



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE NUTRICIÓN

## TESIS PROFESIONAL

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA SOBRE LA  
COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO  
DE SÍNDROME METABÓLICO.”**

P R E S E N T A  
**REBECA BETZAIRA VELAZQUEZ VILLADA**

Para obtener el grado de:  
**LICENCIADO EN NUTRICIÓN**

Directora  
**DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA**

Asesora interna  
**DRA. AMÉRICA IVETTE BARRERA MOLINA**

Asesor externo  
**DRA. LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO**

Sinodales  
**Dra. Ollin Celeste Martínez**  
**Dra. Delia Vanessa López Guerrero**  
**Mtra. Ana Ivonne Romero Roldán**  
**Mtra. Liliana Karina Valencia Estañón**  
**Mtra. Alma Venosa Castañón**

## AGRADECIMIENTOS

Al INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, por el apoyo para el desarrollo y financiamiento que brindó para elaborar este proyecto.

Al laboratorio de NUTRICIÓN EXPERIMENTAL del instituto nacional de pediatría.

A la Dra. Karla por permitirme ser parte del grupo de estudiantes del laboratorio de Nutrición Experimental para poder realizar mi servicio social, también por brindarme un espacio y un tema de investigación e incentivar la participación en los seminarios de investigación semanales.

A la Dra. Luz por ser mi asesora, compartir su tiempo y conocimiento, por tenerme paciencia y enseñarme sobre las técnicas de laboratorio, gracias también por animarme y ser tan amable conmigo.

Me considero afortunada de haber sido guiada por dos doctoras a quienes admiro.

A cada sinodal y asesora interna de la facultad por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo.

A los compañeros con quienes coincidí en el laboratorio y que hoy son mis grandes amigos: Adri, Pedro y Lalo, gracias por el apoyo que me brindaron para adaptarme al laboratorio y sobre todo por su amistad.

A Alan por ser una parte importante de mi vida y apoyarme de manera incondicional.

Y Especialmente a mi familia, en especial a mis hermanos Humberto y Fabiola, a Guillermo, mis sobrinos Josué y Natalia por su cariño, a mis tías Marina y Elisa, por su apoyo sincero e incondicional, a mi gatita quetza por hacerme feliz y sobre todo gracias a mis padres Aideé Villada y Humberto Velazquez, por su apoyo durante toda mi vida, por motivarme a seguir adelante, creer en mí y cuidarme en cada momento.



El siguiente proyecto fue realizado en el Laboratorio de nutrición experimental perteneciente a la torre de investigación “Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría registrado con el número de proyecto 057/2021, bajo la dirección de la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera y la asesoría de la Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo.

Ciudad de México, Agosto 2021.

## RESUMEN

### “EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO.”

**Antecedentes:** La microbiota intestinal (MI) varía entre individuos de acuerdo con factores genéticos, estilo de vida. Recientemente se relacionó con el consumo de fármacos para el tratamiento de patologías crónicas, como el síndrome metabólico.

Por lo anterior, resulta importante profundizar el análisis del efecto de fármacos sobre la MI, entre estos destaca la metformina, fármaco comúnmente prescrito para el tratamiento de Diabetes Mellitus 2.

**Objetivo:** Analizar el efecto de metformina sobre la abundancia relativa de bacterias de la microbiota intestinal *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*, *Bacteroides spp*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli* y *Clostridioides Difficile* en un modelo de síndrome metabólico en ratas.

**Metodología:** Modelo SM inducido con sacarosa al 30% ad libitum/16 semanas, tratado con metformina 200 mg/kg /8 semanas. *Análisis:* Heces: purificación de ADN genómico bacteriano y PCR cuantitativo. Amplificación del gen 16S de ARN ribosomal como estándar de abundancia relativa.

**Resultados:** Se observaron tendencias de cambio sobre la colonización, específicamente disminución de bacterias del género *Lactobacillus spp* y *Faecalibacterium Prausnitzii*.

**Conclusión:** No se observaron cambios significativos sobre la MI durante el padecimiento de SM en este modelo murino, sin embargo, la administración de metformina promueve tendencias de cambio en la colonización de especies considerados en este estudio.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1 Síndrome metabólico	5
2.1.2 Dieta y síndrome metabólico	7
2.3 Microbiota intestinal y síndrome metabólico	9
2.4 Metformina y síndrome metabólico	11
2.6 Especies y géneros bacterianos	12
2.7 Homeostasis de la microbiota intestinal	14
2.8 Microbiota intestinal y Metformina	17
2.9 Gen ribosomal ARN 16S	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
a. General	22
b. Específicos	22
<b>6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>23</b>
6.1 PCR	23

6.1.2 PCR cuantitativa	25
a. Diseño del estudio	27
b. Universo de trabajo de la muestra	27
c. Instrumento de investigación	27
d. Desarrollo del proyecto	30
e. Diseño del análisis estadístico	34
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>55</b>
<b>11. LITERATURA CITADA</b>	<b>56</b>

**ABREVIATURAS**

<b>MI</b>	Microbiota intestinal
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>MET</b>	Metformina
<b>ECNT</b>	Enfermedades crónicas no transmisibles
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DM2</b>	Diabetes tipo 2
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>BIFIDO</b>	Bifidobacterium spp
<b>LACTO</b>	Lactobacillus spp
<b>FAECALI</b>	Faecalibacterium Prausnitzii
<b>CDIFF</b>	Clostridioides Difficile
<b>ECOLI</b>	Escherichia Coli
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>PCR</b>	Reacción de la cadena de polimerasa
<b>NADH</b>	dinucleótido de nicotinamida y adenina

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterios diagnósticos para SM.	7
<b>Tabla 2.</b> Características y clasificación de las bacterias contempladas en este estudio.	13
<b>Tabla 3.</b> Efecto de la MET sobre la microbiota intestinal.	16
<b>Tabla 4.</b> Etapas de la PCR punto final.	24
<b>Tabla 5.</b> Información nutrimental del pellet Autoclavable Rodent Diet 5010 LabDiet®	28
<b>Tabla 6.</b> Diseño de primers y temperatura de Hibridación.	29
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de la corrida de qPCR.	29
<b>Tabla 8.</b> Lista de ratas y grupo asignado.	31



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de las etapas de la PCR.	25
<b>Figura 2.</b> Representación de las etapas en un ciclo de la qPCR.	26
<b>Figura 3.</b> Cambios en la abundancia relativa del gen de <i>Lactobacillus spp.</i>	36
<b>Figura 4.</b> Cambios en la abundancia relativa del gen de <i>Bifidobacterium spp.</i>	37
<b>Figura 5.</b> Cambios en abundancia relativa del gen de <i>Faecalibacterium Prausnitzii.</i>	38
	39
<b>Figura 6.</b> Cambios en la abundancia relativa del gen de <i>Bacteroides spp.</i>	
<b>Figura 7.</b> Cambios en la abundancia relativa del gen de <i>Escherichia coli.</i>	40
<b>Figura 8.</b> Cambios en abundancia relativa del gen de <i>Clostridioides Difficile.</i>	41
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración.	42
<b>Figura 10.</b> Cambios en abundancia relativa en pg de ADN del gen de <i>Lactobacillus spp.</i>	43

**Figura 11.** Cambios en la abundancia relativa en pg de ADN del gen de *Bifidobacterium spp.* 44

**Figura 12.** Cambios en la abundancia relativa en pg de ADN del gen de *Clostridioides Difficile.* 45

## 1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal (MI) es la comunidad de microorganismos que residen en el tracto gastrointestinal, se ve implicada en procesos del metabolismo nutricional e inmunidad, se ha comprobado que su composición varía en cada individuo de acuerdo a factores genéticos, dieta, consumo de fármacos, etapa de la vida y otros aspectos del entorno [1], por lo tanto la colonización de la MI de cada individuo estará definida de acuerdo a sus hábitos alimentarios y de estilo de vida. Previamente se ha evidenciado la existencia de cambios sobre la colonización de especies bacterianas residentes en individuos que presentan obesidad [2], el cual es un padecimiento que se posiciona como un factor clave en la aparición y desarrollo de Síndrome metabólico (SM).

La aparición de técnicas de secuenciación ha permitido describir la composición de la comunidad bacteriana que habita el tracto gastrointestinal, la mayoría de los miembros de esta amplia comunidad pertenecen al dominio *Bacteria*, entre los géneros que predominan se encuentran: *Bacteroides*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* [1].

