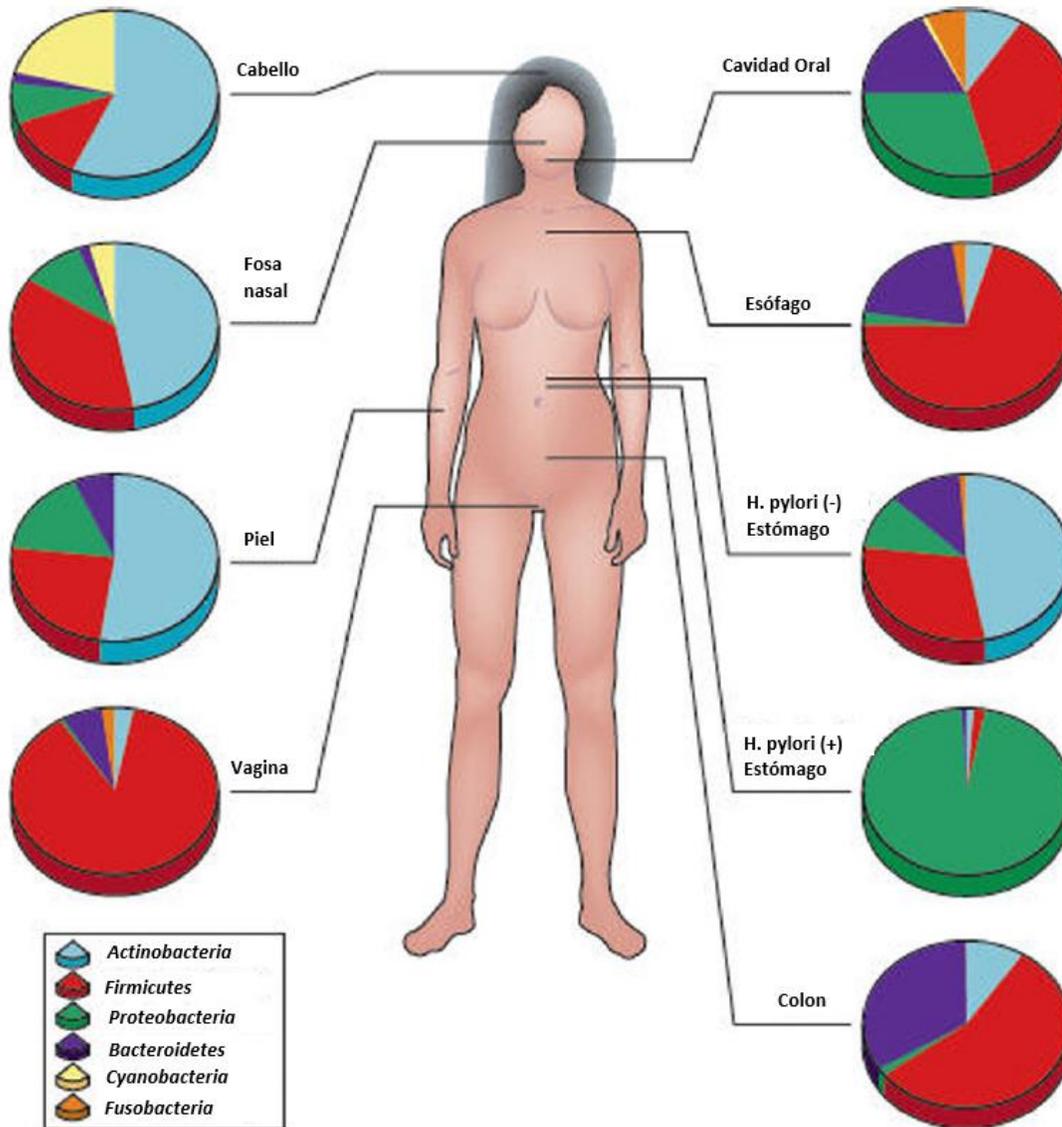


Figura 1. Diferencias en la composición del microbioma por sitio anatómico. La secuenciación de alto rendimiento ha revelado una variación sustancial de microbiomas intraindividuales en diferentes sitios anatómicos, e inter-individualmente para el mismo sitio anatómico. Sin embargo, algunas características taxonómicas de nivel superior (por ejemplo, el Phylum) muestran una visualización temporal y estabilidad longitudinal en los individuos, aún en sitios específicos (Tomada de Cho, I., & Blaser, M. 2012).⁵⁰

Así mismo el pH ácido del estómago restringe el crecimiento de la mayoría de los organismos, aunque algunos pueden habitar en él, tal como *Helicobacter pylori*, bacteria asociada al desarrollo de úlceras y cáncer de estómago. Pocos microorganismos

sobreviven en el duodeno, esto debido a que los ácidos biliares inhiben su crecimiento, aumentando su cantidad en el yeyuno e íleon. En el colon se encuentran la mayor parte de los microorganismos, principalmente bacterias (*Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococos*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*).⁷

Gracias a diversos estudios en metagenómica, se sabe que el 90% de las especies bacterianas presentes pertenece a *phyla Bacteroidetes* (gram negativos) y *Firmicutes* (gram positivos), estas especies se verán afectadas de forma directa por factores ambientales, como el estilo de vida, la dieta y la actividad física.¹²

Debido a su importancia se han desarrollado nuevas tecnologías de secuenciación y análisis para identificar la microbiota intestinal, para tratar de responder cuestionamientos de gran importancia hoy en día en la salud y la nutrición relacionados con la microbiota, como lo es el The Human Microbiome Project y el MetaHit.^{3, 7, 13, 14,15,16, 17, 18}

1.1.1 Composición de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal desempeña un rol importante en la mantención de la función intestinal, ya que estimula su desarrollo, mantiene el recambio epitelial y modula la respuesta inmunológica entre otras funciones importantes.¹⁹

Actualmente se sabe que la microbiota intestinal desarrolla y altera la expresión de genes humanos en respuesta a la adaptación a nuevos entornos ambientales, además, este conjunto de microorganismos contribuye al metabolismo energético eficiente, el control metabólico entre otras muchas funciones.^{20, 21}

Puesto que se desconoce el número exacto de bacterias que componen la microbiota intestinal, se ha propuesto que comprende alrededor de 1000 especies bacterianas con diferentes filos. Las principales especies bacterianas que comprenden la composición de la microbiota intestinal involucra principalmente a los *Firmicutes* y a los *Bacteroidetes*, y

en menor proporción se encuentran las *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*.^{19, 22}

Los *Firmicutes* (gram positivos) constituyen la mayor proporción, con 200 géneros aproximadamente, dentro de los que destacan los *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia* y *Clostridium*. Así mismo, este filo bacteriano es reconocido como el principal productor de butirato a nivel intestinal, además de ser uno de los degradadores especiales de polisacáridos no digeribles.^{19, 22}

Los *Bacteroidetes* (gram negativos) están en proporciones más pequeñas e incluyen *Alistipes*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas* y *Prevotella*, que utilizan una gran cantidad de sustratos y son los productores primarios de propionato.^{20, 21, 22}

Finalmente, los filios *Actinobacteria* (*Bifidobacterium* y *Collinsella*), *Betaproteobacteria* (*Escherichia coli* y *Desulfovibrio*) y el filo *Verrucomicrobia* (*Akkermansia muciniphila*), se encuentran en cantidades aún menores que los bacteroidetes.^{20, 21, 22}

Cada persona presenta un patrón microbiano único que le otorga un estado óptimo de salud, sin embargo y de forma general, los filios anteriormente mencionados otorgan un patrón saludable de las comunidades microbianas que desempeñan un papel vital para las funciones fisiológicas del ser humano.²¹

1.2 Microbiota en el ratón

Las ratas y ratones se encuentran entre los animales de laboratorio más utilizados en diversos campos de las ciencias de la salud, ampliamente utilizados en el estudio de la microbiota intestinal debido a sus grandes similitudes fisiológicas con los humanos, además de representar ventajas como cepas singénicas, utilizar animales de la misma edad y sexo, son modelos en los que se pueden inducir enfermedades metabólicas ya sea por dieta, genéticamente o bien con fármacos.²³

Existen diversos estudios en los que se analiza la composición de la microbiota intestinal en varios modelos de experimentación, específicamente en ratones, esto es de suma

importancia ya que representa la capacidad de poder trabajar con el modelo murino y que los hallazgos encontrados en dicho modelo pueden ser predictivos de lo que pasa con la microbiota de un ser humano.

Flemer *et al.* diseñaron un estudio en el que se analizó la composición de la microbiota intestinal de ratas de laboratorio a lo largo del ciclo vital de dicho modelo experimental, encontrando diferencia significativa entre los diversos grupos de estudio, específicamente determinaron que la composición de la microbiota de ratas de 12 a 26 semanas de edad está compuesta principalmente por *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que el filo *Verrucomicrobia* representa una proporción menor.²³

Por otro lado, Ge *et al.* analizaron la microbiota de ratones de la cepa C57BL/6, en los que encontraron una mayor presencia de *Actinobacterias* (0.6%), *Bacteroidetes* (27.4%), *Firmicutes* (53.0%), *Proteobacterias* (12.3%), *Tenericutes* (0.8%) y *Verrucomicrobia* (5.4%), esa composición es bastante similar a la encontrada por Flemer *et al.*, a pesar de que son dos especies diferentes.²⁴

En otro estudio llevado a cabo por Hart *et al.*, en ratones de la cepa CD1, encontraron que la composición de la microbiota intestinal de este tipo de ratones en particular consta mayormente de los filos *Bacteroidetes* (*Rikenellaceae* y *Porphyromonadaceae*) y *Firmicutes* (*Clostridiales vadin*), con relación a lo anterior, dicha composición es bastante similar a la encontrada en las otras dos especies.²⁵

El hecho de que la microbiota intestinal de los ratones sea similar entre ellas las hace comparables entre esta especie animal, sin embargo, al compararla con la composición de la microbiota de seres humanos, presentan similitudes que nos permiten evaluar biomarcadores de eubiosis y disbiosis que son equivalentes en la microbiota humana, por lo que el empleo de modelos murinos, específicamente de la cepa CD1 para experimentar el comportamiento de la microbiota intestinal con los parámetros metabólicos, es una herramienta plausible como modelo predictivo del comportamiento de la microbiota en seres humanos.

Una de las ventajas del empleo de los modelos murinos es que son permisivos a la transferencia de microbiota fecal entre diferentes animales de laboratorio y con

microbiota de humano lo que permite identificar los elementos de la microbiota humana que pueden tener un impacto sobre diferentes patologías tanto metabólicas como inflamatorias.

1.3 Funciones de la microbiota

La microbiota intestinal contribuye de manera importante al metabolismo humano al aportar con enzimas que no están codificadas por el genoma humano, tal es el caso de la descomposición de polisacáridos, polifenoles y la síntesis de algunas vitaminas.^{26, 16}

Las bacterias en el intestino grueso dependen principalmente de sustratos dietéticos que no están digeridos en el tracto digestivo superior para sobrevivir. Los productos de fermentación bacterianos más importantes de la fermentación que realiza la microbiota intestinal sobre los hidratos de carbono de la dieta (fig. 2) son los ácidos grasos de cadena corta y los gases.²⁶

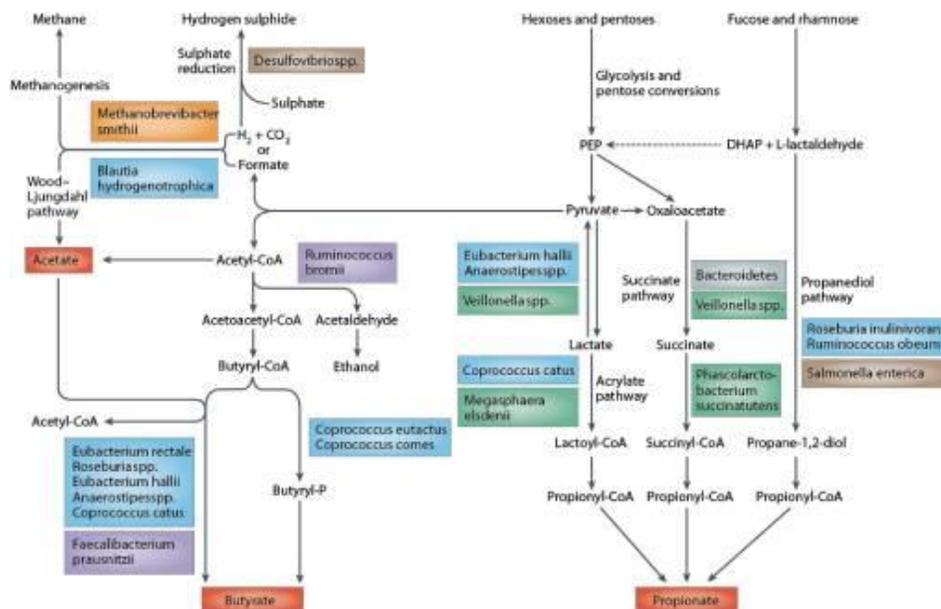


Figura 2. Vías de catabolismo de los hidratos de carbono. (Tomada de Rowland , I., et al. 2018).⁵¹

Respecto a los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), solo son tres los más abundantes detectados en heces, los cuales son acetato, propionato y butirato. El acetato es producido por varias bacterias, sin embargo, los principales productores de butirato son los *Firmicutes*, mientras que el propionato es producido principalmente por los *Bacteroides*.²⁶

Este último es de los más importantes para la salud humano, ya que puede activar la gluconeogénesis intestinal a través de un mecanismo dependiente del AMPc con efecto benéfico sobre la glucosa y la homeostasis energética.^{26, 16}

Por otra parte, el propionato es una fuente de energía para las células epiteliales, pero también se transfiere al hígado, donde desempeña un rol importante en la gluconeogénesis, igualmente, se ha descrito como una molécula importante para la señalización de saciedad debido a la interacción con los receptores intestinales GPR41 y 43 (acoplados a proteína G), que son receptores de ácidos grasos FFAR2 y FFAR3, que activan la gluconeogénesis intestinal. La conversión de propionato en glucosa a través de la gluconeogénesis intestinal promueve directamente la homeostasis energética al reducir la producción de glucosa hepática y, en consecuencia, reduce la adiposidad.^{4, 16, 26}

El acetato es el SCFA más abundante, y es un cofactor/ metabolito esencial para el crecimiento de otras bacterias dentro de las que destaca *Faecalibacterium prausnitzii*. En el organismo el acetato se utiliza en el metabolismo del colesterol y la lipogénesis.²⁶

Otra de las funciones principales de la microbiota intestinal es la producción de vitaminas, específicamente el complejo B, dichas vitaminas son producidas principalmente por bacteroidetes, fusobacterias y proteobacterias, siendo los primeros, los principales productores de dichas vitaminas.

La microbiota intestinal colabora de igual manera en el metabolismo de los polifenoles encontrados en la dieta, en este proceso participan principalmente *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Lachnospiraceae CG19-1* y *Eubacterium rammulus*.²⁶

En general, la microbiota intestinal es considerada como un órgano más del cuerpo, pues tiene funciones que son cruciales para mantener la vida. Dentro de sus funciones principales se destacan:

- La recolección y el almacenamiento de energía y, debido a sus enzimas y rutas metabólicas particulares, extiende el potencial del metabolismo del huésped.
- La influencia que ejerce en el desarrollo intestinal normal, debido a su capacidad, de proliferación de células epiteliales y la apoptosis de las células huésped.
- La estimulación del desarrollo específico y no específico de los componentes del sistema inmunológico, justo después del nacimiento y durante toda la vida y actúa como una barrera antiinfecciosa al inhibir la adherencia de los patógenos y la subsiguiente colonización del sustrato celular y por la producción de bacteriocinas y otros metabolitos tóxicos.
- Algunas de las bacterias que conforman la microbiota intestinal (*Escherichia coli* y *Bacteroidetes fragilis*), participan en la síntesis de aminoácidos, y vitaminas como B1, B2, B5, B6, B12, K, ácido fólico y biotina, además, son capaces de favorecer la absorción de hierro, calcio y magnesio.
- La capacidad de degradar xenobióticos, y esteroides, además de realizar la desconjugación de los ácidos biliares.
- La participación en el control de proliferación y diferenciación de las células epiteliales y en el desarrollo y modulación del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal (GALT), ya que los componentes de la microbiota son reconocidos por las células de la respuesta inmune, generando las condiciones de activación y tolerancia para mantener el equilibrio entre las poblaciones que constituyen la microbiota.^{4, 16}

Todos los efectos benéficos que ejerce la microbiota intestinal, se caracterizan por mantener un equilibrio entre las diversas especies que lo conforman, dicho equilibrio se denomina eubiosis. Cualquier perturbación de la eubiosis, conocido como disbiosis, podría convertirse en un motor fundamental para varias enfermedades infecciosas y no infecciosas, cada una de ellas con firmas de microbiota específicas que pueden desencadenar patologías en diferentes órganos.¹⁶

La disbiosis, particularmente, se origina cuando la relación simbiótica entre los miembros de la microbiota, los productos metabólicos y el sistema inmunológico del huésped se pierde. Normalmente en un ecosistema con disbiosis, se observa una pérdida de la diversidad microbiana general, y por ende se generará un crecimiento excesivo paralelo de especies denominadas patobiontes, que son variantes genéticas de la microbiota “patógena”.²⁷

Al desempeñar funciones tan variadas e importantes, el cuidado de la microbiota intestinal es de suma importancia, sin embargo, existen factores que afectan su composición, particularmente, la dieta, el uso de antibióticos, el consumo de agua clorada el empleo de probióticos y prebióticos, la producción de IgA, anticuerpos secretados al intestino, la edad, la genética, el estrés y los bacteriófagos que infectan a las bacterias y son principales reguladores de las poblaciones microbianas.^{1,14, 28}

1.4 Microbiota en enfermedades metabólicas

Estudios recientes han descubierto, que las poblaciones bacterianas que componen la microbiota, se modifican en diferentes patologías, dichos cambios pueden ser permanentes o temporales, por lo que ahora se pretende conocer si tal evento (cambio en la microbiota) se debe a un factor causal de la enfermedad o es el efecto de las mismas.

Dentro de las patologías, en las que se ha visto alterada la microbiota intestinal destacan la psoriasis, asma infantil, reflujo gastroesofágico, obesidad, carcinoma colorrectal, enfermedad cardiovascular y enfermedad inflamatoria intestinal. Todas estas patologías presentan una disbiosis importante en el sujeto que las padece. Por ejemplo, en el caso de la psoriasis se ha observado un aumento de la proporción de *Firmicutes* respecto de la de *Actinobacterias*. Por el contrario, en el desarrollo de la obesidad se observa un incremento de la proporción de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. En cuanto a las enfermedades inflamatorias intestinales se observa un incremento de *Veillonella* y *Lactobacillus*.^{14, 29}

A parte de las enfermedades anteriormente mencionadas, existe otro grupo de enfermedades en las que existe disbiosis de la microbiota intestinal, tal es el caso de las enfermedades crónicas no transmisibles, las cuales son un grupo de trastornos de la salud que involucran diversas afecciones, dentro de las que destacan la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad cardiovascular, entre otros; dichas patologías se diagnostican a través de diversos métodos bioquímicos, clínicos y metabólicos, además de que su monitorización se basa en estos mismos.¹⁷

1.4.1 Microbiota intestinal y Obesidad

Estudios recientes han propuesto a la microbiota intestinal como un blanco terapéutico para evitar el desarrollo de la obesidad, ya que se ha demostrado que existe una disbiosis marcada en personas que presentan dicha patología, además esta asociación fue demostrada experimentalmente cuando un grupo de ratones transgénicos deficientes del gen de la leptina fueron trasplantados con microbiota de heces de pacientes obesos.³⁰

La microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta, como producto de la fermentación. Estos productos se absorben y sirven como fuente de energía para el organismo. Dichos productos involucran al butirato, propionato y acetato, los cuales han demostrado brindar un efecto protector contra la obesidad inducida por dieta y resistencia a la insulina.

En el caso de la obesidad se ha observado que la modificación de la microbiota intestinal que conlleva a disbiosis, se encuentra en la relación de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, encontrándose los primeros en mayor proporción respecto a los segundos. En personas con cierto grado de sobrepeso u obesidad se ha demostrado que el aumento de la proporción de estos dos tipos de bacterias favorece la ganancia de peso. El posible mecanismo a través del cual esta disbiosis ejerce su efecto, se debe a que los *Firmicutes* son más eficaces obteniendo energía, respecto de los *Bacteroidetes*, promoviendo así un aumento en la absorción de la energía consumida por la dieta, y con ello la ganancia de peso.³¹

1.4.2 Microbiota intestinal y enfermedad cardiovascular

El proceso aterosclerótico es el principal factor de riesgo para desarrollar un Evento Cerebral Vascular (EVC), dicho proceso involucra una acumulación de colesterol y el reclutamiento de macrófagos en las paredes arteriales, lo que contribuye a la formación de placas ateroscleróticas.

Recientemente se ha descubierto que la disbiosis intestinal puede contribuir al desarrollo de esta patología, debido a la secuenciación, se dio a conocer que, en pacientes sanos, existía proporción irregular entre *Roseburia* y *Eubacterium* con relación a *Collinsella*, siendo esta última encontrada con mayor proporción en pacientes con aterosclerosis. A si mismo se descubrió que la presencia de *Akkermansia muciniphila*, ejercía un efecto benéfico en el huésped, al mejorar las funciones de la barrera intestinal, y brindar efectos protectores contra la aterosclerosis.³²

1.4.3 Microbiota intestinal y Diabetes mellitus tipo 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), es considerada una de las enfermedades crónicas con mayor prevalencia a nivel mundial, debido principalmente a un aumento en los factores de riesgo que permiten que dicha patología se presente entre los individuos.³³

Datos recientes de la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT) de medio camino, realizada en México, en el año 2016, encontró que la prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016. Dentro de este grupo poblacional las mujeres participan con un 10.3%, mientras que los hombres solo 8.4%, dicha distribución se observa tanto en comunidades urbanas como rurales.³⁴

Dentro de las características de dicha patología se encuentran la poliuria, polifagia y polidipsia, que mayormente se acompañan por una pérdida de peso en el paciente, debida principalmente a un desequilibrio metabólico, en el cual se deja de utilizar glucosa

como sustrato energético y es sustituido a nivel celular por cuerpos cetónicos, lo que conllevará una pérdida de peso.

Respecto a la sintomatología clínica que se presenta de forma común en los sujetos que cursan con esta patología, la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, menciona que para establecer el diagnóstico de la DM2 se debe cumplir con los siguientes criterios: presencia de síntomas clásicos y una glucemia plasmática casual ≥ 200 mg/dl; glucemia plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dl; o bien glucemia ≥ 200 mg/dl a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. En ausencia de síntomas inequívocos de hiperglucemia, estos criterios se deben confirmar repitiendo la prueba en un día diferente. Se define como intolerancia a la glucosa cuando los niveles de glucosa 2 horas post carga oral de 75 g de glucosa anhidra son ≥ 140 mg/dl y ≤ 199 mg/dl (NOM 015).³⁵

La información sobre la relación de la microbiota con la obesidad y la DM2 se centra principalmente en las poblaciones bacterianas, sin embargo, existe poca información sobre la relación de la microbiota intestinal en la etiología y desarrollo de la DM2. Es por ello que modelos animales que permitan la transferencia de microbiota intestinal en ambientes controlados resultan de gran utilidad para el estudio de esta y su participación en la DM2.

Los primeros estudios que se realizaron comparando las diferencias de la microbiota intestinal entre los sujetos sanos y con presencia de DM2, fueron llevados a cabo por Larsen et al en 2010. Estas investigaciones determinaron en gran medida las diferencias en la composición de la microbiota de individuos sanos y con DM2.³⁶

Específicamente en esta afección metabólica existen diferencias particulares de la microbiota intestinal en la que se ha observado que se encuentra disminuido el filo de los *Bacteroidetes* y por el contrario, se haya aumentado el de los *Firmicutes* y *Proteobacterias*. Así mismo, dichos pacientes presentan mayor cantidad de bacterias del género oportunista como *Enterobacteriaceae*, *Megasphaera*, *Streptococcus*, *Dialister* y *Desulfovibrio*.

Como se mencionó con anterioridad, la microbiota intestinal es capaz de producir efectos benéficos o deletéreos sobre la salud de un ser vivo, específicamente la disbiosis en la diabetes condiciona alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Esto mediado en gran parte por la producción de SCFA, puesto que activan los receptores acoplados a proteínas G, presentes en el intestino. Experimentos previos con modelos murinos que no poseían los receptores GPR41 y GPR43 presentaban marcadores de inflamación crónica y obesidad alterados. Esto debido a que la unión de los ligando a GPR41 pueden desencadenar la secreción del péptido 1 similar al glucagón (GPL-1) y mejorar la sensibilidad a la insulina y la saciedad. Mientras que la secreción de GLP1 estimulada por GPR43 depende de la presencia de nutrientes en la luz y de las comunidades microbianas en el intestino.

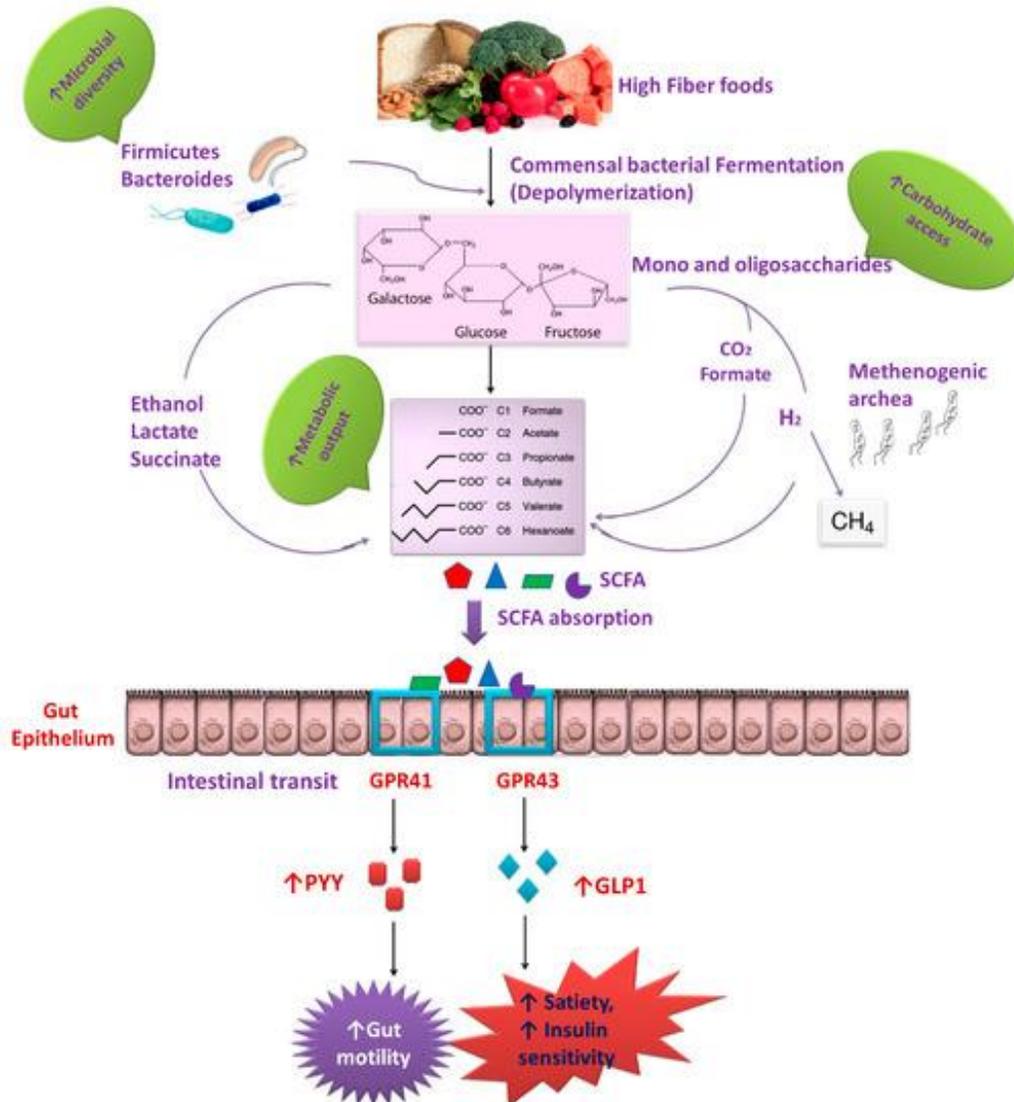


Figura 3. Efecto de la microbiota intestinal sobre el metabolismo de la glucosa.

(Tomada de Ganesan, K., et al. 2018).⁵²

Este cambio conformacional del patrón mayormente adecuado en los pacientes sanos puede evidenciar un efecto directo de la microbiota intestinal sobre los marcadores metabólicos de los pacientes que viven con DM2, al mismo tiempo representa una ventana terapéutica para el control metabólico de estos pacientes.

1.5 Trasplante fecal como alternativa para el tratamiento de disbiosis

Entre las muchas terapias que se han propuesto para favorecer el equilibrio de la microbiota, se ha propuesto la transferencia de microbiota fecal como un método efectivo para el tratamiento de la disbiosis en pacientes con DM2. El proceso de transferencia de heces de donadores sanos a enfermos, conocido como transferencia de microbiota fecal (TMF), tiene antecedentes históricos que datan del siglo IV, ya que se realizaba en China para tratar a pacientes envenenados oralmente o que padecían diarrea.³⁷

Propiamente el trasplante de microbiota fecal “se utiliza para reconstruir la microbiota del tracto gastrointestinal, a través de la extracción de heces frescas o congeladas de un donante sano estrictamente tamizado a través de la preparación médica in vitro y el trasplante en el tracto digestivo de los receptores a través de varios enfoques”.³⁷

La TMF se ha considerado como opción terapéutica genuina por su simpleza y su costo efectividad en las patologías mencionadas y en otras condiciones como síndrome metabólico y resistencia a la insulina. Un ensayo pequeño, aleatorizado, doble ciego reveló que la TMF utilizando heces de donadores delgados, mejoraba la sensibilidad a la insulina en hombres con obesidad, fenómeno también evaluado en un modelo murino, en donde la microbiota de ratones sanos protegía del aumento de peso en ratones obesos.³⁸

La TMF se utiliza comúnmente en patologías digestivas como la infección severa con *Clostridium difficile*, así como la constipación crónica, en las que se ha observado un efecto favorable una vez realizada la TMF. La falta de estudios en humanos, se debe principalmente a la poca aceptación por parte de la comunidad médica, en la que se destacan principalmente los médicos que consideran que dicho procedimiento puede dañar la dignidad del paciente y probablemente generar daño psicológico.^{37,39}

No existe actualmente un consenso sobre la mejor ruta de administración, se ha probado por medio de enemas, sondas nasogástricas y colonoscopia, teniendo resultados muy variables, ya que la viabilidad de las bacterias varía en cada procedimiento.²⁹

En cuanto a la seguridad de la TMF, parece ser que es un procedimiento bien tolerado, sin embargo, hacen falta estudios que determinen que la microbiota intestinal del donante no es patógena para el receptor ya que pueden existir microorganismos que estén infectando de manera subclínica y que pueden ser muy virulentos en pacientes vulnerables. Los efectos adversos más reportados incluyen diarrea, dolor abdominal y espasmos en el día de la inoculación, lo cual se resuelve en pocas horas. Otros síntomas reportados son fatiga, distensión abdominal, náuseas, incomodidad rectal, y cefaleas, se han llegado a reportar infecciones oportunistas como la infección por *Candida albicans*, sin embargo, se ha demostrado que, con el tamizaje correcto del donador y receptor, esta incidencia puede disminuir o erradicarse completamente.

La seguridad de la TMF se encuentra relacionada al método de implementación, la gravedad de la patología de base, el método de trasplante, la dosificación, la frecuencia, el intervalo y el tiempo de seguimiento del paciente, es por ello que hace falta un consenso que permita la estandarización de la TMF.³⁷

Para su aplicación en humanos se requieren de estudios para determinar su seguridad y su eficacia, por tal motivo el modelo murino diabetizado resulta ser una opción viable para el análisis de este tipo de procedimientos como terapias complementarias a la modificación dietaría y a la terapia farmacológica.²⁹

1.6 Modelos animales para el estudio de la diabetes

Debido a la complejidad que involucra el estudio de diferentes patologías en humanos, se ha optado por el trabajo con distintos modelos animales. Dichos modelos contribuyen al estudio de los mecanismos que originan algunas enfermedades, y son de gran utilidad en la investigación científica, a pesar de que los resultados obtenidos de estos sean incapaces de extrapolarse a la población humana.⁴⁰

Concretamente para el estudio de la diabetes mellitus, se puede trabajar de acuerdo a dos tipos de modelos diferentes que comparten características interesantes para su empleo, entre ellos se encuentran los modelos inducidos y los modelos espontáneos, y

estos a su vez pueden subdividirse en aquellos que son análogos, y los que son intrínsecos.⁴¹

- Modelos inducidos: Son aquellos en los que se pueden reproducir manifestaciones clínicas de una enfermedad humana mediante diversos métodos.
- Modelos espontáneos: Son aquellos que se han sometido a análisis genético, para descubrir nuevos genes de susceptibilidad para extrapolar su estudio en humanos.
- Modelos análogos: Son útiles como sustitutos de la enfermedad humana, y permiten hasta cierto punto hacerla accesible a la experimentación
- Modelos intrínsecos: no tratan de imitar la enfermedad, sino que son útiles para responder preguntas específicas sobre la patología.

Algunos de los modelos análogos más importantes para el trabajo con diabetes mellitus tipo 2 son la rata Goto-Kakizaki (GK) y el ratón obeso de Nueva Zelanda (*New Zealand Obese*, NZO), siendo este último una cepa seleccionada debido a su predisposición a DM2 generada por obesidad, que se asemeja en gran medida a la DM2 humana.

Respecto de los modelos inducidos se pueden encontrar, diversas características de inducción de diabetes mellitus tipo 2, por ejemplo, la inducción hormonal y la inducción con fármacos. Ambos modelos inducidos tienen ventajas y desventajas en su aplicación, lo que el investigador deberá considerar a la hora de plantear el uso de este tipo de animales de investigación.

La inducción del modelo a través de fármacos, puede hacer uso de estreptozotocina (STZ) o de aloxano, ambos inducen diabetes en roedores recién nacidos no predispuestos. Específicamente la STZ, actúa intoxicando las células beta del páncreas, generando así diabetes, sin embargo, la sensibilidad por parte del modelo a la STZ dependerá de la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. Así mismo, se verá afectada por el modo y ruta de administración.⁴¹

El uso correcto de la STZ, dependerá del tipo de diabetes que se pretende lograr con el modelo, por ejemplo, en el caso que se requiera inducir diabetes tipo 1 se administran

40mg/kg de peso durante 5 días consecutivos. Esta dosificación se puede manipular para ejercer un modelo de diabetes tipo 2, siendo esta una de las principales ventajas al utilizar un modelo inducido, por otro lado, su principal desventaja radica en que rara vez la diabetes mellitus tipo 2 en humanos es generada por una sustancia tóxica.⁴¹

Evidencias recientes han demostrado que la diabetes inducida por STZ debe ser a través de una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (45-70 mg/kg) disuelta en un tampón de citrato 0.1 M (pH 4.5) después de un ayuno nocturno.⁴²

El trabajo con modelos animales debe estar siempre regulado para evitar el sufrimiento excesivo de los mismos, en México se deben seguir las directrices establecidas en la Nom-062-ZOO-1999, Especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, que explica de forma detallada la forma correcta de manipular a los modelos animales, desde su alojamiento, marcación, alimentación e incluso la eutanasia de los mismos.⁴³

2. JUSTIFICACIÓN

La disbiosis de la microbiota intestinal, se asocia a diversas enfermedades crónicas como la obesidad, enfermedades metabólicas, gastrointestinales y neurológicas, sin embargo, estos estudios se han enfocado principalmente en determinar la composición de los filos bacterianos, elementos más abundantes en la microbiota intestinal, dejando fuera otros elementos bacteriófagos y metabolitos, elementos importantes en la regulación de la microbiota intestinal.

Debido a la complejidad del estudio de los factores que intervienen en la disbiosis, en el presente trabajo se utiliza el modelo murino para evaluar si la microbiota intestinal disbiótica puede participar en la etiología y en el desarrollo de la DM2, y de igual manera si la microbiota en eubiosis es capaz de revertir los efectos de la DM2.