Especies del género *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp* y *Faecalibacterium Prausnitzii* han sido caracterizadas como bacterias que confieren un efecto benéfico sobre la salud del huésped, sin embargo, existen géneros o especies que ejercen un efecto contrario, promoviendo la aparición de enfermedades, tal es el caso de la especie *Clostridiodes Difficile* la cual se ha reportado responsable de cuadros patológicos como colitis pseudomembranosa y diarrea, también se conoce que algunas especies de *Escherichia* podrían ser potencialmente patógenas [3], por lo que una mayor colonización de estas especies promoverá un estado intestinal patológico, que a su vez influirá en el estado homeostático general del hospedero, esto resulta importante debido

a que existe relación entre la colonización de la MI y diversos factores como lo son la alimentación, la etapa de la vida en la que se encuentra un individuo, su estado de salud y consumo de fármacos, lo cual cobra importancia debido a que la MI se relaciona también con el padecimiento y desarrollo del SM, por lo que aquellos organismos que padezcan este síndrome pueden verse mayormente afectados. El SM se define como el conjunto de anormalidades metabólicas que se consideran un factor de riesgo para el desarrollo de algunas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), como la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedades del corazón. Los factores que conforman el SM son de carácter crónico y progresivo lo cual implica que deberán estar presentes un periodo de tiempo prolongado y deberán realizarse medidas de intervención que atenúen su padecimiento, entre estas medidas se encuentran los cambios en el estilo de vida y alimentación la administración de fármacos en aquellos casos en los que no es suficiente con dichas medidas. Uno de los fármacos recetados con mayor frecuencia para el tratamiento de DM es la metformina (MET), sin embargo, se ha prescrito también para tratar el SM pues existe evidencia que apunta que su administración induce una mejora sobre los parámetros bioquímicos de aquellos individuos que padecen dicho síndrome[4].

Debido a su relativa seguridad y bajo costo la MET es el fármaco mayormente prescrito como tratamiento de control de la glucosa periférica basal y posprandial, se ha reportado que es capaz de inducir cambios sobre la colonización de la MI, estos cambios podrían contribuir en su efecto antidiabético [5]. Estudios realizados en modelos de síndrome metabólico en ratones han reportado que la dicho fármaco induce un aumento de

bacterias del género *Bifidobacterium spp*, la cuales se considera que ejercen un efecto benéfico sobre la salud del huésped, sin embargo, también se reportó un aumento de bacterias que se considera ejercen un efecto patógeno sobre el estado de salud, tal es el caso de la especie *Escherichia Coli* [5], la cual a pesar de ser una bacteria que forma parte de la MI común, existen cepas que pueden ejecutar un efecto patógeno produciendo diferentes cuadros clínicos de diarrea [6], por lo tanto el monitoreo de la colonización de bacterias patógenas que colonizan la MI juega un papel importante sobre la salud de cada individuo que recibe tratamiento de MET, también existen otras bacterias que se consideran patógenas, tal es el caso de la especie *Clostridiodes Difficile*, que es responsable de la producción de dos tipos de toxinas las cuales se denominan tipo A y B, se ha reportado que están involucradas con el desarrollo de un estado de inflamación crónica conocido como endotoxemia [7], este padecimiento podría estar involucrado en la patogénesis de la resistencia a la insulina (RI) [8], el cual se posiciona como un factor importante en el padecimiento de SM.

En este estudio se procedió a realizar el análisis del efecto que puede ejercer la metformina sobre la MI en modelo de SM en ratas, dicho modelo fue generado mediante una dieta alta en sacarosa y fueron analizados 3 géneros y 3 especies de bacterias.

## 2. ANTECEDENTES

La obesidad y el SM se han convertido en problema importante de salud pública a nivel mundial, por lo tanto el interés por su investigación ha ido incrementando pues se han establecido como factores de riesgo importantes para el desarrollo de las ECNT, como lo son la enfermedad arterial coronaria-cerebrovascular y la DM [9], que hoy se posicionan como las principales causas de muerte en México, específicamente primera y segunda causa respectivamente, de acuerdo con el panorama epidemiológico de salud emitido en 2019 por la secretaría de salud. Con el paso del tiempo se han manifestado cambios trascendentes en el comportamiento epidemiológico de las enfermedades, esto aunado a los cambios ambientales, demográficos, económicos, sociales, culturales y a los avances en el campo de la atención a la salud han influenciado el perfil epidemiológico en la población mexicana [9].

De acuerdo con la OMS, cada año 2.8 millones de personas mueren por sobrepeso u obesidad y en nuestro país se les atribuyen más de 50 mil muertes por año. En los últimos 30 años la prevalencia de obesidad en México ha incrementado de manera acelerada, esto ha llevado a nuestro país a ocupar actualmente el segundo lugar en obesidad en adultos y el primero en población infantil [11][12], de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 de Medio Camino (Ensanut), la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños de cinco a once años es de 33.2% (3 de cada 10 niños), en adolescentes de 36.3% (4 de cada 10 adolescentes) y en adultos de 72.5 (7 de cada 10 adultos), este padecimiento está asociado con cambios crónicos en el tejido adiposo causados por hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, lo cual conlleva a un desequilibrio en el binomio leptina/adiponectina produciendo inflamación crónica e

interviniendo en funciones metabólicas, propiciando fallas en el sistema cardiovascular [13], por lo tanto, es importante aplicar medidas necesarias de prevención para el padecimiento de SM y ECNT. De acuerdo con la novena edición del Atlas de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) actualizado en 2019, México ocupa el 6to lugar a nivel mundial en padecimientos de DM2 en la población adulta de 20 a 79 años, con un total de 12.8 millones de personas, las cuales necesitarán recibir o actualmente reciben tratamiento farmacológico [78].

La MET se ha posicionado como el tratamiento farmacológico mayormente prescrito para tratar DM e hiperglucemia, e incluso se ha prescrito para tratar algunos otros padecimientos como el SM y sus factores asociados como la obesidad y control del perfil lipídico [4] [14], debido a esto es importante estudiar a fondo el impacto que ejerce sobre la MI, pues se sabe que interviene en diversos procesos metabólicos e inmunológicos, entre los cuales destacan los cambios en la permeabilidad intestinal, endotoxemia, interrelación con ácidos biliares, cambios en la proporción de tejido adiposo pardo y respuesta inmune [15].

## **2.1 Síndrome metabólico**

Se considera un estado fisiopatológico crónico y progresivo, conformado por un grupo de factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, los cuales son: obesidad de distribución central, disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), elevación de las concentraciones de triglicéridos (TGC), aumento de la presión arterial e hiperglucemia. El padecimiento de estos factores dan como resultado dicho síndrome que a su vez funciona como una

herramienta de pronóstico de padecimiento de ECNT y la morbimortalidad cardiovascular [16].

La resistencia a la insulina (RI) y la obesidad han sido reconocidos como el eje central de la fisiopatología del SM, pues su padecimiento a largo plazo favorece la agregación del resto de los componentes del mismo [17].

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la DM, el SM se define como “La constelación de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y antropométricas que ocurren simultáneamente y pueden dar oportunidad o estar ligadas a la resistencia a la insulina, por lo tanto incrementa el riesgo de padecer DM2 , enfermedad cardiovascular o ambas, entre estas anormalidades se encuentran: obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial y dislipidemia” [79] (tabla 1).

Diversas organizaciones han propuesto criterios de diagnóstico para el SM, a continuación se cita un conjunto de criterios unificados los cuales fueron tomados de diferentes organizaciones entre estas la Federación Internacional de Diabetes; Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre; Asociación Americana del Corazón; Federación Mundial del Corazón; Sociedad Internacional de Aterosclerosis; y Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad. Se acordó que la obesidad abdominal no debería ser un requisito previo para el diagnóstico, sino que es uno de los 5 criterios, por lo que la presencia de 3 de los 5 factores de riesgo constituye un diagnóstico de SM [18].



**Tabla 1. Criterios diagnósticos para SM [18].**

<b>Parámetro</b>	<b>Puntos de cohorte categórico</b>
<b>Circunferencia de cintura aumentada</b>	Definiciones específicas de población y país.
<b>Triglicéridos en sangre elevados</b>	≥150 mg/dL
<b>c-HDL reducido</b>	<40 mg/dL en hombres <50 mg/dL en mujeres
<b>Presión arterial elevada</b>	Sistólica ≥ 130 mm Hg Diastólica ≥ 85 mm Hg
<b>Glucosa en ayuno elevada</b>	≥ 100 mg/dL

\*De acuerdo con la secretaría de salud en México los puntos de cohorte son: Hombres >90 cm y mujeres >80 cm.

### **2.1.2 Dieta y Síndrome metabólico**

Actualmente existe evidencia del papel que pueden ejercer los hábitos alimentarios sobre la patogénesis del SM y la obesidad [19][20], el cual es un factor clave en su padecimiento. La obesidad es un estado patológico que resulta en la acumulación de tejido adiposo, las alteraciones moleculares implicadas en esta condición incluyen la capacidad oxidativa mitocondrial alterada, el estado redox celular desregulado y señalización alterada de la insulina, lo cual da como resultado un transporte de glucosa deficiente y una lipólisis desregulada, conduciendo a un metabolismo alterado de los lípidos e hidratos de carbono [21][22] con llevando al padecimiento de obesidad.

Referente al patrón alimentario, algunos estudios han relacionado una mayor ingesta dietética de cereales integrales, es decir, aquellos con un mayor contenido de fibra con una menor prevalencia de SM. Por otro lado, la evidencia es menos consistente para el consumo de granos refinados, es decir, aquellos que poseen un menor contenido de fibra, además han sido asociados positivamente con SM [23]–[26], consumo de frutas y verduras también se ha asociado con un menor riesgo de SM [27], es importante mencionar que la ingesta de refrescos y bebidas azucaradas ha sido asociada positivamente con SM [28], [29].