Con este fin, se propuso un modelo permite la colonización de microbiota de ratón sano a otros ratones con DM2 inducida por fármaco, mediante una transferencia fecal, permitiendo evaluar de forma más específica y en un ambiente controlado la participación de la microbiota intestinal, eliminando variantes como la dieta, sexo, edad, medio ambiente y genética, ya que se utilizaron ratones

libres de patógenos específicos y bajo las mismas condiciones de biorritmo y alimentación.

Una de las principales ventajas del modelo murino es que es posible evaluar de manera precisa la DM2, ya que presentan los mismos síntomas y signos de la enfermedad en humanos, por lo que los marcadores séricos del metabolismo y sistema inmune son predictivos a la DM2 en pacientes. Los modelos animales de diabetes como el de ratón permiten realizar experimentación que éticamente sería inaceptable en humanos, para entender los mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo de dicha patología.

3. HIPÓTESIS

La microbiota intestinal de ratones diabéticos transferida a ratones sanos inducirá una disbiosis que alterará el metabolismo de los ratones sanos, provocando estadios de hiperglicemia, polidipsia, poliuria y cambios en el peso corporal. La microbiota de ratones sanos transferida a ratones diabéticos revertirá los síntomas de los ratones diabéticos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si la transferencia de microbiota disbiótica participa en el desarrollo de la DMT 2 y evaluar si la transferencia de microbiota eubiótica puede revertir los efectos de la DMT2 en un modelo murino.

4.2 Objetivos específicos

1. Inducir el desarrollo de DM2 a ratones mediante la administración de estreptozotocina.
2. Establecer las condiciones para la transferencia de microbiota de ratones con DM2 a ratones sanos.
3. Establecer las condiciones para la transferencia de microbiota de ratones sanos a ratones con DM2.
4. Evaluar los niveles de glucosa en ayuno, colesterol total y triglicéridos en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos a ratones con DM2.
5. Evaluar los niveles de glucosa en ayuno, colesterol total y triglicéridos, en los ratones transferidos con microbiota de ratones con DM2 a ratones sanos.

5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Animales

Se realizó un estudio experimental para el que se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 libres de patógenos específicos, de 8 a 11 semanas de edad los cuales se mantuvieron en condiciones de 12 horas luz/oscuridad, agua purificada de garrafón y comida *ad libitum*, ambas en condiciones estériles. Los animales fueron adquiridos en el bioterio del IBT-UNAM.

5.2 Inducción de diabetes con estreptozotocina

Los ratones fueron colocados en cajas de poliestireno en un anaquel con ventilación controlada, en condiciones de esterilidad. Antes de cualquier procedimiento se tomaron muestras de suero mediante una punción en la cola de los animales y se almacenaron a -20°C , esto para hacer determinaciones bioquímicas en una segunda fase del proyecto. Además, se registraron los pesos iniciales utilizando una báscula analítica de la marca Scout Pro (OHAUS).

Previo a la administración de estreptozotocina, los modelos animales fueron puestos en ayuno por 4 horas para poder realizar el procedimiento. Se utilizó estreptozotocina de la marca Goldbio EE. UU, misma que fue disuelta en citrato de sodio 0.05M a un pH de 4.5, a una concentración de 100 mg/kg. Dicha mezcla fue administrada por vía intraperitoneal en una única dosis utilizando una jeringa de insulina.

5.3 Evaluación del estado metabólico

Previo a todos los procedimientos, los ratones fueron pesados, y marcados con la ayuda de un marcador permanente, haciendo pequeñas marcas en la cola asignando un número para cada uno.

Con la finalidad de evaluar el metabolismo de la glucosa antes y después de la transferencia de microbiota se realizó una CTOG, para ello, los ratones se dejaron en ayuno por 4 horas y se tomó la muestra de glucosa basal mediante una punción en la cola, con ayuda de un glucómetro OneTouch mini y tiras reactivas, a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la aplicación de dextrosa (80mg/kg).

5.4 Transferencia de sobrenadante con microbiota a ratones experimentales

Previo a la transferencia se administraron 200 microlitros de bicarbonato de sodio al 1.33%, mediante cánula gástrica desechable, la cual se introdujo a nivel del esófago, dejando pasar un tiempo antes de la administración del homogeneizado con bacterias.

Posteriormente los ratones fueron anestesiados utilizando Pentobarbital en una dilución con PBS en 1:10, de esta solución se administraron 200 microlitros a cada uno de los modelos de experimentación.

Las muestras de heces anteriormente colectadas fueron homogeneizadas mediante la ayuda de un vortex tratando de deshacer todos los grumos, de este homogeneizado se tomaron 4 mililitros de la solución de heces fecales con glicerol al 20%, y 6 mililitros de buffer PBS 1X (10 mM PO₄, 137 mM NaCl y 2.7mM KCl ph 7.4) estéril. De esta suspensión se administraron 600 microlitros por ratón, utilizando un catéter de 18G x 1.77 IN, ya que era flexible y de mejor manejo tanto para el investigador como para el modelo.

5.5 Evaluación de la transferencia de microbiota

Se colectaron muestras de heces aproximadamente 5 gr por ratón y fueron almacenadas a 70°C en RNAlater (sigma-Aldrich) para su posterior secuenciación, lo cual sería la continuación del presente proyecto, las heces se colectaron del grupo de ratones sanos y de los ratones diabetizados después de haber mantenido glucosa en ayuno mayor a 200mg/dl por al menos 2 semanas.

5.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de los datos. Posteriormente se utilizó la prueba estadística T de Student, con la finalidad de evaluar la intervención en cada uno de los grupos, los datos que no se distribuyeron de forma normal fueron evaluados con la prueba de signos de Wilcoxon para muestras pareadas. Se estableció significancia estadística con un valor $p < 0.05$ para cada una de las pruebas.

5.7 Estrategia Experimental

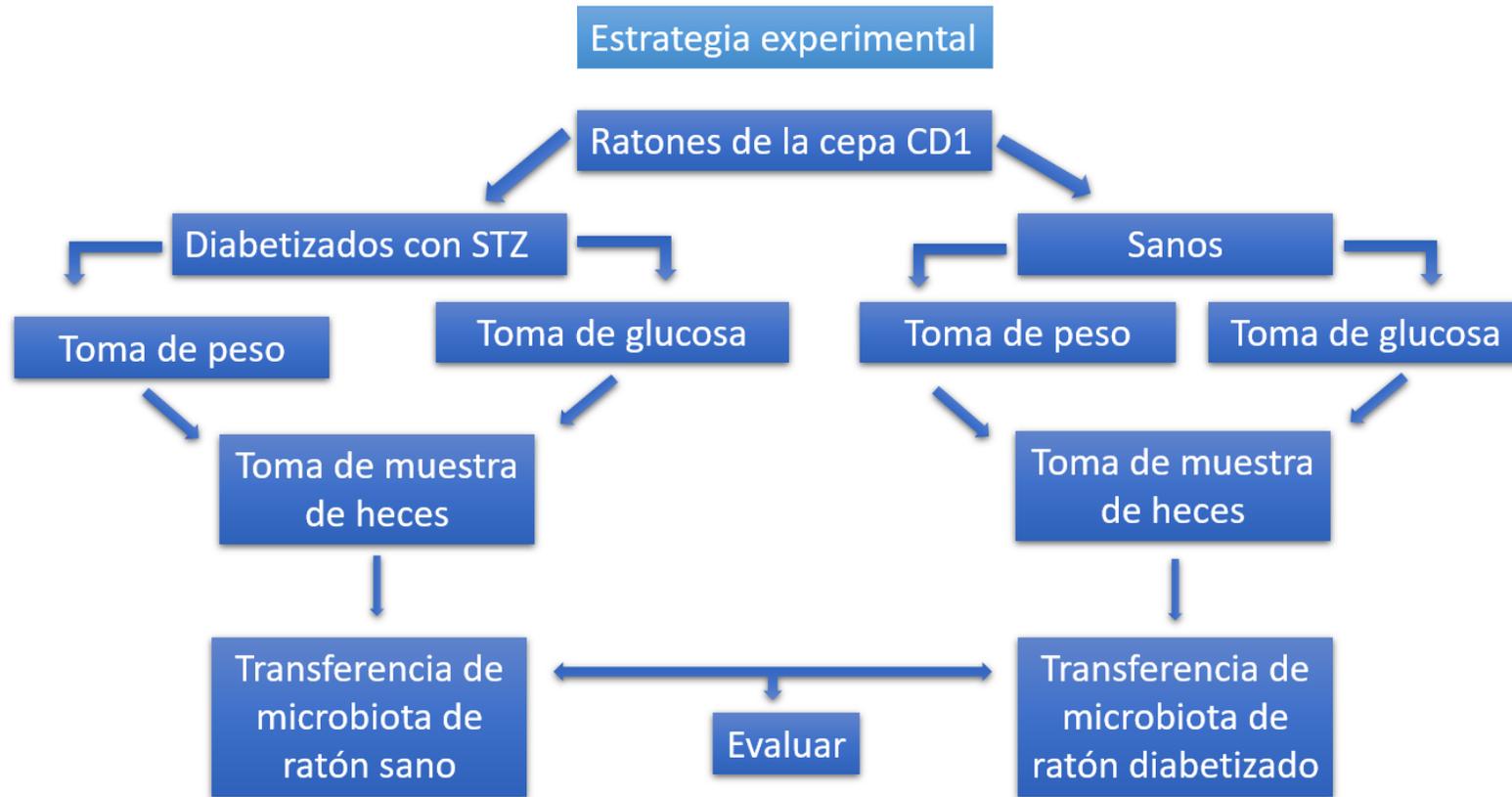


Fig.4. Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1, los cuales en un primer momento fueron diabetizados con STZ, posteriormente se evaluó el peso y la glucosa y se tomó una muestra de heces fecales, enseguida se realizó la transferencia de microbiota de ratón sano, para finalmente evaluar los mismos parámetros mencionados anteriormente. En un segundo momento se trabajó con ratones sanos a los que se les realizó una transferencia de microbiota de ratón diabetizado para evaluar el peso y las concentraciones de glucosa.

6. RESULTADOS

6.1 Transferencia de microbiota de ratones diabetizados a ratones sanos

Con la finalidad de determinar si la microbiota de ratones diabetizados tenía un efecto sobre el índice glicémico de los ratones sanos se diseñó la siguiente estrategia experimental.

Inicialmente, se establecieron tres grupos para realizar las transferencias de microbiota fecal, dejando así, un grupo de 10 ratones sanos que sería transferido con microbiota de ratón diabetizado (RS-TMDM2), cinco ratones sanos transferido con microbiota de ratón sano (RS-TMS) que sería nuestro control de transferencia, y un último grupo también de 5 ratones sanos sin ningún tratamiento (RS-ST). Los grupos fueron evaluados durante 12 semanas evaluando la glucosa, el peso y el consumo de alimento.

Las muestras de heces que se utilizaron para las transferencias fueron obtenidas de ratones diabetizados mediante la administración de estreptozotocina vía subcutánea. Posterior a la administración, los ratones fueron monitorizados por 5 semanas, con la finalidad de dejar que la microbiota fuese modificada por el daño inducido al páncreas, sin embargo, la disbiosis no se analizó en este proyecto. Los ratones diabetizados presentaron signos de diabetes no insulino dependiente y glicemias por arriba de 200 mg/dl, aunque en algunas ocasiones estas fueron menores, pero siempre más altas que los ratones sanos. Las heces fueron colectadas en tubos de 15 mililitros en una proporción 1:1 con glicerol al 50%-PBS y almacenadas a -70°C hasta su utilización.

6.1.1 Evaluación de las concentraciones de glucosa

Uno de los objetivos de este proyecto es determinar la participación de la microbiota intestinal en el control glicémico, de tal manera que se decidió evaluar la concentración

de glucosa basal en los ratones a tres tiempos diferentes y determinar si había un efecto sobre este parámetro. La concentración de glucosa basal en ayuno se midió en tres tiempos diferentes, a la semana 0, 6 y 12.

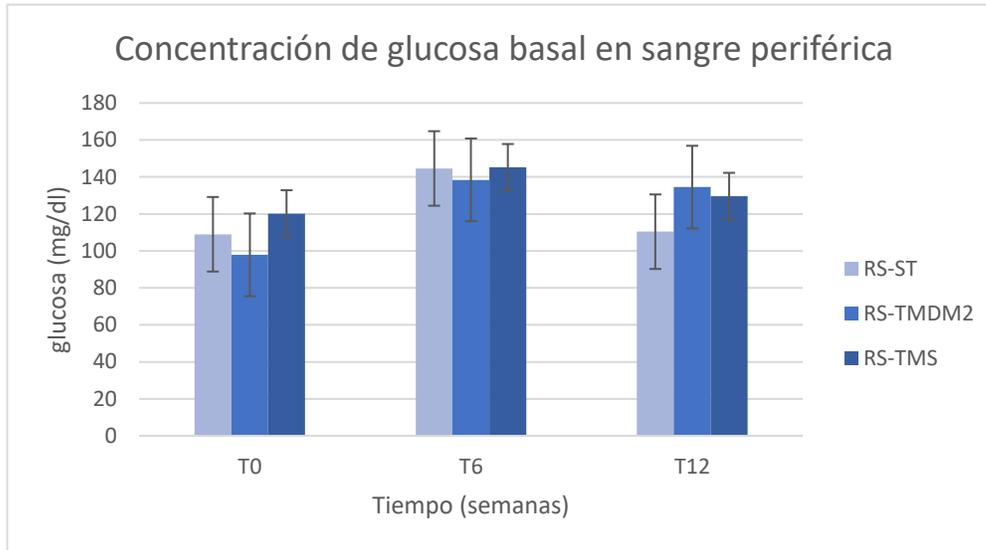
Los modelos experimentales pertenecientes al grupo RS-TMDM2 desarrollaron glicemias menores que los ratones pertenecientes a los otros dos grupos (RS-TMS y RS-ST) en el tiempo basal y a las seis semanas de intervención, sin embargo, dichas concentraciones aumentaron en la semana 12, donde aumentaron más que los otros dos grupos evaluados. Al realizar las pruebas estadísticas pertinentes no se pudo establecer diferencia estadísticamente significativa.

La concentración promedio el grupo RS-ST fue de 109 ± 20.33 mg/dL, 144.6 ± 17.7 mg/dL, 110.4 ± 35.6 mg/dL en el tiempo cero, seis y doce de la evaluación. Mientras que el grupo RS-TMS tuvo concentraciones promedio de 120.2 ± 7.6 mg/dL, 145.2 ± 19.07 mg/dL, 129.6 ± 18.64 mg/dL en los tres tiempos evaluados. Finalmente, el grupo RS-TMDM2 mostro glucosas promedio de 97.9 ± 18.19 mg/dL, 138.4 ± 19.9 mg/dL, 134.5 ± 17.7 mg/dL durante el proceso experimental. (Gráfica 1)

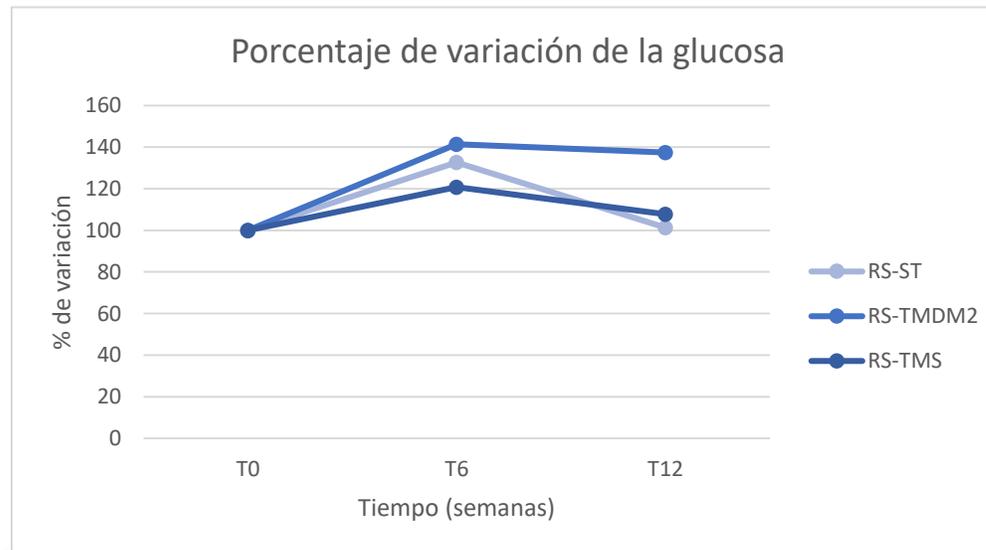
En la gráfica 2 se puede observar el porcentaje de cambio en las concentraciones de glucosa, con respecto a su tiempo basal, de igual forma el tiempo de comparación fue la semana 6 y 12.

Se puede ver que el grupo RS-TMDM2 fue el que aumentó mayormente las concentraciones de glucosa tanto a la semana 6 (41.41%) como en la semana 12 (37.39%). En el caso del grupo RS-ST a la semana 6 se aumentó un 32.66% y 1.2% en la semana 12. En el caso del grupo RS-TMS se observa igualmente un incremento del 20.8% y 7.8% en la semana 6 y 12 respectivamente.

Gráfica 1.



Gráfica 2.