Los cambios en el patrón alimentario anteriormente mencionados, el sedentarismo y el constante cambio en el estilo de vida que conlleva al aumento de un ambiente obesogénico, aunado a la constante demanda y disponibilidad de alimentos no saludables, han generado como resultado un aumento del riesgo de padecer SM.

### **2.3 Microbiota intestinal y síndrome metabólico**

Actualmente se ha logrado reportar la existencia de un vínculo entre la colonización de la MI y el padecimiento SM, esto ha derivado de estudios desarrollados en grupos de individuos o ratones que padecen obesidad, al realizar la caracterización de la MI por medio del análisis del genoma intestinal aplicando métodos de secuenciación masiva. Un estudio pionero en informar la existencia de dicha relación fue elaborado por Turnbaugh y colaboradores [30], en el cual se reportó una disminución del 50% en la abundancia relativa del filo *Bacteroidetes* y un aumento proporcional del filo *Firmicutes* en ratones que padecían obesidad. Con el paso del tiempo otros estudios han reportado

resultados similares a estos [31]–[34], por lo tanto, se ha dado lugar a un modelo de MI característico del padecimiento de obesidad y SM, en el cual se propone que el perfil presenta un aumento en la abundancia relativa de especies bacterianas pertinentes al filo *Firmicutes* y una disminución en el filo *Bacteroidetes*, sin embargo, es importante mencionar que existe una gran variabilidad en los resultados, lo cual no permite establecer un perfil bacteriano completamente certero de este padecimiento, nuevamente, esto se debe a la existencia de múltiples factores que intervienen en la colonización de la MI, lo cual resulta complicado a la hora de controlar estas variables en los grupos de estudio.

La importancia de los cambios en la MI radica en la influencia que ejerce sobre la recolección de energía, lo cual podría intervenir en el equilibrio energético conduciendo al padecimiento de obesidad. Turnbaugh y colaboradores reportaron esto al demostrar que la MI de ratones con obesidad era más eficiente para recolectar energía, lograron comprobarlo al realizar trasplante fecal de ratones obesos a ratones libres de gérmenes, posterior al trasplante aquellos ratones con una MI previa libre de gérmenes presentaron un aumento de peso [35], lo cual significa que la MI está fuertemente implicada en la patogénesis de la obesidad.

## **2.4 Metformina y síndrome metabólico**

La MET forma parte de la familia de las biguanidas, un grupo de medicamentos derivado de *Galega officinalis*, planta que ha sido usada desde la época medieval para el tratamiento de diabetes mellitus, se introdujo a finales de la década de 1950

prescribiéndose como tratamiento de elección de la DM2 [36], a lo largo de más de 50 años de administración se ha convertido en el antidiabético oral recetado con mayor frecuencia en México y nivel mundial, formando parte del esquema básico de tratamiento [37], cabe mencionar que su administración no se ha limitado al tratamiento de SM y obesidad, también ha sido aplicada como tratamiento contra el cáncer.

Un estudio realizado en grupo de individuos con padecimiento de SM reportó que el tratamiento con MET indujo cambios favorables sobre su perfil bioquímico al generar aumento del colesterol c-HDL, disminución de glucosa basal y una disminución del colesterol c-LDL, por lo que la incidencia de DM2 disminuyó considerablemente, conllevando una reducción de riesgo cardiovascular y padecimiento de ECNT [4].

El mecanismo exacto por el que la MET funciona aún no se ha esclarecido; sin embargo, se conoce que su efecto ocurre por la inhibición en la cadena respiratoria, específicamente en el complejo I, sin afectar a los demás complejos, esto induce disminución en la oxidación del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) interviniendo en el paso de los protones a través de la membrana interna de la mitocondria y del índice de consumo de oxígeno, todo esto lleva a la reducción del gradiente de protones y por último, a la regulación de la síntesis de ATP a partir de ADP, con lo cual se estimula la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), la cual funciona como un sensor regulatorio del balance energético intracelular [38], AMPK activa cambia a las células de un estado anabólico a uno catabólico, cerrando las vías de consumo de ATP y restaurando el equilibrio energético. Como resultado de esta activación, AMPK es capaz de regular las síntesis de glucosa, lípidos y proteínas, así como el crecimiento

celular, mientras que se estimula la oxidación de ácidos grasos y el consumo de glucosa [37].

## **2.5 Colonización de la Microbiota intestinal**

El tracto intestinal humano contiene un grupo único de microorganismos denominado microbiota intestinal (MI) que se conforma de numerosas bacterias, se ha estimado que son más de 1,000 especies diferentes, principalmente bacterias anaerobias. En los últimos años diversas técnicas de secuenciación de alto rendimiento y amplificación de genes han permitido comprender su diversidad [39]. La MI comparte una relación de tipo simbiótica con el huésped, esta a su vez se subdivide en tres tipos de interacciones las cuales son: a) mutualismo: cuando ambos organismos se ven beneficiados, b) comensalismo, cuando un solo organismos se ve beneficiado sin afectar al otro, y c) parasitismo implica que un organismo se ve beneficiado a expensas del bienestar del otro. Las bacterias presentes en nuestro organismo se consideran a menudo comensales y mutualistas, aunque existen también bacterias consideradas como microorganismos oportunistas que ejercen una relación de tipo parasitismo, esto quiere decir que dichos microorganismos logran colonizar en condiciones que les son favorables, por ejemplo, durante la inmunosupresión logrando ejecutar su potencial patógeno, las bacterias con esta capacidad son consideradas como “patobiontes”, por otro lado, los denominados “simbiontes” son aquellas especies con efecto contrario al efecto de los patobiontes, es decir, un efecto benéfico [40].

Cada individuo posee un MI autóctona que difiere entre otros individuos, para comprender el análisis de esta diversidad en la colonización es necesario considerar el entorno y otros factores del estilo de vida del huésped, principalmente la dieta, edad, estado fisiológico y consumo de fármacos [41], por lo tanto, la relación existente entre la MI, la salud y la enfermedad se relaciona con los diferentes patrones alimentarios, dado que las bacterias se especializan en la fermentación de sustratos específicos, las dietas pueden proporcionar un factor de crecimiento e inhibición para cada especie, filo o género característico, colocando este aspecto como un contribuyente del beneficio implicado para la salud [42]. Cuando se altera el ecosistema microbiano pueden colonizar diferentes bacterias que en situación normal no son predominantes, lo que desencadena un estado que con mayor frecuencia es de carácter patológico, el término “disbiosis” hace referencia a este desequilibrio de la homeostasis bacteriana. Numerosos estudios realizados en modelos animales, han demostrado que la MI podría considerarse como un factor importante en el desarrollo de la obesidad [39], patología de interés, pues representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial debido a su estrecha relación con la aparición de SM y ECNT.

## **2.6 Especies y géneros bacterianos**

A continuación se muestra una tabla donde se menciona el tipo de relación que comparte con el ser humano el género o especie de bacteria contemplados en este estudio.

**Tabla 2. Características y clasificación de las bacterias contempladas en este estudio.**

	<b>Clasificación</b>	<b>Nicho ecológico</b>	<b>Tipo de relación con humanos</b>
Género <i>Bifidobacterium spp</i>	Filo: <i>Actinobacterias</i> Familia: <i>Bifidobacteriaceae</i>	Tracto intestinal y cavidad bucal en humanos, mamíferos, aves e insectos, así como aguas residuales [43] [44].	mutualismo
Género <i>Lactobacillus spp</i>	Filo: <i>Firmicutes</i> Familia: <i>Lactobacillaceae</i>	Tracto intestinal y cavidad vaginal en humanos, y ciertos alimentos como carne, leche y algunas plantas. [45] [46]	mutualismo
Género <i>Bacteroides spp</i>	Filo: <i>Bacteroidetes</i> Familia: <i>Bacteroidaceae</i>	Tracto intestinal humano. [47] [48].	mutualismo
Especie <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Filo: <i>Firmicutes</i> Género: <i>Faecalibacterium</i> Familia: <i>Ruminococcaceae</i>	Tracto intestinal, tracto urogenital, tracto respiratorio superior y boca de humanos y algunos animales [49] [50][51].	mutualismo
Especie <i>Escherichia coli</i>	Filo: <i>Proteobacteria</i> Género: <i>Escherichia</i> Familia: <i>Enterobacteriaceae</i>	Tracto intestinal humano (principalmente intestino delgado y grueso) [6] [52].	Generalmente ejerce una relación de tipo mutualista, sin embargo, algunas cepas pueden ejercer un efecto patógeno.
Especie <i>Clostridioides difficile</i> (anteriormente <i>Clostridium difficile</i> )	Filo: <i>Firmicutes</i> Género: <i>Clostridioides</i> Familia: <i>clostridiaceae</i>	Intestino de una pequeña proporción de individuos sanos y superficies en hospitales. [53] [54],	Parasitismo ( de tipo oportunista)

## 2.7 Homeostasis de la microbiota intestinal

El microbioma intestinal es ampliamente diverso, pues alberga aproximadamente 1,000 especies bacterianas diferentes, principalmente bacterias anaerobias [2], se ha sugerido que los individuos adultos sanos comparten afinidad de especies abundantes en la colonización de su MI, por ejemplo, *E coli* puede aislarse de la mayoría de las personas, sin embargo, estudios de secuenciación han demostrado una diversidad enorme entre individuos [55]. LA MI está conformada por dos principales filos bacterianos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, representando un 23% y un 64% respectivamente, de la colonización total, seguidos por el filo *Actinobacteria* que comprende cerca del 3% [50][2]. El primer filo mencionado está conformado por una gran cantidad de géneros bacterianos, entre los más importantes se posicionan *Clostridium* y *Lactobacillus spp*, el segundo filo mencionado incluye bacterias que pertenecen al género *Bacteroides spp* y *Prevotella*, y el género bacteriano más importante del tercer filo mencionado es *Bifidobacterium spp* [56].