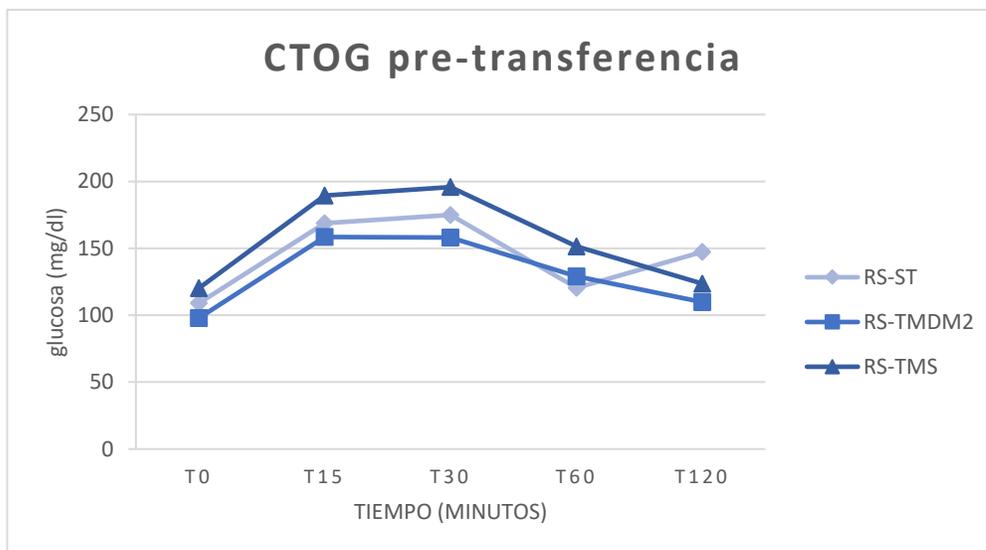
Gráfica 1 y 2. Evaluación de las concentraciones de glucosa de ratones transferidos con microbiota. RS-TMDM2, ratones transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RS-TMS transferencia de ratones machos sanos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. La toma glucosa se realizó utilizando un glucómetro portátil one touch mini, registrando las concentraciones de glucosa durante el periodo experimental. **1.** Se muestra la variación en las concentraciones de glucosa de los ratones por grupo experimental RS-ST ($n=5, \bar{x} 121.3 \pm 20.16$), RS-TMDM2 ($n=10, \bar{x} 123.61 \pm 22.35$), RS-TMS ($n=5, \bar{x} 131.6 \pm 12.6$). **2.** Variaciones en las concentraciones de glucosa a lo largo de 12 semanas expresado como porcentaje de variación tomando como 100% la concentración de glucosa inicial.

6.1.2 Evaluación de las Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)

Con la finalidad de determinar cambios mucho menos evidentes en el metabolismo de la glucosa y determinar una posible resistencia a la insulina se realizaron dos curvas de tolerancia oral a la glucosa, en dos tiempos diferentes, esto con la finalidad de tener el comportamiento basal de dicho parámetro bioquímico previo a la transferencia y posterior a ella, para así poder evaluar las diferencias entre una y otra. La técnica consiste en dejar a los ratones en ayuno por 4 horas y posterior a la toma de la glucosa basal a partir de un pequeño corte en la cola, se administraron 200 μ l de una solución de dextrosa 40mg/ml diluida en agua por vía oral llegando a una dosis de 800 mg de glucosa por kg de peso. Seguido a esto, se tomó una pequeña gota de sangre y se midió la glucosa a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la descarga, utilizando la misma incisión para la toma de la muestra.

En la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) previa a la transferencia el grupo RS-ST muestra una concentración de 109 mg/dL al inicio de la prueba, llega a valores máximos de 175mg/dL a los 30 minutos posteriores a la descarga oral de dextrosa y regresa a niveles basales a los 60 minutos, sin embargo, a los 120 minutos se observa un aumento de este parámetro. Respecto al grupo RS-TMS en la CTOG, inicia con concentraciones basales de 120.2 mg/dL, alcanza su mayor concentración a los 30 minutos, y regresa a valores basales a los 120 minutos. Por otro lado, el grupo RS-TMDM2 inicia la prueba con concentraciones de glucosa de 97.9 mg/dL, alcanza una concentración máxima de 158.2 a los 30 minutos y regresa a valores normales a los 120 minutos de iniciada la prueba (Gráfica 3).

Gráfica 3



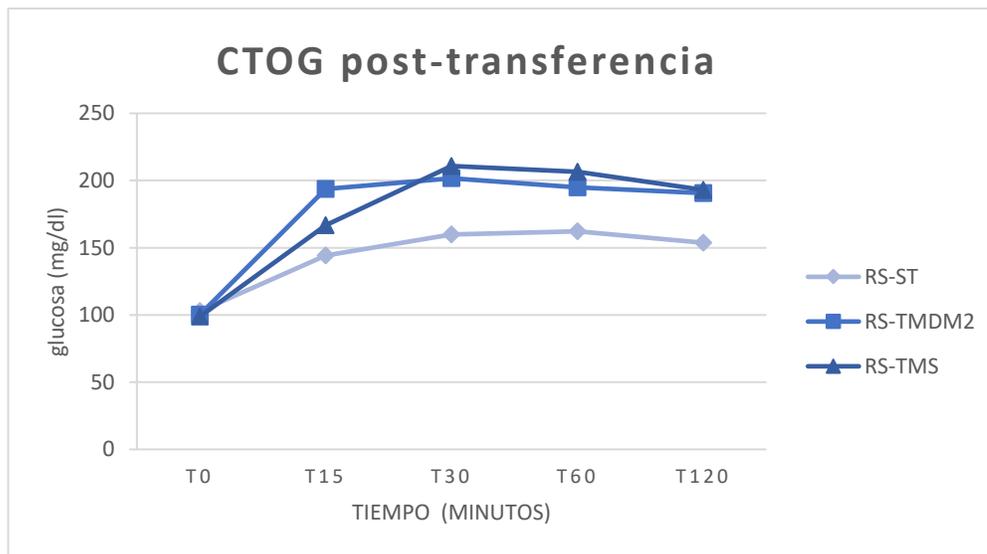
Gráfica 3. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RS-TMDM2, ratones transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RS-TMS, transferencia de ratones machos sanos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral, utilizando un glucómetro portátil one touch mini, después de 4 horas de ayuno. Se observa el mismo comportamiento en las concentraciones de glucosa en los tres grupos experimentales antes de realizar la intervención.

Posteriormente a las transferencias se realizó nuevamente una CTOG, para evaluar el comportamiento de esta, respecto de la transferencia realizada.

En este caso el grupo RS-ST inició la prueba con una concentración de glucosa de 102.8 mg/dL, alcanzando una concentración máxima de 162.2 mg/dl a los 60 minutos, y regresando a concentraciones más bajas a los 120 minutos. En el caso del grupo RS-TMS se inició la prueba con concentraciones de 98.8mg/dL, logrando su mayor concentración a los 30 minutos (210.8 mg/dL) y regresando a concentraciones menores a los 120 minutos. Finalmente, el grupo RS-TMDM2 comenzó la prueba con 100.22 mg/dl

de glucosa sérica, logrando su concentración máxima a los 30 minutos (201.67mg/dL) y disminuyendo paulatinamente esta concentración a los 120 minutos, sin embargo, se observa que las concentraciones aún son elevadas (190.67 mg/dL) como se puede observar en la gráfica 4.

Gráfica 4



Gráfica 4. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RS-TMDM2, ratones transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RS-TMS, transferencia de ratones machos sanos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral de 80mg/kg., utilizando un glucómetro portátil (One touch mini ®).

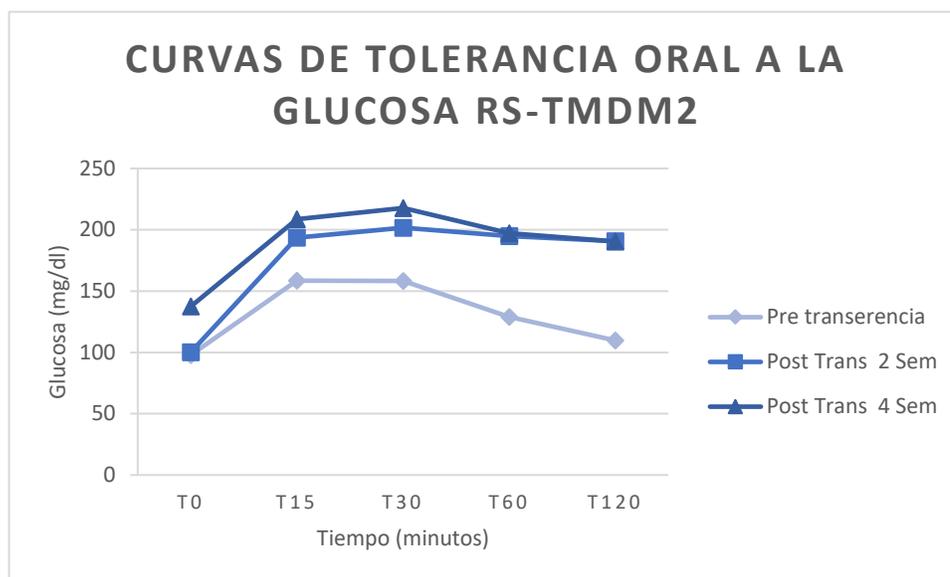
Por último, se evaluaron y compararon las CTOG del grupo RS-TMDM2 antes y después de la transferencia. Es importante mencionar que se realizaron dos CTOG posteriores a la transferencia de microbiota de ratón diabetizado, dichas concentraciones de glucosa se comparan en la gráfica 5. En esta gráfica se puede observar la CTOG pre transferencia, es decir, cuando los ratones estaban metabólicamente sanos, y, después se realizó una CTOG posterior a la transferencia (2 semanas después) y 4 semanas más tarde se

realizó la siguiente CTOG. Se puede observar como el patrón de la curva después de la transferencia ya no recupera los valores basales que mantenía previo a esta condición.

En la CTOG previa a la transferencia se inicia con una concentración de 97.9 mg/dL, a los 15 minutos dicha concentración se ve aumentada (158.5 mg/dL), disminuye ligeramente a los 30 minutos, para comenzar a descender a los 60 minutos de iniciada la prueba (129 mg/dL), terminando en concentraciones séricas adecuadas a los 120 minutos (109.8 mg/dL). Mientras que en la primera CTOG posterior a la transferencia comienza con 100.2 mg/dL, elevándose a los 15 minutos (193.67 mg/dL), y alcanzando un punto máximo a los 30 minutos con una concentración de 201.67 mg/dL, y comienza a disminuir a los 60 minutos (194.78 mg/dL), sin embargo, al alcanzar los 120 minutos las concentraciones de glucosa aún no son lo suficientemente bajas (190.78 mg/dL). Finalmente, la CTOG a 4 semanas de la transferencia de microbiota de ratón diabetizado a ratón sano mostró valores iniciales de 137.5 mg/dL, a los 15 minutos aumento a 208.5 mg/dL, alcanzó una concentración máxima de 217.75 mg/dL, a los 30 minutos y comenzó su descenso a los 60 minutos con una concentración de 197.25 mg/dL, para finalmente concluir la prueba a los 120 minutos con una concentración de 190.38 mg/dL.

Esto demuestra una alteración en el metabolismo de la glucosa de los ratones del grupo TMDM2, comparado con los otros dos grupos, cuyos niveles se recuperan durante la prueba.

Gráfica 5



Gráfica 5. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RS-TMDM2, ratones transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral de 80mg/kg, utilizando un glucómetro portátil (One touch mini ®).

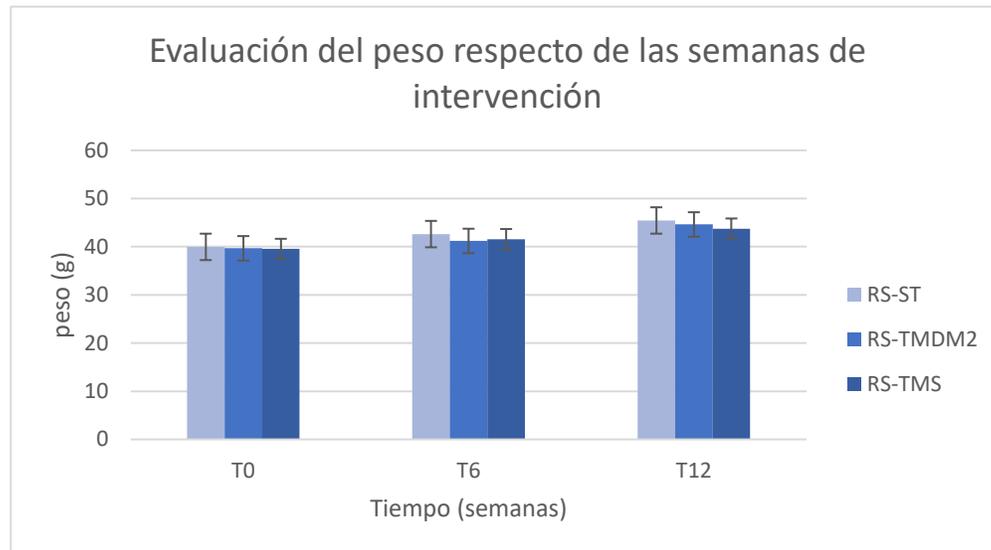
6.1.3 Evaluación del peso

Los resultados obtenidos bajo este esquema experimental fue que los animales transferidos con microbiota de ratón diabetizado, presentaron un patrón de aumento de peso regular respecto al resto de los otros dos grupos, como se puede observar en la gráfica 6. El peso promedio basal en el grupo RS-TMDM2 fue de 39.65 g \pm 1.33, aumentando a la sexta semana con un promedio de 41.19 g \pm 2.03, y finalizando con un promedio de 44.61 g \pm 3.61 en la semana doce. En el caso del grupo RS-TMS, iniciaron

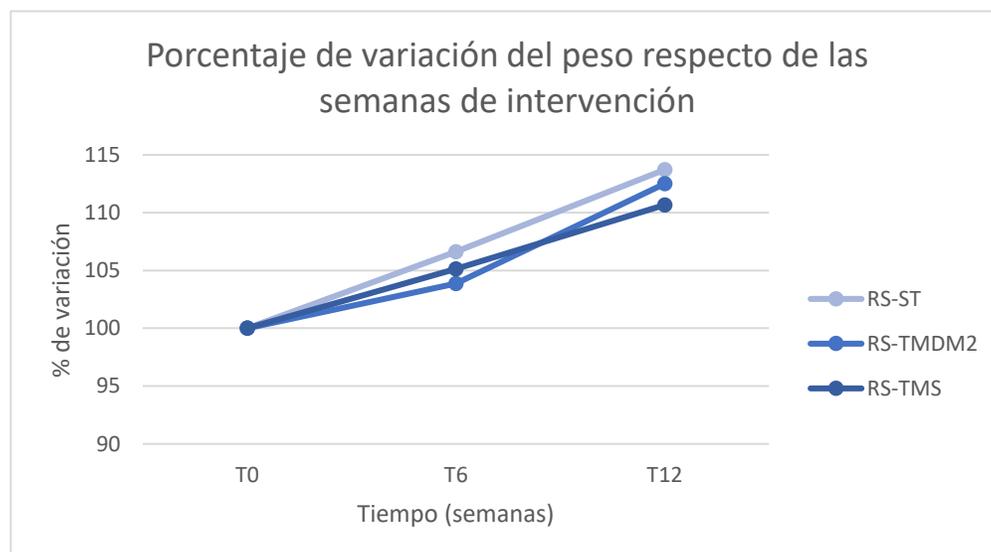
el experimento con un promedio de $39.52 \text{ g} \pm 0.68$, y aumentaron a 41.55 ± 0.33 y 43.74 ± 1.1 a las seis y doce semanas respectivamente. En cuanto al grupo RS-ST se observó un promedio de $39.96 \text{ g} \pm 0.12$ al iniciar la prueba, aumentando a 42.61 ± 0.69 en la sexta semana y finalizando a las doce semanas con un promedio de 45.44 ± 0.14 . sin tener resultados con diferencia significativa.

En la gráfica 7 se puede observar que el porcentaje de cambio de peso no es significativo entre cada uno de los grupos a transferir por lo que no se puede determinar que el porcentaje de cambio de peso se deba a las transferencias, esto debido a que los ratones del grupo RS-TMS aumentaron un 5.14% a las seis semanas y 10.14% a las 12 semanas comparado con su basal, el grupo RS-TMDM2 aumentó un 3.8% y un 12.5% a las 6 y 12 semanas respectivamente. Finalmente, el grupo RS-ST aumento 6.63% y 13.7%, en los dos momentos evaluados.

Gráfica 6.



Gráfica 7.



Gráficas 6 y 7. Evaluación del peso de ratones transferidos con microbiota. RS-TMDM2, ratones transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RS-TMS, transferencia de ratones machos sanos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. La toma de peso se realizó utilizando una balanza digital, registrando los pesos semanales durante las 12 semanas experimentales. **6)** Se muestra la variación en el peso de los ratones por grupo experimental RS-ST ($n=5, \bar{x} 42.6 \pm 2.7$), RS-TMDM2 ($n=10, \bar{x} 41.8 \pm 2.5$), RS-TMS ($n=5, \bar{x} 41.6 \pm 2.1$). **7)** Variaciones en el peso a lo largo de 12 semanas expresado como porcentaje de variación, tomando como 100% el peso inicial.

6.1.4 Evaluación del consumo de alimento

Se determinó tomar el consumo de alimento para asociar, independientemente del peso, si los ratones presentaban polifagia como un signo más de DM2. Al igual que el peso se determinó el consumo de alimento desde el inicio de la prueba hasta la semana 12. Este dato permite saber cuánto consume en promedio un ratón a la semana y establecer si el consumo de alimento aumentaba en los ratones a los que les fue transferida la microbiota de ratón diabetizado, resultando en polifagia.

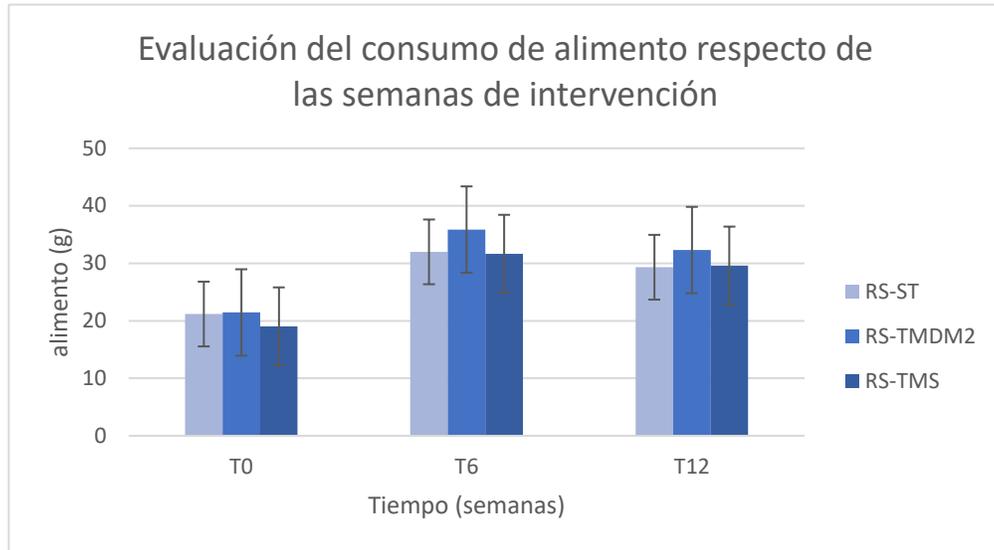
En la gráfica 8, se puede observar como el patrón de consumo no se ve alterado entre cada uno de estos grupos, ya que la ingesta dietética es similar. A pesar de ello se puede observar un ligero aumento en el consumo de alimento en el grupo RS-TMDM2, con respecto a los otros dos grupos, sin embargo, las pruebas estadísticas no muestran diferencia estadística en este grupo con un valor de $p > 0.05$. Los tres grupos aumentaron su consumo de alimento durante el tiempo de evaluación, pero dicho cambio puede deberse al crecimiento propio del ratón.

En cuanto al grupo RS-TMS se observa un comportamiento similar al grupo RS-ST, esto tiene concordancia ya que este grupo recibió transferencia de microbiota de un ratón sano, en el cual no se esperaban cambios importantes en el patrón de alimentación.

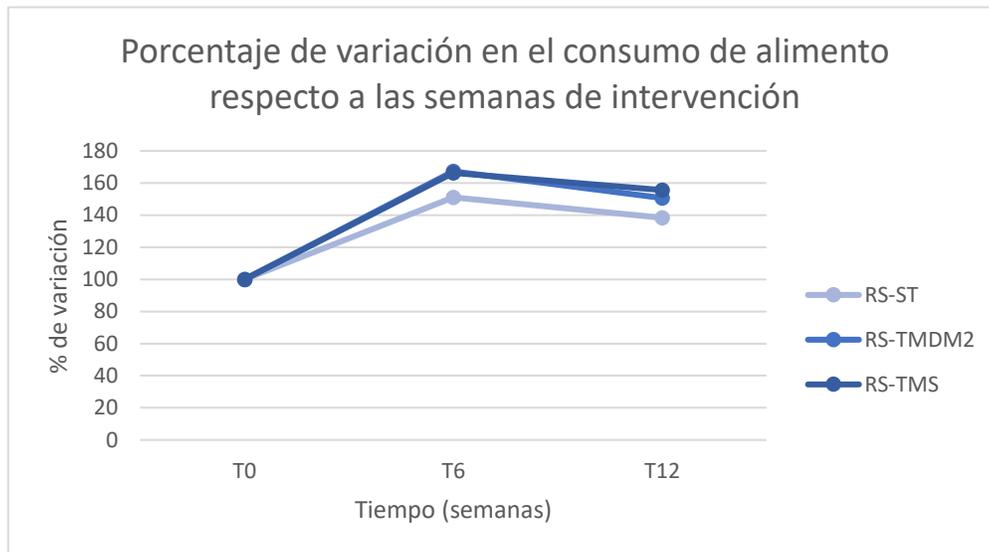
El promedio de consumo de alimento basal para los grupos RS-ST, RS-TMS y RS-TMDM2, fue de $21.18 \text{ g} \pm 0.15$, $19.04 \text{ g} \pm 0.08$, y $21.45 \text{ g} \pm 5.2$ respectivamente. Dichos parámetros se modificaron en la semana 6, donde los tres grupos aumentaron la ingesta de alimento, pero disminuyeron en la semana 12, concluyendo la prueba con un promedio de $32.3 \text{ g} \pm 7.3$ para el grupo RS-TMDM2, $29.61 \text{ g} \pm 0.76$ para el grupo RS-TMS y $29.32 \text{ g} \pm 1.19$ para el grupo RS-ST.

En la gráfica 9 se puede observar que el porcentaje de consumo de los ratones es diferente entre grupos, a pesar de que no existe significancia estadística entre ellas, se puede notar un incremento del 55.1% en el grupo RS-TMS, mientras que en el grupo RS-ST el aumento fue de 38.43%, y de 50.61% en el grupo RS-TMDM2, a las 12 semanas de evaluación.

Gráfica 8.



Gráfica 9.



Gráficas 8 y 9. Evaluación del consumo de alimento de ratones transferidos con microbiota. RS-TMDM2, ratones transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RS-TMS, transferencia de ratones machos sanos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. El consumo de alimento se determinó mediante la colocación de 50 g/ratón de alimento por semana y restando la diferencia. **8.** Se muestra la variación en el consumo de alimento de los ratones por grupo experimental RS-ST ($n=5$, \bar{x} 27.49 ± 5.6), RS-TMDM2 ($n=10$, \bar{x} 29.8 ± 7.5), RS-TMS ($n=5$, \bar{x} 26.7 ± 6.7). **9.** Variaciones en el consumo de alimento a lo largo de 12 semanas expresado como porcentaje de variación, tomando como 100% el consumo inicial.

6.2 Transferencia de microbiota de ratones sanos a ratones diabetizados.

Con la finalidad de determinar si la transferencia de microbiota eubiótica podría ejercer un efecto benéfico sobre el control glicémico de ratones diabetizados, se decidió diabetizar un total de 19 ratones mediante el uso de la estreptozotocina, mediante el protocolo anteriormente descrito. Para este diseño experimental se establecieron tres grupos diferentes. Se establecieron 9 ratones que recibieron transferencia de microbiota de ratones sanos (RD-TMS), 5 ratones que recibieron microbiota de ratones diabetizados (RD-TMDM2) y 5 ratones más fueron los controles, es decir, no recibieron ningún tipo de transferencia (RD-ST) pero seguían diabéticos. A estos grupos se les observó por 8 semanas para observar los cambios metabólicos que pudieran presentar, para ello se evaluó la glucosa en ayuno, el peso y el consumo de alimento.

6.2.1 Evaluación de las concentraciones de glucosa

La concentración de glucosa basal en ayuno se midió en tres tiempos diferentes, la semana previa a las transferencias (T0), a las 4 semanas de la transferencia (T4) y a las 8 semanas (T8). Las concentraciones de glucosa permitieron determinar la posible asociación entre la microbiota transferida y el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, bajo estas condiciones no encontramos diferencias significativas.

En la gráfica 10 se observa que para el tiempo inicial T0 las concentraciones de glucosa son mayores a 200 mg/dl, lo que corrobora que el modelo experimental ha presentado hiperglucemia. A las cuatro semanas de intervención se puede observar que la glucosa basal de todos los grupos aumentó. Para la semana 8 de intervención se puede ver como la glucosa disminuyó con respecto a la semana 4; sin embargo, dichas concentraciones fueron mayores que sus basales.

Los modelos experimentales pertenecientes al grupo RD-TMS iniciaron el experimento con concentraciones de glucosa promedio de 329.78 mg/dl \pm 135.82, a las 4 semanas dicho promedio aumento a 509.22 mg/dl \pm 116.9, y disminuyó a las 8 semanas con un

promedio de 431.13 mg/dl \pm 105.6, en cuanto al grupo RD-TMDM2 iniciaron con una glucosa promedio en ayuno de 297.8 mg/dl \pm 79.58, a las 4 semanas de la transferencia se observa un aumento de la glucosa, siendo ahora de 435 mg/dl \pm 89.56, y finalmente a las 8 semanas se observa un aumento de dichas concentraciones, con un promedio de 445.8 mg/dl \pm 142.4. Para el grupo control (RD-ST) se observa una glucosa inicial promedio de 257.80 mg/dl \pm 95.4, cuatro semanas después dicho promedio aumenta a una glucosa promedio de 352.5 mg/dl \pm 130.8, y a las 8 semanas de la intervención dicha concentración de glucosa disminuye a un promedio de 291.60 mg/dl \pm 105.1.

Debido a que la concentración de glucosa entre los grupos no aportaba información suficiente sobre el efecto negativo o positivo de las transferencias de microbiota fecal se optó por normalizar los datos, es decir, convirtiendo la glucosa inicial a un porcentaje que determinaría las fluctuaciones de la glucosa 4 y 8 con respecto al T0.

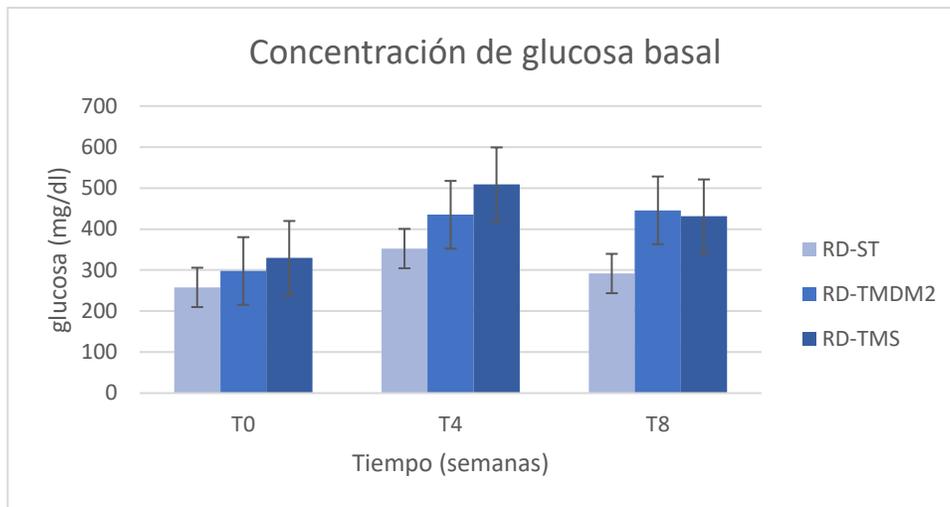
En la gráfica 11 se puede observar que, al normalizar los datos, el efecto de las transferencias no es sumamente visible a las cuatro semanas de la transferencia de microbiota fecal, ya que dicho parámetro aumentó incluso en el grupo control al que no se le administró ningún tipo de transferencia. Sin embargo, a las 8 semanas de intervención el porcentaje de variación de la glucosa es notorio, ya que en el grupo RD-ST y RD-TMS disminuye, no siendo así en el grupo RD-TMDM2 en el que las concentraciones de glucosa incluso aumentan.

Específicamente en el grupo RD-TMDM2 aumentó 46.07% a las 4 semanas de intervención y 49.70% a las 8 semanas comparadas con su basal. En cuanto al grupo RD-TMS aumentó 54.41% y 30.73% a las 4 y 8 semanas de intervención respectivamente. Por último, el grupo RD-ST mostró un aumento de glucosa basal del 36.7% a las 4 semanas y de 13.11% a las 8 semanas de intervención.

Con los datos obtenidos al normalizar las concentraciones de glucosa se puede observar que el aumento de las concentraciones de dicho parámetro a las cuatro semanas de intervención no es totalmente causal del aumento de la glucosa, sin embargo, el tipo de

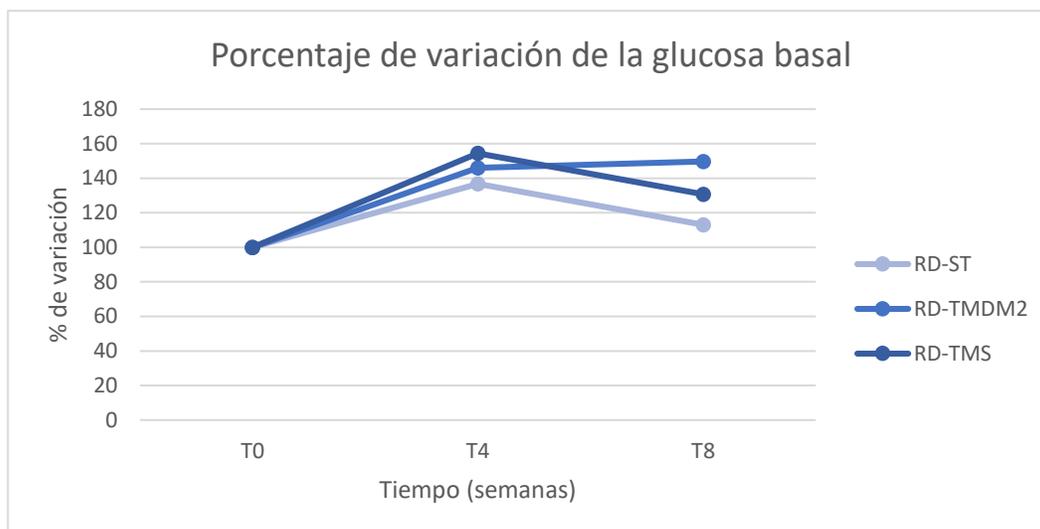
transferencia que recibieron los modelos de experimentación muestran un cambio sostenido en el tiempo, es decir, a las 8 semanas tanto el grupo RD-TMS como el grupo control (RD-ST) se comportan de una forma similar, que es lo esperado para el proceso experimental, así mismo el grupo RD-TMDM2 mantiene las concentraciones de glucosa elevadas aun en el tiempo, lo cual es esperado ya que recibieron microbiota de ratón diabetizado.

Gráfica 10.



Gráfica10. Evaluación de las concentraciones de glucosa en sangre periférica de ratones transferidos con microbiota. RD-TMDM2, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RD-TMS, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. La toma glucosa se realizó utilizando un glucómetro, con cuatro horas de ayuno. Se muestra la variación en las concentraciones de glucosa de los ratones por grupo experimental, RD-ST (n=5, \bar{x} 300.6 \pm 47.9), RD-TMDM2 (n=5, \bar{x} 392.8 \pm 82.5), RD-TMS (n=9, \bar{x} 423.3 \pm 89.97).

Gráfica 11.



Gráfica 11. Porcentaje de Variación en la concentración basal de glucosa en ayuno de los ratones transferidos, tomando los tratamientos de la gráfica tomando como 100% la concentración de glucosa basal inicial en ayuno para cada grupo.

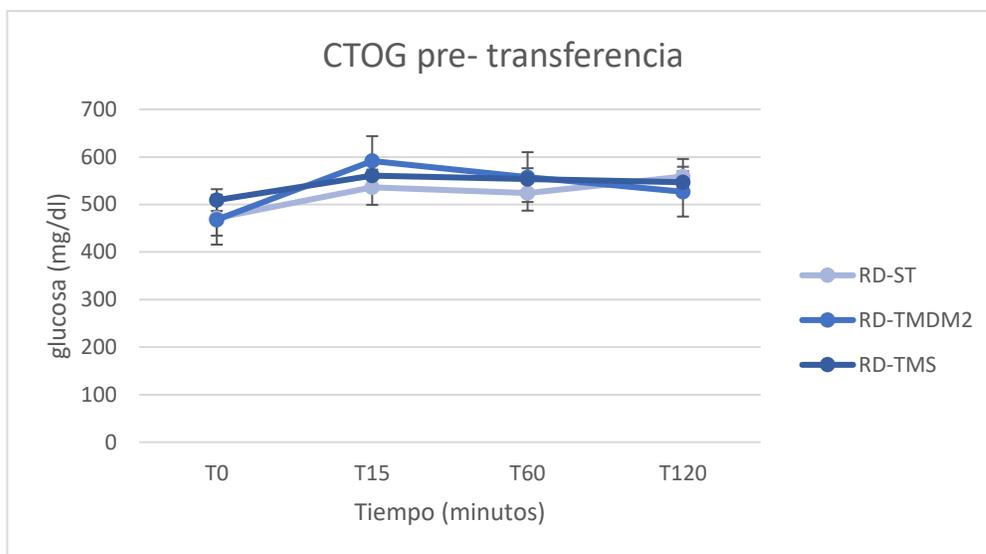
6.2.2 Evaluación de las Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)

Durante este periodo de experimentación se realizaron dos curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG), en dos etapas diferentes, esto con la finalidad de observar el comportamiento de los niveles de glucosa en las diferentes intervenciones realizadas (transferencia de microbiota de ratón sano, diabetizado, o sin transferencia). La CTOG consiste en evaluar las concentraciones de glucosa en sangre periférica en al menos 4 tiempos posteriores a una descarga de dextrosa, para ello se deja a los ratones en ayuno por 4 horas, se toma la concentración de glucosa basal, y posteriormente 4 tiempos más, a los 15, 30, 60 y 120 minutos, posteriores a la administración de 40/mg/kg de dextrosa diluida en agua por vía oral.

En la CTOG previa a la transferencia se observa que el grupo RD-TDMD2 presenta una concentración de 468 mg/dl al inicio de la prueba, llega a valores máximos de 591.4 mg/dl a los 30 minutos de la descarga de dextrosa, disminuye dicha concentración a los 60 minutos (557.6 mg/dl) y termina la prueba con concentraciones de 527 mg/dl a los 120

minutos. En cuanto al grupo RD-ST, se inicia la prueba con una concentración de glucosa promedio de 471.5 mg/dl, llega a 536.25 mg/dl a los 15 minutos y desciende 60 minutos después a 524mg/dl, sin embargo, a los 120 minutos se observa un aumento de dicho parámetro (558.75 mg/dl). Por otro lado, el grupo RD-TMS inicia la prueba con una glucosa basal de 509.22 mg/dl, alcanza una concentración máxima de 560.67 mg/dl a los 15 minutos, para posteriormente disminuir dicha concentración a los 60 minutos (553.3 mg/dl), y culminar la prueba con 547.1 mg/dl. (gráfica 12).

Gráfica 12

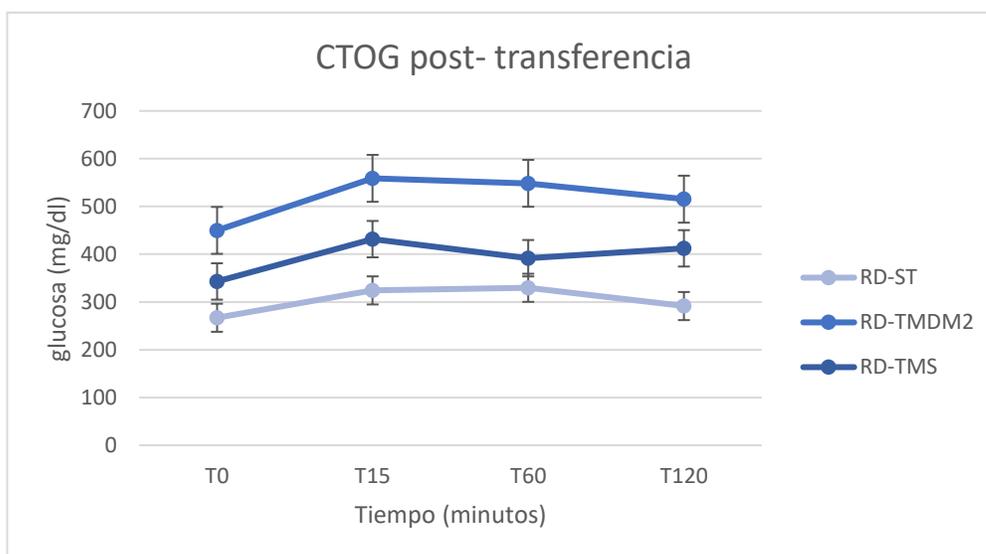


Gráfica 12. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RD-TMDM2, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RD-TMS, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral, utilizando un glucómetro portátil one touch mini, después de 4 horas de ayuno. Se observa que los tres grupos experimentales tienen el mismo comportamiento en las concentraciones de glucosa, previo a las transferencias.