No existe una definición certera de la colonización de la MI, a grandes rasgos se ha propuesto lo anteriormente mencionado, sin embargo, no debe olvidarse el hecho de que la MI se encuentra en constante cambio, el cual estará mediado por diversos factores, principalmente los hábitos alimentarios y el estado fisiológico del individuo.

## 2.8 Microbiota intestinal y metformina

Evidencia reciente ha sugerido que la MI es un sitio de acción importante para la MET, por lo tanto actúa como mediador de sus efectos antidiabéticos, estudios han



demostrado que su administración farmacológica induce cambios sobre la colonización de especies de la MI, un modelo de estudio de SM en roedores generado mediante dieta alta en grasa e hidratos de carbono reportó un aumento significativo del filo *Bacteroidetes* posterior al tratamiento con metformina sobre una colonización inicial conformada principalmente por bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* [57], por lo tanto, este estudio contribuye a la evidencia sobre la existencia de un vínculo entre la MI y la MET, sin embargo, es importante mencionar que dichos estudios fueron realizados en modelos de dieta alta en grasa e hidratos de carbono, lo cual deriva en la necesidad de investigar los efectos que ejerce sobre un modelo de estudio generado con una dieta alta en un solo macronutriente, pues es bien sabido que la dieta juega un papel decisivo sobre la colonización de especies predominantes en la MI. A continuación, se muestra una tabla con referencias y resultados obtenidos en diversos estudios realizados en los cuales se sometió a diferentes grupos de individuos a un tipo de dieta determinado para observar el efecto que ejerció sobre la colonización de la MI.

**Tabla 3.** Efecto de la MET sobre la microbiota intestinal.

Referencia	Condiciones del estudio	Resultado
<b>Wu (2017)</b> [5]	Muestras de ADN fecal de individuos con diagnóstico reciente de DM2 que no recibieron un tratamiento previo, asignados de manera aleatoria en dos grupos de los cuales uno recibió tratamiento con MET,  Administración de metformina durante 4 meses (1,700 mg/día.)	En el grupo tratado con metformina reportó un enriquecimiento de <i>Bifidobacterium</i> y de algunos patógenos oportunistas, entre estos <i>E. Coli</i> .
<b>Lee (2014)</b> [7]	Muestras de heces de ratones C57BL sometidos a dieta alta en grasa (HFD) y dieta normal (ND) durante 28 semanas para inducir SM (dieta con 60% Lípidos).  Administración de metformina durante 10 semanas posterior al período de inducción de SM (300mg/kg/día)	Se observó una disminución de la diversidad bacteriana durante el tratamiento con HFD, específicamente el filo <i>bacteroidetes</i> , sin embargo, la composición de este filo incrementó después de la administración de metformina.
<b>Wang (2019)</b> [58]	Muestras de heces de ratones C57BL y ratones BKSLeprdb (homocigotos para la mutación espontánea de diabetes), de los cuales se generó 4 grupos: control sano, DM2 sin tratamiento, grupo DM2 tratado con metformina y grupo DM2 tratado con berberina, los 4 grupos fueron alimentados con dieta normal.  -Administración de berberina o metformina durante 10 semanas (113,75 mg / kg/día).	Se reportó un aumento de los géneros <i>Lactobacillus</i> en el grupo tratado y metformina.
<b>Forslund (2015)</b> [59]	Se utilizó un conjunto de datos metagenómicos de DM2 de 3 países: cohorte Danesa, Sueca y China. Se realizó un análisis multivariado el cual mostró diferencias en la composición taxonómica intestinal entre pacientes con DM2 tratados con metformina, pacientes con DM2 no tratados con metformina y controles no diabéticos.	Se reportó un aumento significativo de <i>Escherichia</i> spp en el grupo de pacientes con DM2 tratados con metformina.

<b>Zhang (2019)</b> [60]	Muestras de heces de ratas Zucker macho las cuales son obesas genéticamente, fueron sometidas a un periodo de inducción de DM2 con dieta Purina 5008 (16.7% grasa, 26.8% proteína y 56. % HC) durante 4 semanas. Fueron divididas en 4 grupos, un grupo control, grupo metformina, grupo acarbosa y grupo sitagliptina, los cuales recibieron administración del fármaco correspondiente. .  El grupo administrado con metformina recibió 215.15mg/kg/día durante 4 semanas.	Se reportó una mayor colonización del género <i>Lactobacillus spp</i> en el grupo tratado con metformina. También, se observó una disminución en el filo <i>Proteobacteria</i> .
-----------------------------	--	--

## 2.9 Gen Ribosomal ARN 16S

Anteriormente el estudio de la MI comprendía su siembra en cultivos bacterianos para poder aislarlos e identificarlos a partir del tipo de estructura celular y de sus propiedades fisiológicas, mediante técnicas de observación, tinciones y utilización de diferentes sustratos, por lo tanto resulta imprescindible que los organismos presentes en la muestra de partida se multipliquen en los medios de aislamiento inicial, sin embargo, muchos microorganismos son anaerobios estrictos lo que resulta en su muerte con solo trazas de oxígeno, por ejemplo, durante la toma de muestra. El término “metagenómica” se define como el estudio del material genético de las muestras recuperadas directamente de un determinado nicho ecológico, posteriormente surgió el uso de técnicas genotípicas de identificación, de manera que la finalidad será obtener el material genético de los microorganismos presentes sin importar que mueran por el contacto con oxígeno pues los cadáveres aún albergan su composición genética en este caso el trabajo se centra en el estudio de determinados genes que son universales en un grupo microbiano y cuya secuencia aparece conservada en las distintas especies del grupo, en dichos genes existen variaciones que permiten diferenciar a una especie de otra, de manera que si se

determina la secuencia de un determinado gen se podrá identificar una especie concreta, el ejemplo más representativo de gen universal es el correspondiente al 16S de ARN ribosómico (ARNr 16S), que se encuentra en la subunidad menor del ribosoma de la célula bacteriana y no aparece en ningún otro tipo de organismo, para su análisis se extrae el ADN presente en las muestras para amplificar la secuencia correspondiente al ARN 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y poder identificar o cuantificar la presencia de este [41].

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente México se encuentra en la lista de los 10 países con mayor número de personas que viven con DM, también se posiciona entre los países con un alto índice de población que padece obesidad y por consecuencia de padecimientos que componen el SM, lo que conlleva a la patogénesis de otras complicaciones aumentando el riesgo de sufrir infarto al cerebro y miocardio responsabilizándose del 30% de la mortalidad de la población a nivel mundial, por lo que resulta importante estudiar estos factores de riesgo así como su tratamiento farmacológico. La MET se ha consolidado como el tratamiento farmacológico prescrito con mayor frecuencia para tratar el padecimiento de DM2 e incluso el SM, sin embargo, se requieren realizar más estudios para analizar el efecto que este fármaco ejerce principalmente sobre la MI, la cual está fuertemente implicada en procesos de nutrición e inmunidad. Previamente se han realizado algunos estudios en modelos de DM y SM en roedores y humanos los cuales han sido generados por medio de dietas altas en hidratos de carbono y lípidos en conjunto o dietas adaptadas a la zona geográfica y aspectos culturales del grupo de estudio.

En 2015 la OMS publicó una nota informativa sobre la ingesta de azúcares, y recomendó que este consumo no debe sobrepasar el 10% de la ingesta energética, sin embargo, en la población mexicana el 26% del total de la energía consumida por la población proviene de bebidas azucaradas y productos con alto contenido de grasas saturadas y/o azúcares añadidos, lo cual resulta importante estudiar, pues el consumo de estos alimentos se ha vinculado con el padecimiento de obesidad y consecuentemente en el riesgo de padecer SM. También se debe recordar que el patrón alimentario y consumo

de fármacos tiene cierta influencia sobre la homeostasis de la MI, es por eso que este proyecto propone el estudio del impacto que ejerce la administración de MET en un modelo de SM generado por una dieta alta en sacarosa, considerado como un componente relevante en la conducta alimentaria de la población mexicana, con el propósito de conocer los efectos que ejerce este fármaco en durante su administración simultánea al consumo de una dieta alta en sacarosa con la finalidad es aportar conocimiento para diseñar futuras medidas de intervención que impacten favorablemente en el estado de salud.

#### **4. HIPÓTESIS**

La administración de metformina favorecerá el aumento en la colonización de bacterias benéficas, mientras disminuye la colonización de especies que ejercen un efecto patógeno sobre la microbiota intestinal en un modelo de síndrome metabólico en ratas.

## 5. OBJETIVOS

### a. General

Analizar el efecto de la administración de metformina sobre la abundancia relativa de las bacterias de la microbiota intestinal *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*, *Bacteroides spp*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli* y *Clostridioides Difficile* en un modelo de síndrome metabólico en rata generado con una dieta alta en sacarosa.

### b. Específicos

- Obtener un modelo de síndrome metabólico en ratas wistar macho mediante una dieta alta en sacarosa.
- Determinar la presencia de disbiosis intestinal en un modelo de síndrome metabólico en ratas Wistar generado con dieta alta en sacarosa.
- Determinar si la metformina ejerce un efecto sobre la disbiosis intestinal en un modelo de síndrome metabólico en ratas.



## 6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

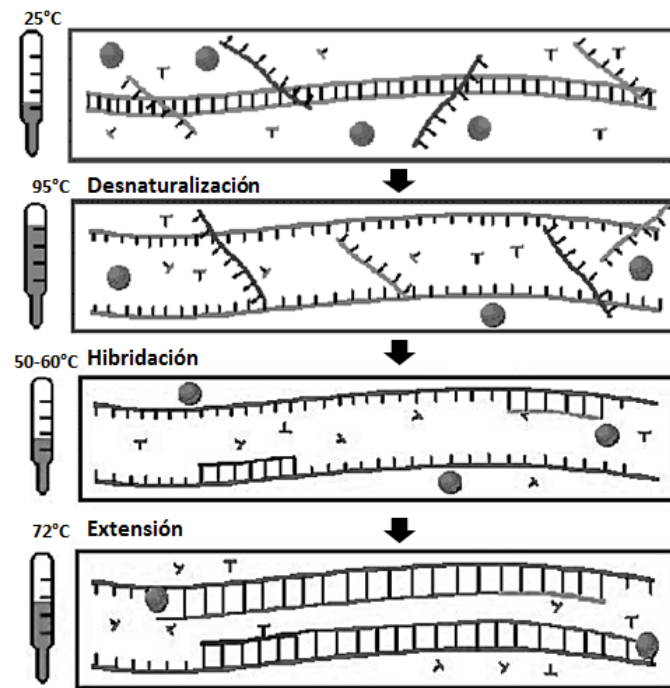
### 2.9 PCR

Es una técnica de biología molecular que permite obtener millones de réplicas de cualquier segmento de ADN si conocemos la secuencia de los nucleótidos que lo limitan, por ejemplo la secuencia del gen ARNr 16S, como se mencionó anteriormente, en este proceso el ADN humano, el de los protozoos y el de los virus no se amplifica porque no poseen el gen del ARNr 16S lo que permite la identificar y cuantificar las bacterias que componen una comunidad [61] [62]. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que durante varios ciclos dependientes de una temperatura y tiempo copia una secuencia específica de ADN, para ello la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células, se realiza la amplificación del ADN en un termociclador, el cual debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de un paso a otro durante cada ciclo. Los elementos importantes en la PCR son el templado o molde (ADN), la enzima polimerasa, se usa con frecuencia Taq Polimerasa (TaqP) debido a su termoestabilidad, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) que son las bases nitrogenadas con los que la TaqP construye las nuevas cadenas de ADN, el ión magnesio que actúa como cofactor enzimático e influye en la especificidad de la reacción, un buffer o solución amortiguadora, agua libre de nucleasas y los primers que son secuencias iniciadoras de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta, generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y se emplean dos secuencias diferentes de primers, una denominada “forward” o sentido

y otra “reverse” o anti sentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la enzima TaqP en dirección 5'-3, la temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición y tamaño., Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales que componen la PCR convencional (también llamada punto final): desnaturalización, hibridación y extensión (figura 1). A continuación en la tabla 2 se muestran las condiciones y fundamento de cada etapa [63].

**Tabla 4. Etapas de la PCR punto final**

<b>Etapas</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Fundamento</b>
Desnaturalización	95 °C durante 20-30 segundos	Las cadenas de ADN son calentadas y separadas
Hibridación	Oscila entre 50 a 60°C	Los primers se alinean hacia el extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para formar el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima.
Extensión	72 °C	La Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones, es decir, un conjunto de copias del gen objetivo.



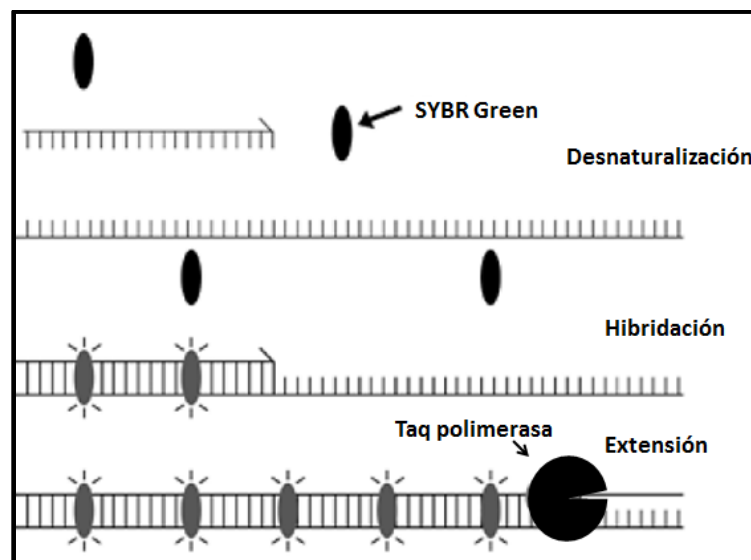
**Figura 1. Representación gráfica de las etapas de la PCR.[64]**

### 2.9.1 PCR cuantitativa

La reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) es un variante de la PCR convencional cuyo objetivo es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de fluoróforos que funcionan como reporteros de fluorescencia en la reacción, el principio de la técnica se basa en la PCR punto final, con una importante diferencia de cómo se detectan y analizan los productos finales. Los reactivos utilizados son los mismos que la PCR punto final, todos incluidos en una solución conocida como "Master mix", también incluye un sistema reportero de fluorescencia, generalmente se utiliza SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena prácticamente no emite fluorescencia, normalmente se realizan corridas con un número

aproximado de 40 ciclos. El tipo de termocilador utilizado para realizar la reacción de la cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) cuenta con un sistema óptico que monitorea la señal de SYBR Green para detectar el producto amplificado, pues la señal de fluorescencia incrementa de manera proporcional a las moléculas de doble cadena producidas en la amplificación, de esta manera se combinan los procesos de amplificación y cuantificación en una sola etapa [65].

El “Threshold point” o ciclo umbral (Ct) es un valor definido para determinar el momento (número de ciclo) en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal y se considera como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo [66], se utiliza este valor como referencia de abundancia de la secuencia del gen destinada a reportar.



**Figura 2. Representación de las etapas en un ciclo de la qPCR. [65]**

### **a. Diseño del estudio**

El presente estudio fue experimental de tipo prospectivo.

### **b. Universo de trabajo y muestra**

Fueron empleadas ratas wistar macho sanas (n=15) de 4 semanas de edad, con un peso de 250 g a 300 g, las cuales se dividieron en tres grupos, fueron adquiridas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, se mantuvieron alojadas en el bioterio de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría en condiciones controladas de temperatura, luz y oscuridad, fueron alimentados con pellet comercial de dieta tipo estándar y agua *ad libitum* durante una semana como periodo de aclimatación. El manejo de las ratas se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y al reglamento interno del bioterio del instituto

### **c. Instrumento de investigación**

#### **Metformina**

Se utilizó metformina marca Glucophage del proveedor Roche®, fueron administrados 200 mg/ kg de peso a cada rata del grupo SM + met, una vez terminado el periodo de inducción de SM.

#### **Dieta**

Fue utilizado el pellet de dieta tipo estándar Autoclavable Rodent Diet 5010 del proveedor LabDiet® (ver información nutrimental en la tabla 5), a su vez se ofreció agua con sacarosa al 30% *ad libitum* a los grupos de SM y SM+MET con la finalidad de

aumentar la ingesta calórica en estos grupos y cambiar la dieta de tipo normal a dieta hipercalórica.

**Tabla 5. Información nutrimental del pellet Autoclavable Rodent Diet 5010 LabDiet®**

<b>Macronutriente</b>	<b>Composición</b> (Ración aproximada: 30 g por día en ratas adulto)
Hidratos de carbono	58,2%
Proteínas	28,6%
Lípidos	13,1%

### **Cuantificación de ADN**

Se realizó la cuantificación de ADN purificado con ayuda del equipo espectrofotómetro nanodrop nd-1000 Thermo Fisher Scientificscientific®.