Posteriormente a las transferencias se realizó otra CTOG, para evaluar el comportamiento de las concentraciones de glucosa, esta evaluación se realizó a las 8 semanas.

Para dicha prueba el grupo RD-TMS inicio con una concentración de glucosa promedio de 343 mg/dl, para aumentar a 431 mg/dl a los 15 minutos después de la descarga de dextrosa, a los 60 minutos se observa una concentración de 391.6 mg/dl, y finalmente a los 120 minutos aumenta a 412.3 mg/dl. En cuanto al grupo RD-ST comienza la prueba con una concentración de glucosa de 267 mg/dl, la cual aumenta a 324.25 mg/dl a los 15 minutos, y continua en aumento a los 60 minutos con una concentración de 329.75 mg/dl, concluye la prueba con una concentración de glucosa promedio de 291.5 mg/dl. Finalmente, el grupo RD-TMDM2 inicia la prueba con una concentración de glucosa de 449.89 mg/dl, aumenta a 558.89 mg/dl a los 15 minutos y disminuye a los 60 minutos (548.4 mg/dl), dicha disminución continua hasta los 120 minutos donde culmina la prueba con una glucosa de 515.22 mg/dl (gráfica 13).

Gráfica 13



Gráfica 13. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RD-TMDM2, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RD-TMS, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral, utilizando un glucómetro portátil one touch mini, después de 4 horas de ayuno. Se observa que después de las intervenciones el grupo RD-ST mantiene concentraciones más bajas que los otros dos grupos, seguido del grupo RD-TMS, y con concentraciones mayores el grupo RD-TMDM2.

6.2.3 Evaluación de CTOG por grupo y por tipo de transferencia

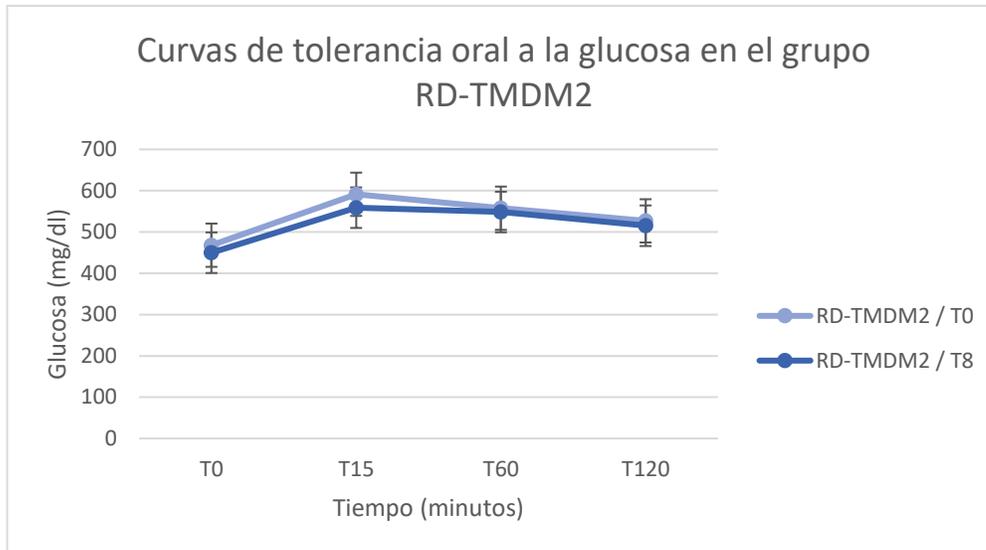
Finalmente, se evaluaron y compararon las CTOG de cada uno de los grupos antes y después de la transferencia, con esto podemos observar con mayor detenimiento como se comporta la glucosa en los ratones diabetizados que recibieron cada una de las transferencias.

En la gráfica 14 se observan las CTOG previas y posteriores a la transferencia en el grupo RD-TMDM2, se puede observar una leve disminución de las concentraciones de glucosa, sin embargo, las diferencias no son significativas y podemos determinar que el comportamiento de la glucosa se mantiene en niveles similares.

En el caso de las CTOG del grupo RD-ST se observa una disminución significativa de la glucosa, ya que en la basal la prueba se inicia y termina con concentraciones de 471.5 mg/dl y 558.75 mg/dl respectivamente, en comparación con los 267 mg/dl de inicio y 291.5 mg/dl de término de la prueba 8 semanas después (Gráfica 15).

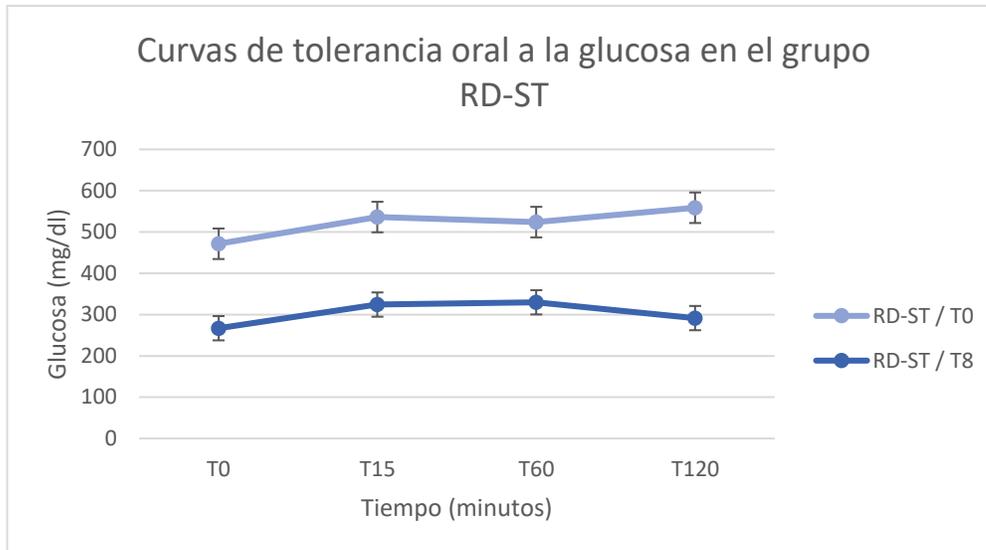
Por último, se observa una diferencia significativa en el grupo RD-TMS ya que en la prueba basal se inicia con una concentración de 509.22 mg/dl y a las 8 semanas de la transferencia dicha prueba comienza con 343 mg/dl, en cuanto al tiempo 120 se observa en la prueba basal una glucosa promedio de 547.1 mg/dl y 8 semanas después, la concentración de glucosa disminuye a 412.33 mg/dl (Gráfica 16).

Gráfica 14



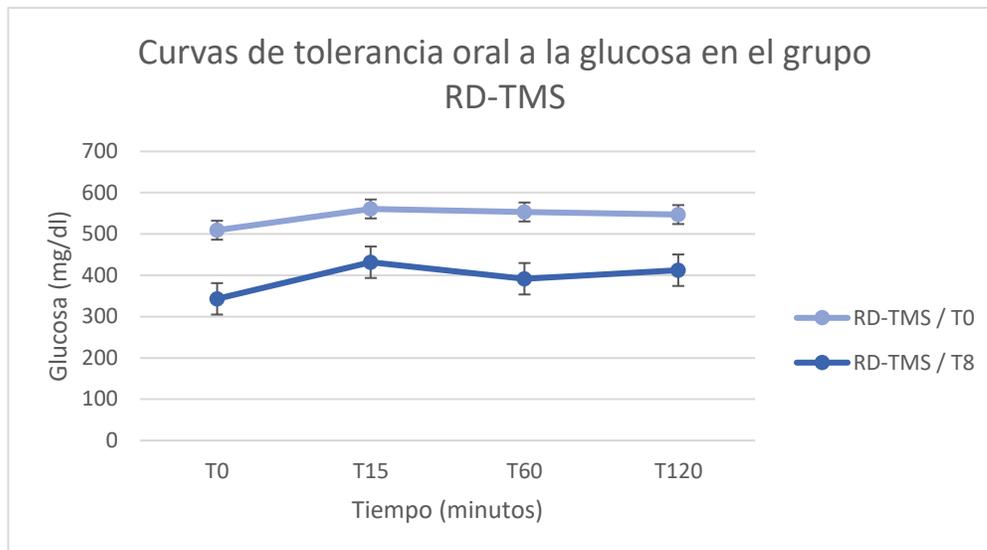
Gráfica 14. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RD-TMDM2, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral, utilizando un glucómetro portatil one touch mini, después de 4 horas de ayuno. Se observa que el patrón de la curva antes y después de la intervención se mantuvo elevado, y no disminuyó las concentraciones de glucosa.

Gráfica 15



Gráfica 15. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RD-ST, ratones diabetizados sin tratamiento. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral, utilizando un glucómetro portatil one touch mini, después de 4 horas de ayuno. Se observa que las concentraciones de glucosa previas a la transferencia son más elevadas que 8 semanas después de la intervención.

Gráfica 16



Gráfica 16. Evaluación de las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de ratones transferidos con microbiota. RD-TMS, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratón sano. Las CTOG se realizaron tomando la glucosa a los 15,30, 60 y 120 minutos posterior a una descarga de dextrosa por vía oral, utilizando un glucómetro portatil one touch mini, después de 4 horas de ayuno. Se observa que las concentraciones de glucosa previas a la transferencia disminuyeron a las 8 semanas de la intervención.

6.2.4 Evaluación del peso.

Uno de los parámetros importantes en la evaluación del estado metabólico de los ratones es el peso corporal, el cual tiene variaciones debido al desarrollo de la DM2. En esta fase se evaluó el peso de los ratones en tres tiempos diferentes. El peso inicial se tomó de la semana previa a la transferencia, y posteriormente, se tomó a las 4 semanas y a las 8 semanas. Este parámetro permitió conocer las variaciones de peso con respecto a cada uno de los grupos, y de esta manera determinar si la microbiota tiene un impacto sobre el peso de los ratones como lo reportado en algunos trabajos. Para ello, se realizó la prueba estadística T-Student a los datos obtenidos para conocer si existía significancia estadística entre intervenciones, con respecto al peso de los ratones entre T0 y T8 y se

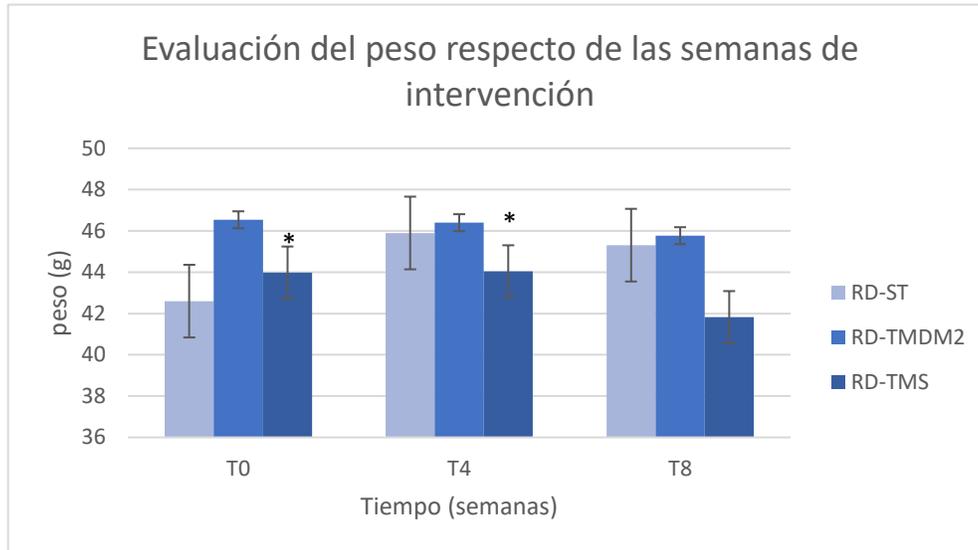
estableció significancia estadística en el grupo RD-TMS en el que el valor de p fue de 0.019, mientras que en los otros grupos no estableció significancia estadística.

En la gráfica 17 se observan las variaciones del peso de acuerdo a los grupos transferidos, en este caso no se observa uniformidad de los datos incluso en el tiempo basal, ya que los ratones que pertenecen al grupo RD-TMDM2 tienen un peso más elevado en comparación al RD-ST y al RD-TMS, para el T4 (4 semanas después de la intervención) el grupo RD-TMDM2 disminuye el peso pero no de forma significativa, por el contrario el grupo RD-ST aumentó el peso, no siendo así en los ratones del grupo RD-TMS, por último, a las 8 semanas se observa una disminución de los pesos de todos los ratones.

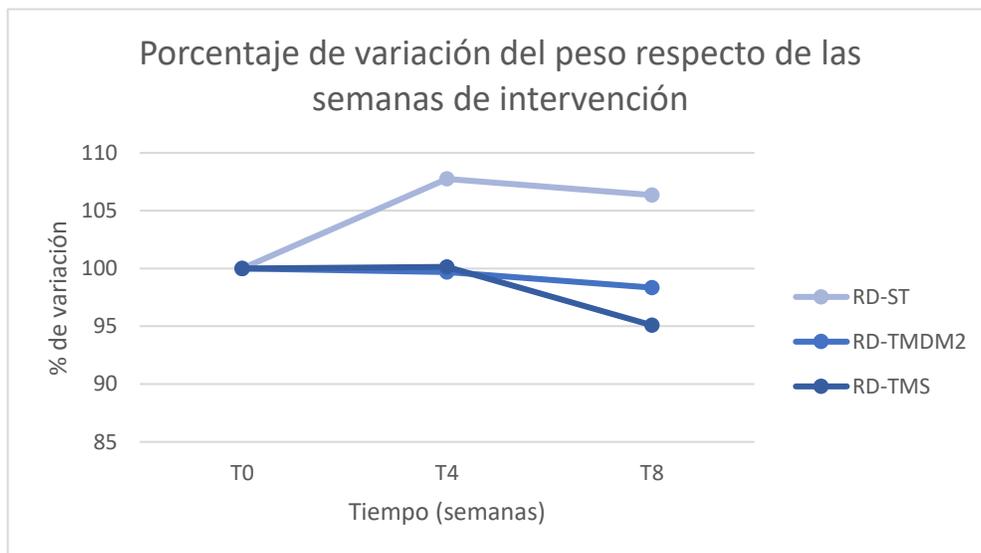
El promedio de peso en los ratones que pertenecían al grupo RD-TMS fue de $43.98 \text{ g} \pm 1.75$ previo a la transferencia, cuatro semanas más tarde el promedio para este grupo fue de $44.04 \text{ g} \pm 1.7$, y para la semana 8 dicho promedio disminuyó a $41.82 \text{ g} \pm 0.55$. En cuanto al grupo RD-TMDM2 se observa un promedio de peso de $46.54 \text{ g} \pm 2.8$ previo a la intervención, a 4 semanas del procedimiento se observa un promedio de $46.4 \text{ g} \pm 3.13$, y a las 8 semanas el promedio disminuye a $45.77 \text{ g} \pm 2.49$, por último, para el grupo RD-ST el promedio previo a la intervención fue de $42.60 \text{ g} \pm 4.53$, cuatro semanas después el promedio para este grupo fue de $46.40 \text{ g} \pm 3.13$, y a las 8 semanas un promedio de $45.3 \text{ g} \pm 0.69$.

En la gráfica 18 se observa el porcentaje de variación del peso, comparadas con su nivel basal (T0). Para el grupo RD-TMDM2 se observa disminución del peso en un 0.3% a las 4 semanas y una pérdida de peso de 1.65% a las 8 semanas. Para el grupo RD-ST se observa un aumento de 7.75% a las 4 semanas y nuevamente un aumento de 6.36% a las 8 semanas, finalmente el grupo RD-TMS presenta mayor uniformidad en las primeras dos comparaciones T0 y T4 ya que el aumento de peso para esta semana fue de 0.14%, sin embargo, a las 8 semanas se observa un descenso del 4.91% del peso basal.

Gráfica 17.



Gráfica 18.



Gráficas 17 y 18. Evaluación del peso de ratones transferidos con microbiota. RD-TMDM2, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RD-TMS, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. La toma de peso se realizó utilizando una balanza digital, registrando los pesos semanales durante las 8 semanas experimentales. **17)** Se muestra la variación en el peso de los ratones por grupo experimental, RD-ST ($n=5, \bar{x} 44.6 \pm 1.75$), RD-TMDM2 ($n=5, \bar{x} 46.23 \pm 0.41$), RD-TMS ($n=9, \bar{x} 43.28 \pm 1.2$). **18)** Variaciones en el peso a lo largo de 8 semanas expresado como porcentaje de variación, tomando como 100% el peso inicial.

6.2.5 Evaluación del consumo de alimento

Respecto al consumo de alimento se evaluó desde la semana previa a la transferencia de microbiota (T0), a la semana 4 (T4) y a la semana 8 posterior a la transferencia (T8), en los tres grupos. Esta evaluación sobre el consumo de alimentos en los ratones permitió evaluar el patrón de consumo que mantenían antes y después de la intervención, para determinar si el patrón dietético se veía alterado respecto de la transferencia que recibía cada grupo.