### **Primers y master mix**

Para realizar la qPCR se utilizó el Master Mix SYBR green Reagent del proveedor Applied BioSystem® y oligonucleótidos forward y reverse de *Escherichia coli*, *Clostridium Difficile*, *Bifidobacterium spp.* y *Bacteroides* y ARN ribosomal 16S del proveedor Applied BioSystem®, y de *Lactobacillus spp.* y *Faecalibacterium prausnitzii* del proveedor T4 Oligo®. En la tabla 6 se muestra el diseño de la secuencia, así como la temperatura de hibridación de dichos primers.

**Tabla 6. Diseño de primers y temperatura de hibridación**

<i>E.coli</i> (340bp,61°C)	F:5'-GTTAATACCTTTGCTCATTGA-3' R: 5'-ACCAGGGTATAATCCTGTT-3'
<i>Clostridium difficile</i> (157bp, 61°C)	F: 5'-TTGAGCGATTTACTTCCGGTAAAGA-3' R: 5'-CCATCCTGTACTGGCTCACCT-3'
<i>Bifidobacterium</i> spp (243bp,58°C)	F:5'-TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG-3' R: 5'-CCACATCCAGC(A/G)TCCAC-3'
<i>Bacteroides</i> (140bp,68°C)	F: 5'-GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT-3' R: 5'-CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC-3'.
<i>Lactobacillus spp</i> ( 341bp, 61°C)	F: 5'AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' R: 5'- CACCGCTACACATGGAG -3'
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (158 bp, 58°C)	F: 5'-CCCTTCAGTGCCGCAGT -3' R: 5'-GTCGCAGGATGTCAAGAC -3'

### Termociclador

El equipo utilizado para realizar la qPCR fue el termociclador Step one 7500 de Applied BioSystem®. En la tabla 7 se observan las condiciones de temperatura y tiempo para la corrida de la qPCR.

**Tabla 7. Condiciones de la corrida de qPCR.**

Paso	Condiciones
Step 1	95°C – 5 min
Step 1	95°C-15 seg
Step 2	50-70°C- 20 seg
Step	72°C – 45 seg
Step	72°C – 5 min

**Glucómetro**

Para realizar la prueba de medición de glucosa basal y curva de tolerancia a la glucosa se utilizó el glucómetro FreeStyle Optium de abbott®.

**Medidor de triglicéridos**

Para realizar la prueba medición de triglicéridos se utilizó el equipo y lancetas Accutrend GCT; del proveedor Roche®.

**d. Desarrollo del proyecto****d1. Distribución de grupos**

Al concluir el periodo de aclimatación de las ratas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos para generar un grupo control n=5 (Ctrl), un grupo que representara un modelo de síndrome metabólico (SM n= 5) y un grupo representativo de síndrome metabólico que será tratado con metformina (SM+Met n=5). Los grupos se nombraron y clasificaron como se muestra en la siguiente tabla.



**Tabla 8. Lista de ratas y grupo asignado.**

	<b>Rata</b>	<b>Grupo</b>
1	18 C1	Control
2	18 C2	Control
3	18 C3	Control
4	18 C4	Control
5	18 C5	Control
6	18 S1	Sacarosa
7	18 S2	Sacarosa
8	18 S3	Sacarosa
9	18 S4	Sacarosa
10	18 S5	Sacarosa
11	18 M1	Sacarosa + Metformina
12	18 M2	Sacarosa + Metformina
13	18 M3	Sacarosa + Metformina
14	18 M4	Sacarosa + Metformina
15	18 M5	Sacarosa + Metformina

## **d2. Dieta alta en sacarosa**

Previo al comienzo de la dieta alta en sacarosa se procedió a realizar medición de peso, triglicéridos, glucosa basal y curva de tolerancia a la glucosa e insulina. Se ofreció pellet de dieta estándar, de la cual se mencionó anteriormente el aporte nutrimental en la tabla 4, a su vez, se ofreció agua *ad libitum* para los 3 grupos, aunque a diferencia del grupo control a los grupos SM y SM+MET le fue añadida sacarosa al 30% con la finalidad de implementar una dieta de tipo hipercalórico, este modelo de dieta alta en sacarosa se mantuvo durante 16 semanas, pues de acuerdo a estudios realizados en laboratorio de nutrición experimental del Instituto Nacional de Pediatría, se ha comprobado su efectividad para generar SM [67], sin embargo, durante la semana número 16 fueron

medidos los parámetros de triglicéridos, glucosa basal y curva de tolerancia a la glucosa e insulina, y peso para confirmar la veracidad del modelo.

### **d3. Tratamiento con metformina**

Al finalizar la semana número 16 de administración de sacarosa en el agua para beber se procedió administrar durante 8 semanas el tratamiento con metformina al grupo Sac+met, se administraron 200 mg por kilogramo de peso por vía oral mediante una cánula, mientras los dos grupos restantes continuaron el periodo temporal con tratamiento con sacarosa en agua para beber hasta el momento del sacrificio durante la semana número 25.

### **d4. Obtención de muestras biológicas**

Una vez terminado el periodo de tratamiento con metformina se llevó a cabo la eutanasia de los animales de experimentación por medio de sobredosis de pentobarbital sódico (PiSA®) vía intraperitoneal (50 mg/kg), posterior al sacrificio se realizó extracción del intestino delgado con ayuda de material quirúrgico adecuado, se colocó en solución salina para retirar cuidadosamente las heces y depositarlas en microtubos de 1.5 ml previamente etiquetados para ser colocados inmediatamente en nitrógeno líquido con la finalidad de preservar su integridad y transportar para su almacenamiento a -70°C hasta el momento de su utilización.

Fueron recolectadas un total de 14 muestras ya que hubo un deceso de una rata perteneciente al grupo SM+MET, lo cual imposibilitó la toma de muestra al finalizar el periodo de tratamiento.

**d4. Extracción de ADN genómico fecal**

Se pesaron 180-220 mg de heces fecales en un microtubo de 2 ml y se realizó extracción y purificación del ADN genómico de acuerdo al protocolo del kit: “Kit DNA Stool mini (50)” del proveedor QIAGEN. Una vez obtenido el ADN se almacenó en microtubos de 1.5 ml a -20°C.

**d5. Cuantificación y dilución del ADN**

Se procedió a cuantificar la muestra en un espectrofotómetro y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para hacer diluciones en agua libre de nucleasas y almacenar en alícuotas de 20 µl a -20°C para su posterior uso.

**d6. qPCR**

Para realizar qPCR se utilizó el Master Mix SYBR Green del proveedor ThermoFisher Scientific®, agua libre de nucleasas, y los primers forward-reverse de cada bacteria. Los datos sobre condiciones de temperatura, tiempo fueron consultados en un estudio previo [68] y sometidos a una prueba de estandarización.

Se usaron placas de 96 pozos Applied Biosystems®, se añadió a cada pozo 1 µl de ADN, 5 µl de Master Mix SYBR Green®, 1µl de primer forward, 1µl de primer reverse y 2 µl de agua libre de nucleasas, para obtener un volumen final de 10 µl. Se cargaron muestras por duplicado y control negativo. La corrida consistió de 40 ciclos.

La eficiencia de la reacción de la PCR se calculó utilizando una “curva estándar” la cual es generada realizando amplificaciones a partir de diluciones seriadas del ADN

genómico de cada bacteria con una concentración conocida, se realizaron 5 diluciones con una las siguientes concentraciones: 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 ug/uL, cada una fue cargada por duplicado.

#### **d7. Análisis estadístico**

Se utilizó el valor del umbral de ciclo (Ct) para referenciar la expresión del gen estudiado y por lo tanto establecer la abundancia de dicha especie o género bacteriano, este valor se comparó contra el Ct del gen ARN 16S el cual representa la abundancia total de bacterias presentes en la muestra de heces fecales estudiada.

También se realizó el análisis correspondiente para identificar la abundancia relativa de cada género o especie en función de la curva de calibración o eficiencia de la reacción.

#### **e. Diseño del análisis estadístico**

Se realizó una prueba U Mann-Withney con un intervalo de confianza del 95% y se consideró significancia estadística cuando  $p < 0,05$ . Fueron empleados una hoja de cálculo de Microsoft Excel y el software estadístico GraphPad Prism versión 5.