Se realizó la prueba estadística T-Student para conocer si existía significancia estadística, sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos

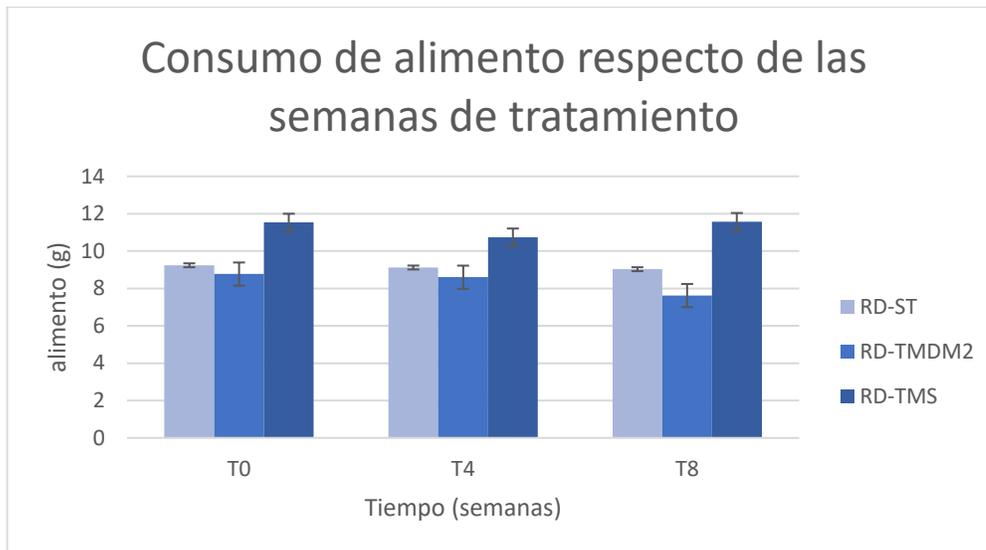
En la gráfica 19, se puede observar como el patrón de consumo de alimento se ve diferenciado entre grupos, manteniendo una ingesta mayor por parte del grupo RD-TMS, respecto de los otros dos grupos, siendo el grupo RD-TMDM2 el que evaluado en el tiempo disminuye su consumo a las 8 semanas, y el grupo RD-ST mantiene un consumo de alimento constante en el que no se observan diferencias.

El promedio de consumo de alimento para el grupo RD-TMS fue de $11.53 \text{ g} \pm 6.4$ previo a la transferencia, cuatro semanas después de la intervención el promedio de consumo para este mismo grupo fue de $10.74 \text{ g} \pm 6.2$, y para la semana 8 de intervención su promedio de ingesta fue de $11.57 \text{ g} \pm 6.4$, dichos datos contrastan mayormente con el grupo RD-TMDM2, en el que se observa un promedio de consumo de $8.77 \text{ g} \pm 0.4$ antes de la intervención, a las 4 semanas se observa un promedio de $8.6 \text{ g} \pm 0.6$, y a las 8 semanas se observa una disminución en el consumo dietético con un promedio de 7.62 ± 2.4 , y finalmente, para el grupo RD-ST se inició con un promedio de ingesta de $9.24 \text{ g} \pm 2.9$, cuatro semanas posteriores a la intervención se observa un promedio de $9.12 \text{ g} \pm 2.7$, y a las 8 semanas un promedio de $9.03 \text{ g} \pm 1.8$. Con estos datos se puede observar que el patrón de consumo fue realmente distinto entre grupos.

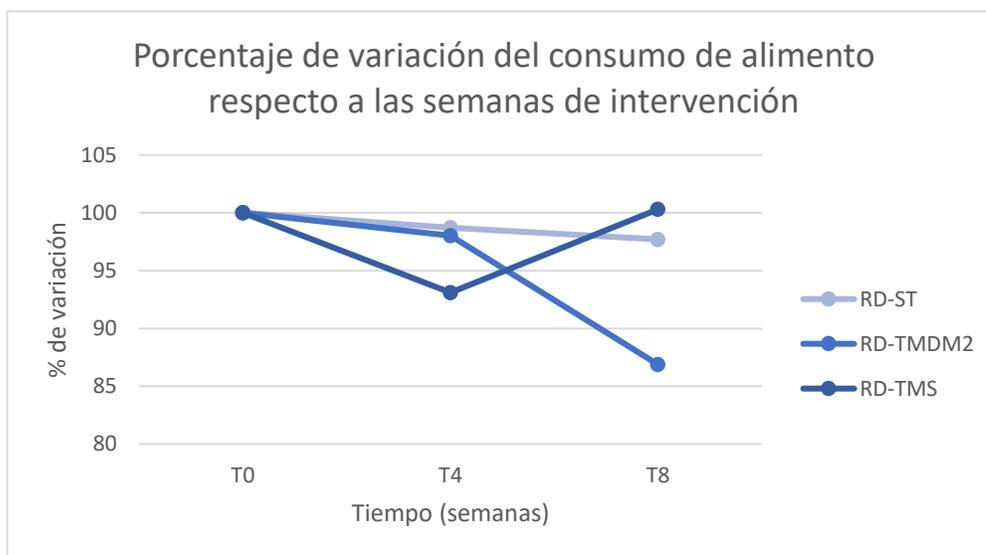
En la gráfica 20 se puede observar el porcentaje de cambio en el consumo de alimento respecto a su nivel basal, esto con la finalidad de observar las diferencias de consumo entre grupos. Para el grupo TMS se observa una disminución del 6.9% respecto de su

consumo basal a las 4 semanas de la intervención, sin embargo, para la semana 8 se observa que su consumo se recupera comparado con el basal e incluso aumenta 0.3%. En cuanto al grupo TMDM2 y el grupo ST se observa una disminución similar a las 4 semanas, disminuyendo 1.99% y 1.3% respectivamente, igualmente a las 8 semanas se puede observar que el consumo de alimento de ambos grupos disminuye, pero en el grupo TMDM2 es más evidente ya que desciende hasta un 13.12% respecto de su consumo basal, no siendo así, para el grupo TMS en el que solo disminuye un 2.3% con relación a su ingesta inicial.

Gráfica 19



Gráfica 20



Gráfica. Evaluación del consumo de alimento de ratones transferidos con microbiota. RD-TMDM2, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados con estreptozotocina, RD-TMS, ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones sanos y RS-ST control sin tratamiento. La toma de peso del alimento se realizó utilizando una balanza digital, registrando los pesos semanales durante las 8 semanas experimentales. **19)** Se muestra la variación en el consumo de alimento por parte de los ratones por grupo experimental, RD-ST (n=5, \bar{x} 9.13 \pm 0.10), RD-TMDM2 (n=5, \bar{x} 8.3 \pm 0.60), RD-TMS (n=9, \bar{x} 11.28 \pm 0.46). **20)** Variaciones en el peso a lo largo de 8 semanas expresado como porcentaje de variación, tomando como 100% el peso inicial.

7. DISCUSIÓN

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismo que convive en íntima asociación con el hospedero, una relación simbiótica que se ha vuelto tan importante como lo sería un órgano del cuerpo humano. Este ecosistema es sumamente complejo y posee miles de microorganismos tales como bacterias, archeas, virus, hongos y bacteriófagos, interaccionando entre si, además con elementos reguladores tanto de la propia microbiota como del ambiente generado en el intestino ya sea por factores externos como la dieta, consumo de agua clorada, antibióticos, probióticos y prebióticos, así como por factores propios del hospedero como el sistema inmune, genética, edad y sexo. Debido a la gran importancia de la microbiota intestinal en el buen funcionamiento del organismo la alteración de las poblaciones que la componen, principalmente de filos bacterianos se ha asociado en el desarrollo y mantenimiento de diversas patologías como la obesidad, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, algunos padecimientos neurológicos, etc. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios, no se ha logrado determinar si estos cambios son parte de la causa de las patologías o son una consecuencia de las mismas, por esta razón es importante continuar con los estudios en modelos controlados, en este caso uso de modelos animales que permitan determinar los elementos que participan en el desarrollo y mantenimiento de estos padecimientos,

Actualmente se considera que la DM2 es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial, debido principalmente a factores medioambientales que permiten que los individuos desarrollen dicha patología. Datos recientes de la ENSANUT mostraron que la prevalencia de esta enfermedad en México pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, lo que demuestra un aumento evidente de esta enfermedad.

Dentro de los objetivos del presente trabajo se ha establecido determinar el grado de asociación que tiene la microbiota intestinal y la DM2, por lo que durante este periodo experimental se ha observado de acuerdo a los resultados obtenidos que la microbiota intestinal juega un rol importante en dicha patología, como lo sugerido en nuestra hipótesis, sin embargo, durante el desarrollo de este proyecto se realizaron transferencias de microbiota fecal, y no trasplante, es decir a la microbiota nativa se adicionó la microbiota de las heces de ratones diabetizados o sanos según fuese el caso,

evaluando si con esta estrategia era suficiente para generar cambios en la microbiota nativa. .

Dentro del periodo experimental y con los resultados obtenidos, se puede observar el gran impacto que tiene la microbiota intestinal en el metabolismo de la glucosa.^{19, 22}

En la primera etapa de este proyecto se utilizaron ratos sanos que recibieron transferencia de microbiota sana (RS-TMS), ratones sanos con transferencia de microbiota de ratón diabetizado (RS-TMDM2), y ratones sanos sin transferencia (RS-ST). De acuerdo a nuestros resultados podemos observar que los ratones del grupo RS-TMS, RS-TMDM2 y RS-ST mostraron un aumento de peso similar a lo largo del tiempo, aún con los diferentes tratamientos, por lo que se sugiere que dicho aumento es el crecimiento propio del ratón y no se debe al cambio de microbiota intestinal. Con respecto al peso en la segunda fase de experimentación en la cual se utilizaron ratones diabetizados, se pudo observar que el grupo que recibió transferencia de microbiota sana y el que recibió microbiota de ratón diabetizado disminuyeron el peso corporal, mientras que el grupo que no recibió transferencia mantuvo un peso constante. Contrario a lo reportado con Turnbaugh P. *et al.* En donde asociaron de forma significativa la microbiota intestinal con una mayor capacidad de obtener energía por parte del huésped cuando se presentaba mayor cantidad de *Bacteroidetes*, respecto de los *Firmicutes*, lo que resultó en identificar que la microbiota intestinal puede contribuir en el aumento de peso de los modelos experimentales. Así como, la revisión llevada a cabo por Komaroff A. donde se observó que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y obesos compartían una composición bacteriana similar a nivel intestinal, sin embargo, los pacientes con DM2 tendían a aumentar el peso en comparación con sus contrapartes sanas, esto es sumamente importante ya que el modelo que utilizamos se comporta de manera similar en cuanto a su composición bacteriana.^{44, 45}

Con respecto del consumo de alimento los grupos RS-TMS, RS-TMDM2 y RS-ST mostraron un patrón similar, sin embargo, el grupo RS-TMDM2 consumió siempre una cantidad mayor de alimento que los otros dos grupos, sin llegar a considerarse estadísticamente significativo, pero esperado de acuerdo al tipo de tratamiento sometido, este hallazgo es particularmente importante, pues al parecer los ratones sanos con la

transferencia de microbiota de ratones diabetizados aumentan su consumo de alimento, aunque no fue estadísticamente significativo, sugiere el desarrollo de la polifagia presente en los ratones diabetizados, síntomas característicos de la DM2.

Por otro lado, los ratones diabetizados con transferencia de microbiota de ratón sano, consumieron mayor cantidad de alimento que los ratones sin transferir, lo que sugiere que los cambios en la microbiota de ratones ya diabetizados son más difíciles de generar cuando ya se encuentra establecida la enfermedad, no observando mejoría en la polifagia, estos datos difieren con diversos estudios en los que se ha determinado que la composición bacteriana intestinal puede contribuir en la producción de ácidos grasos de cadena corta, que a su vez favorecen diferentes cascadas de señalización en las que se estimula la producción de grelina que determina el comportamiento del apetito, y con ello el aumento en el consumo de alimento.^{46, 47, 48}

En cuanto a las concentraciones de glucosa obtenidas en nuestros resultados, podemos ver un claro efecto de la microbiota intestinal como muchos otros autores han destacado, ya que la glucosa basal en el grupo de ratones sanos transferidos con microbiota de ratones diabetizados aumento sus concentraciones en comparación con los otros grupos (RS-TMS Y RS-ST), en el caso de los ratones RD-TMS y RD-ST las concentraciones de glucosa disminuyeron a las 8 semanas de las trasferencias, sin embargo el grupo RD-TMDM2 mantuvo constante el aumento de la glucosa basal en ayuno, confirmando que efectivamente la transferencia de microbiota puede alterar la homeostasis, y el metabolismo de la glucosa en los ratones y no solo la transferencia como procedimiento. De igual forma, se decidió evaluar las curvas de tolerancia oral a la glucosa, esto con la finalidad de observar si había resistencia a la insulina de manera indirecta, esta técnica consiste en dejar a los ratones en ayuno por 4 horas, posteriormente se toma la muestra de glucosa basal mediante una punción en la cola, con ayuda de un bisturí, finalmente se realiza la medición con un glucómetro OneTouch mini y tiras reactivas, a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la aplicación de dextrosa (80mg/kg), con ello se observó que los grupos experimentales RS-TMS y RS-ST recuperan las concentraciones de glucosa basal al tiempo 120, sin embargo, el grupo RS-TMDM2 ya no las vuelve a recuperar y se mantienen elevadas.

En el caso del grupo RD-TMS y RD-ST comenzaron con glucosas elevadas, pero después de 8 semanas se recuperaron, no siendo así en el grupo RD-TMDM2 donde dichas concentraciones se mantienen elevadas constantemente.

Lo anterior se puede evidenciar en el trabajo de Lippert K. *et al*, en el que se asoció la microbiota intestinal con las concentraciones de glucosa en pacientes con DM2 y obesos, donde se observó que el aumento de *Bacteroidetes* estaba asociado a un peso y glucosa menor, que sus contrapartes con disbiosis.⁴⁹

En el proceso de investigación se encontró con varias limitantes, siendo una de ellas el tamaño de la muestra, ya que cuando se utilizan animales es necesario utilizar el mínimo indispensable de individuos por grupo, y hacer varias repeticiones. Sin embargo, debido a limitaciones en tiempo y en animales, se decidió reportar estos resultados, sentando las bases para siguientes estudios que concluyan de manera confiable la participación de la microbiota en el desarrollo y mantenimiento de la DM2. Además de los parámetros evaluados se planteó evaluar la ingesta de líquidos para determinar el grado de la polidipsia y la poliuria que presentaban los ratones, en embargo, no fue posible determinarlas pues algunos ratones tiraban el contenido de los bebederos en las camas por lo que fue un parámetro difícil de evaluar.

Con los resultados obtenidos, podemos sugerir que efectivamente la transferencia de la microbiota puede ser un factor desencadenante en las alteraciones del metabolismo de la glucosa. Aunque los cambios observados en el nivel de glicemia en los ratones sanos transferidos con microbiota de ratones diabetizados fueron sutiles, si hay una tendencia a aumentar el índice glicémico conforme al tiempo y muy probablemente también aumente la resistencia a la insulina.

Finalmente, en este periodo de experimentación se pudo observar que la microbiota intestinal si desempeña un rol importante en el metabolismo de la glucosa, y por ende se relaciona con concentraciones elevadas de esta misma en ratones diabetizados. Así mismo los resultados presentados con anterioridad respaldan la idea del importante rol que tiene la microbiota intestinal en la salud del huésped.

8. CONCLUSIONES

- La transferencia de microbiota fecal de ratones diabetizados a ratones sanos induce un aumento de las concentraciones de glucosa basal a las 6 y 12 semanas.
- La transferencia de microbiota fecal de ratones diabetizados a ratones sanos aumenta los niveles de glucosa en sangre periférica en la curva de tolerancia oral a la glucosa las 2 y 4 semanas posteriores a la transferencia con respecto al grupo control sin diabetes ni transferencia.
- La transferencia de microbiota fecal de ratones diabetizados a ratones diabetizados aumenta las concentraciones de glucosa a las 4 y 8 semanas posteriores a la transferencia, en un efecto de sinergia, comparado con los grupos de microbiota sana y sin transferencia.
- La transferencia de microbiota fecal de ratones sanos a ratones diabetizados disminuye las concentraciones de glucosa cuando se determina el porcentaje de variación a las 8 semanas post-transferencia.
- La transferencia de microbiota de ratones sanos a ratones diabetizados induce un aumento evidente en la tolerancia oral a la glucosa a las 8 semanas posteriores a la transferencia.
- La transferencia de microbiota de ratones sanos a ratones diabetizados muestra una disminución en el porcentaje de peso corporal con respecto a los ratones diabetizados transferidos con microbiota de ratones diabetizados y en ratones diabetizados sin transferir.

9. REFERENCIAS

1. Makrides M, Ochoa J, Morris B. C. R. (2012). La importancia de la inmunonutrición, 77: 1 -3.
2. The Human Microbiome Project. (2012). About the Human Microbiome Project. 24 de octubre de 2016, de The Human Microbiome Project Sitio web: <http://hmpdacc.org/overview/about.php>
3. Bröls T, Weissenbach J. (2011). The human metagenome: Our other genome? *Human Molecular Genetics*, 20(R2), 142–148.
4. Prados-Bo A, Gómez-Martínez S, Nova E, Marcos A. (2015). El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 10–18.
5. Norman JM, Handley SA, Baldrige, MT, Droit L, Liu CY, Keller BW. (2015). Diseasespecific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3), 447–460
6. WHO. (2017). Diabetes. 10 de noviembre de 2016, de WHO Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
7. Englekirk PG, Duben J. (2015). *Microbial Ecology and Microbial Biotechnology*. En *Burton's Microbiology for the Health Sciences (173- 180)*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
8. Richarte , V., Rosales , K., Corrales , M., Bellinda , M., Fadehulhe, C., Calvo, E., Ramos-Quiroga, J. (2018). El eje intestino-cerebro en el trastorno por déficit de atención/hiperactividad: papel de la microbiota. *REV NEUROL*, 109-114.
9. Cho, I., & Blaser , M. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* , 01-28.
10. Brooks, A., Priya , S., Bleckhman, R., & Bordenstein, S. (2018). Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States . *PLOS Biology*, 01-24.
11. Lazar , V., Ditu , L.-M., Gradisteanu, G., Gheorghe , I., Curutiu , C., Holban, A., . . . Chifiriuc , M. (2018). Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. *Front. Immunol.*, 01-18
12. Sharma , S., & Tripathi, P. (2018). Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go? *Journal of Nutritional Biochemistry* , 101-108.

13. Bonilla RG, Souza V, Eguiarte LE. (2008). Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11, 41 -51
14. Bikel S, Valdez LA, Cornejo GF, Rico K, Canizales QS, Soberón X, Del Pozo YL, Ochoa LA, (2015). Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 390-401.
15. Kota K, Mitreva M. (2012). Reference genomes database. 24 de octubre de 2016, de The Genome Institute, Washington University School of Medicine Sitio web: http://hmpdacc.org/doc/ReferenceGenomesDB_SOP.pdf
16. Martin J, Sykes S, Young S, Kota K, Sanka R, Sheth N, Orvis J, Sodergren E, Wang Z, Weinstock GM, Mitreva M. (2013). Optimizing read mapping reference genomes to determine composition and species prevalence in microbial communities. 7(6):e36427.
17. CORDIS. (2013). Final Report Summary - METAHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract). 24 de octubre de 2016, de Comisión Europea. Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo Sitio web: http://cordis.europa.eu/result/rcn/56365_es.html
18. Telle O, Winogradsky Y. (2010). The project objectives: association of bacterial genes with human health a disease. 24 de octubre de 2016, de Metahit Sitio web: <http://www.metahit.eu/index.php?id=351>
19. Gaensan K., Chung KS., Vanamala J., Xu B. (2018). Causal relationship between diet-induced gut microbiota changes and diabetes: a novel strategy to transplant *Faecalibacterium prausnitzii* in preventing diabetes. *Int. J. Mol. Sci.*, 1-28.
20. Farías MM., Silva BM., Rozowski J. (2011). Microbiota intestinal: rol en obesidad. *Rev Chil Nutr.* 228-233.
21. Sanchez AL. Castellano CD., Jordán ML., Moreno II., Cardill CP., Elena D., Muñoz GAJ., Queipo OMI., Jimenez NM. (2017). Role of gut microbiota on cardio-metabolic and immunity in coronary artery disease patients with and without type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Microbiol.* 1-2.

22. Stolf MA., Campos CC., Morais H., Alves SCE., Lomba LA., Brandt AP., *et al.* (2018) Effects of silymarin on angiogenesis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 232-243.
23. Flemer B., Gaci N., Borrel G., Sanderson IR., Chaudhary pp., Tottey W., *et al.* (2017). Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rats. *GUT MICROBES*. 428-439.
24. Ge X., Ding C., Zhao W., Xu L., Tian H., Gong J., *et al.* (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *J Trans I Med*. 1105-4.
25. Hart M., Ericsson AC., Lloyd CK., Grimsrud KN., Rogala AR., Godfrey VL., *et al.* (2018). Development of outbred CD1 mouse colonies with distinct standardized gut microbiota profiles for use in complex microbiota targeted studies. *SCIENTIFIC REPORTS*. 1-11.
26. Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott A., Swann J., Thiele I., Tuohy K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 1-24.
27. Gagliardi , A., Totino , V., Cacciotti , F., Iebba , B., Neroni , B., Bonfiglio , G., . . . Schippa, S. (2018). Rebuilding the gut microbiota ecosystem. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 01-24.
28. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, Bushman FD. (2011). The human gut virome: Inter-individual variation and Dynamic response to diet, 1616–1625.
29. Sbahi H, Palma, JA. (2016). Faecal microbiota transplantation: applications and limitations in treating gastrointestinal disorders, 3: e000087.
30. Ley R., Bäckhed F., Turnbaugh P, Lozupone C., Knight R. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci*. 11070-5.
31. Rácz, B., Duskova, M., Starka, L., Hainer, V., & Kunesova, M. (2018). Links between the circadian rhythm, obesity and the microbiome. *Physiol. Res.* , 409-420.
32. Ma, J., & Li, H. (2018). The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension . *Front. Pharmacol.*, 01-14.

33. Jacobo Cejudo, M. G., Valdés Ramos, R., Guadarrama López, A. L., Pardo Morales, R. V., Martínez Carrillo, B. E., & S. Harbige, L. (2017). Effect of n-3 polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on metabolic and inflammatory Biomarkers in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Nutrients*, 1-11.
34. Hernández Ávila , M., Rivera Dommarco , J., Shamah Levy , T., Cuevas Nasu , L., Gómez Acosta , L., Gaona Pineda , E., García López , D. (23 de 10 de 2018). *Instituto Nacional de Salud Pública* . Obtenido de http://transparencia.insp.mx/2017/auditorias-insp/12701_Resultados_Encuesta_ENSANUT_MC2016.pdf
35. NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos, México D.F. Secretaría de Salud, 23 de noviembre de 2010.
36. Cani, Neyrinck, A., Fava, F., Knauf , C., Burcelin, R., Tuohy , K., . . . Delzenne, N. (2007). Selectives increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice trough a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetología* , 2374-2383.
37. Shi, Y., & Yang, Y. (2018). Fecal microbiota transplantation: current status and challenges in China . *Journal of gastroenterology and hepatology*, 114-116.
38. Borody TJ., Brandt LJ, Paramsothy S. (2014). Therapeutic faecal microbiota transplantation: current status and future developments; 30(1): 97-105.
39. Von Herrath, M. (2014). Intestinal microbiota and faecal transplantation as treatment modality for insulin resistance and tye 2 diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Immunology*, 24-29.
40. Casado , M. (2007). Modelos animales en el estudio de diabetes . *Diabetología*, 432-438.
41. Arias Díaz, J., & Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp.*, 160-168.
42. Al-awar, A., Kupai, K., Veszélka, M., Szucs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., . . . Varga , C. (2016). Experimental diabetes mellitus in different animal models. *Journal of Diabetes Research* , 01-12.

43. NOM-062-ZOO-199. (1999). *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. México, DF.: DOF.
44. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. (2006). An obesity associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
45. Komaroff AL. (2017). The microbiome and risk for obesity and diabetes. *JAMA*; 317 (4):355-356.
46. Yang BG, Yeon HK, Shik LM. (2017). Alteration in gut microbiota and immunity by dietary fat. *Yonsei Med J*. Nov; 58 (6):1083-1091.
47. Tolhurst G, Heffron H, Shan LY, Parker EH, Habib MA, Diakogiannaki E, et al. (2012) Short-chain fatty acids stimulate glucagon like peptide 1 secretion via the G protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, Vol. 61.: 364-371.
48. Clercq NC, Groen AK, Romijn JA, Nieuwdorp M. (2016). Gut microbiota in obesity and undernutrition. *Adv Nutr* (7): 1080-1089.
49. Lippert K, Kedenko L, Antonielli L, Kedenko I, Gemeier C, Leitner M, et al. (2017). Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef Microbes* 24;8 (4): 545-556.

10. ANEXOS

Anexo 1 Operacionalización de variables

Variable	Tipo	Función	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Referencia
Diabetes	Cuantitativa	Dependiente	Enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia	La concentración de glucosa se obtendrá por medio de un glucómetro OneTocuh Mini, después de un ayuno de 8 horas.	Glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL Glucosa plasmática casual ≥ 200 mg/dL Glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL Después de de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua	15

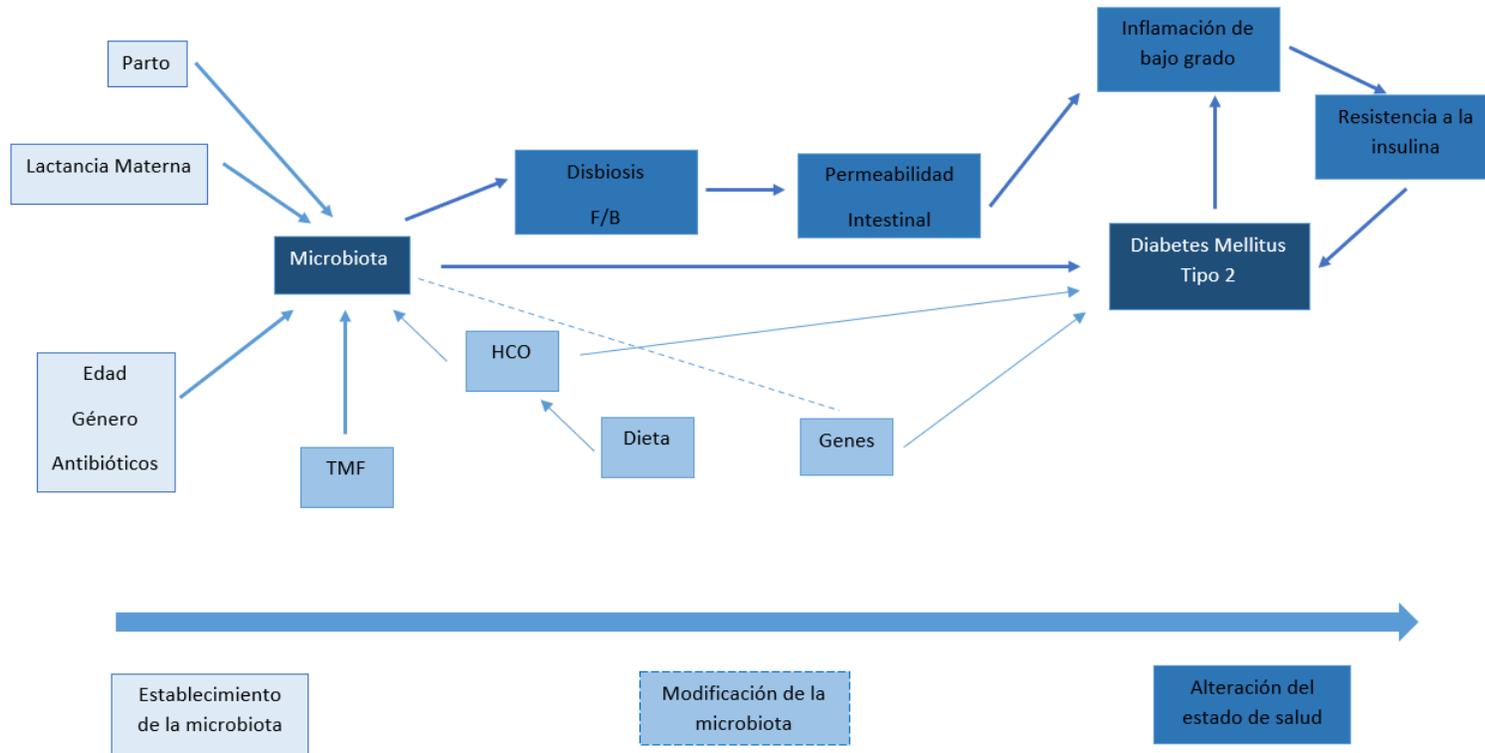
			en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas.			
Diabetes mellitus tipo 2	Cuantitativa	Dependiente	Tipo de diabetes en la que se presenta resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en su producción, puede ser absoluta o relativa.	La concentración de glucosa se obtendrá por medio de un glucómetro OneTocuh Mini, después de un ayuno de 8 horas.	Glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL Glucosa plasmática casual ≥ 200 mg/dL Glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL Después de de una	15

					carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.	
Diabetes modelo murino	Cuantitativa	Dependiente	Diabetes inducida en modelos murinos a través de una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (80mg/kg).	La concentración de glucosa se obtendrá por medio de un glucómetro OneTocuh Mini, después de un ayuno de 4 horas.	Concentración de glucosa >250 mg/dL	42
Microbiota	Cuantitativa	Independiente	Conjunto de todos los microorganismos que habitan en el cuerpo humano.	La composición de la microbiota se determinará mediante la secuenciación masiva de las regiones V3 y V4 del	Se realizará una extracción de ADN de las muestras	1,2,3,4

				gen ribosomal bacteriano 16S rRNA.	fecales en el ZR Soil Microbe DNA	
Eubiosis	Cuantitativa	Independiente	Equilibrio entre las diversas especies que conforman la microbiota.	Se colectarán muestras de heces aproximadamente 5 gr por ratón y serán	miniprep de Zymo Research y se construirán librerías de secuenciación	24
Disbiosis	Cuantitativa	Independiente	Desequilibrio entre las diversas especies que conforman la microbiota.	almacenadas a 70°C en RNAlater (sigma-Aldrich) hasta su análisis.	usando los kits de secuenciación masiva de illumina, además	24
Transferencia de microbiota fecal	Cuantitativa	Independiente	Es la obtención de microorganismos intestinales de las heces de un individuo sano (donante),	La transferencia se realizará a los ratones por vía oral, administrando o aproximadamente 500 microlitros del	de polimerasas High Fidelity (New England Biolabs) y perlas de purificación Ampure	43

			para introducirlos en el tracto gastrointestinal de otro sujeto, con la finalidad de modificar la microbiota del receptor.	homogeneizado de las heces.	de Beckman.	
--	--	--	--	-----------------------------	-------------	--

Anexo 2 Cuadro de causalidad





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Carlos Enrique Gómez Martínez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022628, y que lleva por título **“Asociación de la microbiota intestinal con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. América Ivette Barrera Molina
SINODAL PRESIDENTE .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA | Fecha:2020-11-23 19:44:20 | Firmante

Dc2/6+nXgCx6yCT6onUbQQQuQlgEzkbFaAKkA9N2PFEer1M5UEiV7357x2JUCINy2xul8yykSzhpbA205ccgf8c5Q/ZIVGmPryxYfWSPQfiU3VNR93oA0bkRoPMs+cXMRzWklSusE
I76swLRPHtYeMiE3Ag4gal4VL3NpGPwOxxitqMO58hQREiuVpclOnVT1VW1sseOtaIYu/QMmK28Ud4HppCWCQJsbAdy0BISpqNJUKO4qMcqeHmoKp6rTDQOD0H4isvriaE9NZ
K62wrUj5F95WLzrGiF0bkq2JJBZwbEdl6zoLaJKWzhw3Bs2EKtBscOtTeXiNdak9JslRpL81Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Ykejyf

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ceUuHCE3bU4FaUxrmZFjAggpOlfJuRrz>





MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Carlos Enrique Gómez Martínez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022628, y que lleva por título **“Asociación de la microbiota intestinal con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra.Margarita de Lorena Ramos García
SINODAL SECRETARIO .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA | Fecha:2020-11-22 21:36:34 | Firmante

BFa7CTxGkb9AJT9+Qh18XSXekbEIOV1gXDjMPI/x5i8w/F/KqQ9/Mkipo9xZCR5p32sRXnvv6kANCZonngZIRL5bllij8Hetq7uozxC+ll4qPlx1iUN1aBl0oIQ8QcT6Ku1EX4vJSjGerQoywt1ouvSg7ZVVYAEFTWACTJmmr11/4ay+Xmw4D/2rkCGEFVxURpTbWNm9Q+StwTeGNXz68siZhqdvFHfUbm5u22Dr74xRWKq8zQcjXFL3dbXDLhGF3qsFyCydz2oloW1ki7YPxhwxP8aWVvWi9JFdJM03xIhR/gISev55jU0c65XpQkw844VL+clNcD4TXvbFKNCPg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



MEgr3

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QWSF0K0loUuKmeoTgyYxkrME1kEGCr6E>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Carlos Enrique Gómez Martínez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022628, y que lleva por título **“Asociación de la microbiota intestinal con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dr. Juan José Acevedo Fernández
SINODAL VOCAL .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2020-11-21 09:11:04 | Firmante

jn/bDLCeZKF48a5auLhR5KQpQpukNG51N7VNDk0ID6NFwqenej2mR1ndZQMzo/GR2CCO5PDL3C5TFYUr0ldSMbUu0/+aVjzjAf+JvGMoPufOv66Jm3rAuzUiCV5nBogXrvWwwTtQW6/6cAew+v1K2q6/rQYTtUH4wyvqzrowZe0WXGwuJpfU672/tV04yvB+ZHYEX7MqBk6BOKt!On51wbVPadxjc+pzp1hJxubg3DcHrLzP2LFpdX+Wak8QFViQXFe6cuWY6R080z/T8v80GEsYNrxhCVkpVYWSN6/YWjg02KjCRiqjT8z5RAxzph0EYV0nTAZhaCAfKeUu15XT5mA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Cz1tMc

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Y2mbdjqrE2SEndx4o7E3cJKIDzVssJE7>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Carlos Enrique Gómez Martínez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022628, y que lleva por título **“Asociación de la microbiota intestinal con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. María Araceli Ortiz Rodríguez
SINODAL Suplente.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ARACELI ORTIZ RODRIGUEZ | Fecha:2020-11-19 13:51:44 | Firmante

kP+MzzF8GxjHzrrqxzL5fftjRUPFwlqOLFYbyaWsNOPJRK/2nmRq3UbeJLnYBbSQ8ESvYeZOgT8H00GIIeLzSkFeF5JXncXYZaXcFkDxqgP6ksFNLAw3YZ1ZJTShCjbdlvBz3NGvRimFagydfhQfQIBPpimgWq1jwPYWGSCs7NiWX1kJTn44oQa9gJjCZUG9Mw01xswyxOutGibuldUL1A4KB+LGabXJ5vhW0wksze7wG1BIXBUTRAetq86OYSKQtGmHttQe0dAvhC4DeZ27IRnj4/IBx4kCLifPMDI4qDAM1iiv4X9X5MHSXpFNQLPUaG0IC0liP0uBraa92EO2g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[oezFxB](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7uyix7KXLj6v51KJrYalsnR3VXOYxzsJ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Carlos Enrique Gómez Martínez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022628, y que lleva por título **“Asociación de la microbiota intestinal con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dr. Ramon Alberto Batista García
SINODAL Suplente .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2020-11-18 16:09:37 | Firmante

n6WtLu1OIX1rxENNGuLl4Q5pJLNoB7P7thccRQjrVWGBW6h8Xm2F/+dRGT7X+NcdHq1kDYh5ydXzWxmCFyQLZtMbsBDKcCDpyKb3pvr1OJGL+sxyReJ/hpM6YwGVopuAX6X41IUz/1jnkTGs8NoD0TKs+rCruzrHEhIAArsmRuVeGJ/6twdgTNvZqais32Qf10QYUOzCEeL/c6s90ij8fJ6AEUamukNFoRm0YXdjKTq05aHiJLqewsubaLHlv7LY3E/KQfinkbtJ+TvCXgRKw51dHBQBRfGyp4CA0kl4Ue60ZgVUQkwn/QWhc6rgjoONaew4a9yYswzfsKKDUxN/JQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[fadDwZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GO4sbQIZIB2n82mfVIWA2OUS1uKOqcyw>