## 7. RESULTADOS

### Evaluación del modelo de Síndrome metabólico.

**Tabla 9. Características del modelo.**

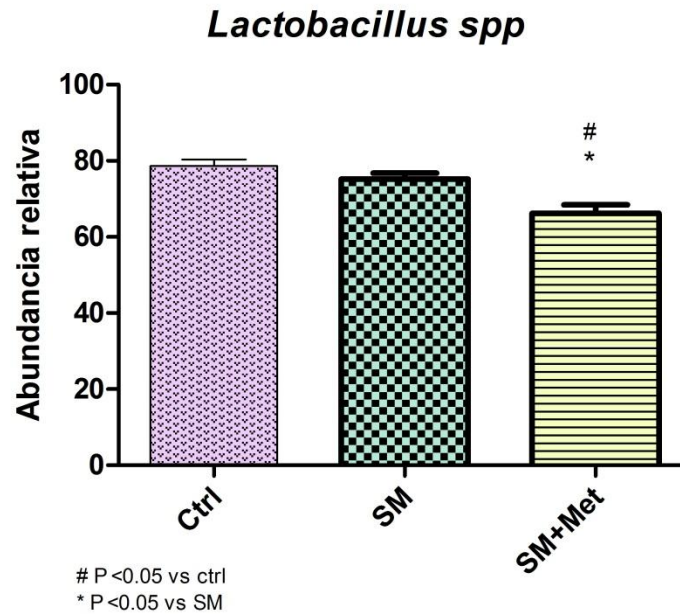
Ratas wistar macho alimentadas con sacarosa al 30% en agua su para beber y alimento estándar durante 16 semanas. Prueba t de student, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .

Grupo	Peso 1	Peso 2	P	Glucosa 1	Glucosa 2	P	Triglicéridos 1	Triglicéridos 2	P
Sac n= 5	312 ± 60.99	670 ± 151.16	0.007*	92 ± 12.55	129.80 ± 14.85	0*	218.80 ± 42.88	379.60 ± 55.45	0.001*
Sac + Met n= 4	347.50 ± 117.01	675 ± 181.38	0.022*	77 ± 6.78	78 ± 7.74	0.514	292 ± 66.19	254.25 ± 68.49	0.538
Ctrl n= 5	328 ± 106.16	642 ± 73.95	0.001*	68.40 ± 7.40	73.80 ± 13.71	0.356	111.80 ± 66.88	174.00 ± 179.43	0.187

## Cambios sobre la MI en SM y efecto de la metformina

### Figura 3. Cambios en la abundancia relativa del gen de *Lactobacillus spp.*

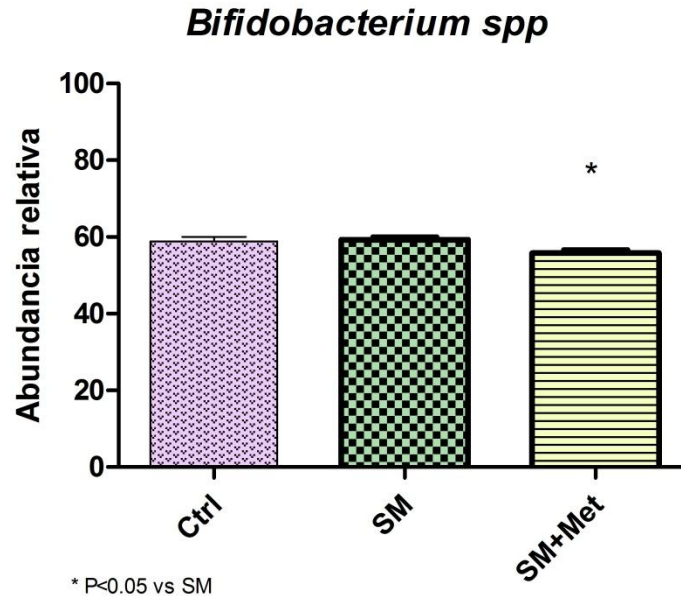
Se muestra la abundancia del género *Lactobacillus spp* en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 3 se puede observar que no hubo cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes del género *Lactobacillus spp* al comparar los grupos Ctrl y SM, sin embargo, los valores de la expresión para el grupo que recibió metformina, SM+Met fue significativamente menor comparado con los grupos SM o Ctrl.

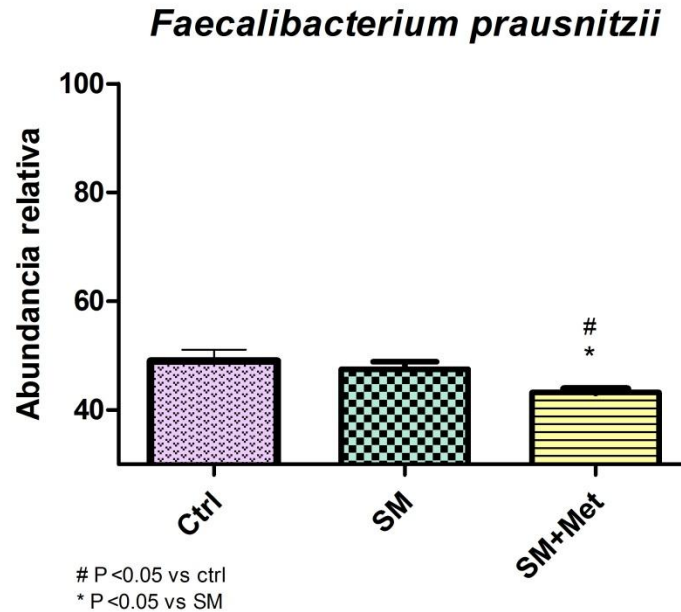
**Figura 4. Cambios en la abundancia relativa del gen de *Bifidobacterium spp.***

Se muestra la abundancia del género *Bifidobacterium spp* en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 4 se observa que no hubo cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes del género *Bifidobacterium spp* al comparar los grupos Ctrl y SM, sin embargo, los valores de la expresión para el grupo que recibió metformina, SM+Met fue significativamente menor que el grupo SM.

**Figura 5. Cambios en abundancia relativa del gen de *Faecalibacterium Prausnitzii*.** Se muestra la abundancia de la especie *Faecalibacterium Prausnitzii* spp en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .

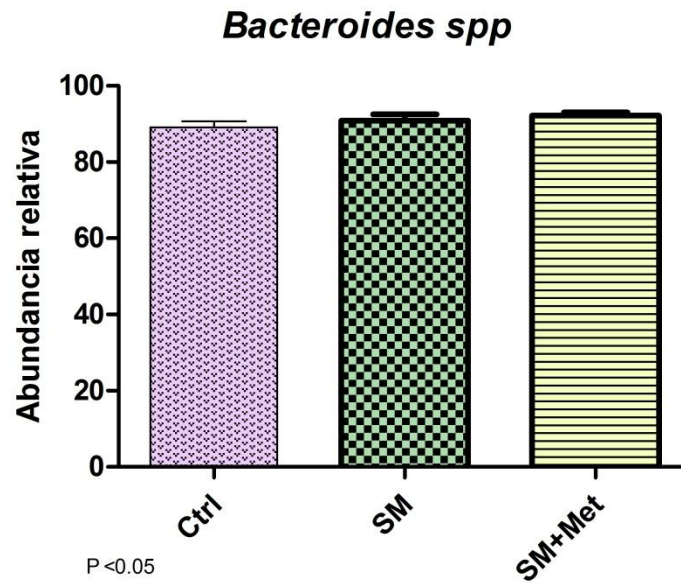


De acuerdo a la figura 5 no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes de la especie *Faecalibacterium Prausnitzii* al comparar los grupos grupos Ctrl y SM, sin embargo, se observa que los valores de la expresión para el grupo que recibió metformina, SM+MET fue significativamente menor que el grupo SM o Control.



**Figura 6. Cambios en la abundancia relativa del gen de *Bacteroides spp.***

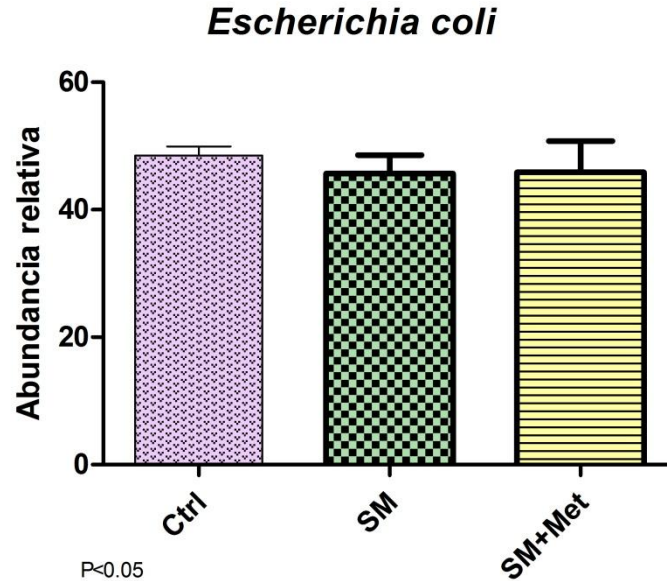
Se muestra la abundancia del género *Bacteroides spp* en en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 6 se puede observar que no hubo cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes del género *Bacteroides spp* entre los tres grupos de estudio, sin embargo, se puede observar una sutil tendencia de aumento del valor de genes expresados para el grupo que recibió metformina, SM+Met.

**Figura 7. Cambios en la abundancia relativa del gen de *Escherichia coli*.**

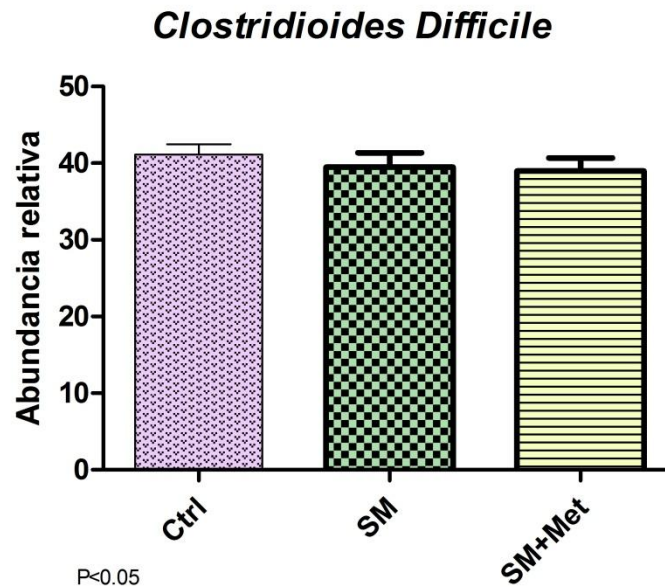
Se muestra la abundancia de la especie *Escherichia coli* spp en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Whitney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 7 se puede observar que no hubo cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes de la especie *Escherichia coli* entre los tres grupos de estudio, sin embargo, aunque la abundancia es menor en el grupo de síndrome metabólico sin tratamiento con metformina y el grupo de síndrome metabólico que recibió metformina, SM y SM+Met respectivamente, la administración de metformina no induce cambio alguno sobre esta especie bacteriana en ratas con SM.

**Figura 8. Cambios en abundancia relativa del gen de *Clostridioides difficile*.**

Se muestra la abundancia de la especie *Clostridioides difficile* spp en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 8 se puede observar que no hubo cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes de la especie *Clostridioides difficile* entre los tres grupos de estudio, sin embargo, aunque la abundancia es menor en los grupos de síndrome metabólico sin tratamiento con metformina y el grupo de síndrome metabólico que recibió metformina, SM y SM+Met respectivamente, se puede observar que no hay cambios en el valor de genes expresados entre ambos grupos.

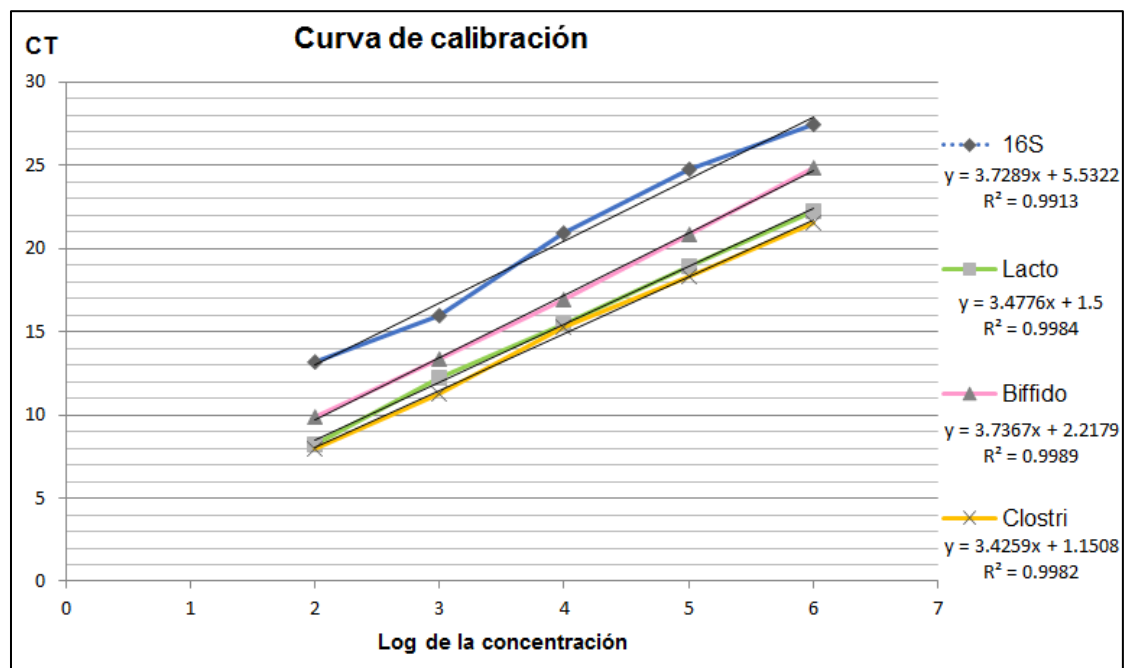
## Eficiencia de la reacción PCR.

### Curvas de calibración

Con el fin de obtener resultados más precisos se realizó una curva de calibración para determinar las concentraciones tomando en cuenta la eficiencia de cada reacción, a continuación se muestran las curvas obtenidas.

#### Figura 9. Curva de calibración.

Se muestra la pendiente lineal de los resultados obtenidos en función del logaritmo de la concentración y el umbral de ciclo (CT) de la qPCR realizada con ADN genómico de los género *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*, de la especie *Clostridioides Difficile* y del gen ARN 16S.



Se puede observar que cada una de las pendientes resulta con un valor aceptable al superar el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mínimo, el cual es 0,98. Estos

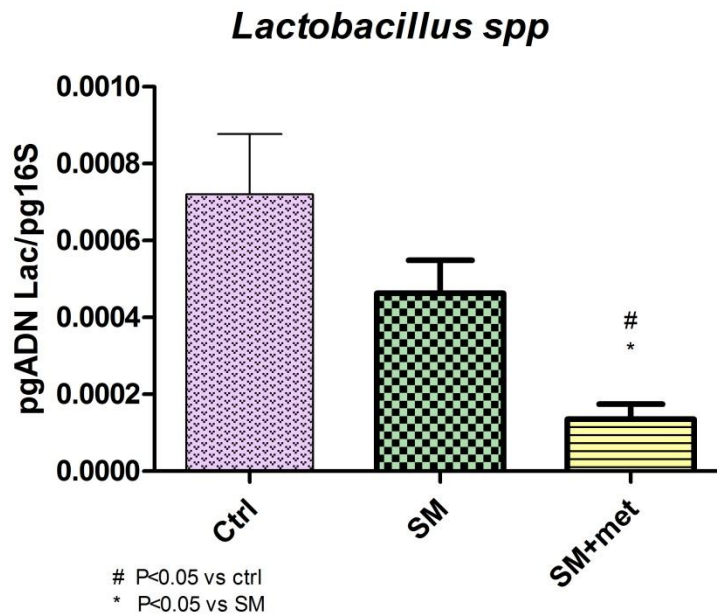
resultados se utilizaron para interpolar los valores de CT para cada muestra y de esta forma obtener las cantidades de DNA en picogramos (pg).

### Abundancia relativa en pg de ADN

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la expresión de genes mediante el ajuste de las curvas de calibración representado la abundancia relativa en pg de DNA de cada género y especie.

#### Figura 10. Cambios en la abundancia relativa en pg de ADN del gen de *Lactobacillus spp.*

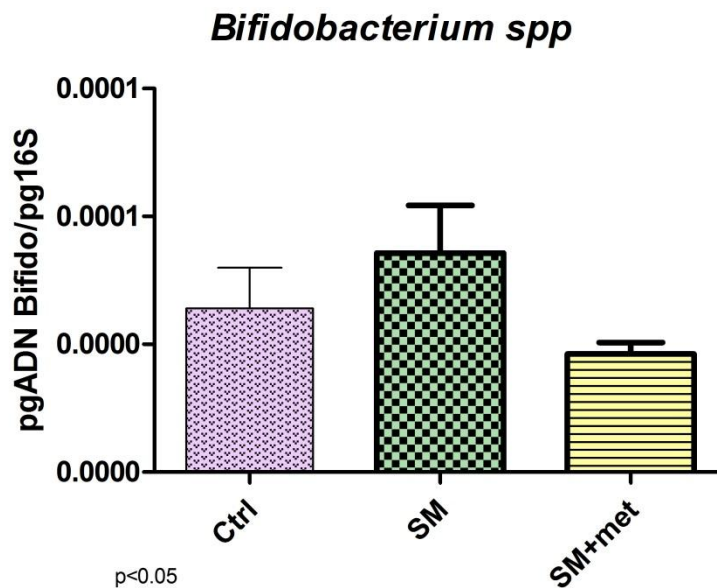
Se muestra la abundancia relativa en pg de ADN del género *Lactobacillus spp* en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 10 se observa que hubo no hubo cambios estadísticamente significativos sobre la abundancia relativa al comparar la expresión de genes del grupo control y el grupo SM, sin embargo, los valores de la expresión para el grupo que recibió metformina, SM+Met fue significativamente menor que los grupos SM o Ctrl,

**Figura 11. Cambios en la abundancia relativa en pg de ADN del gen de *Bifidobacterium spp.***

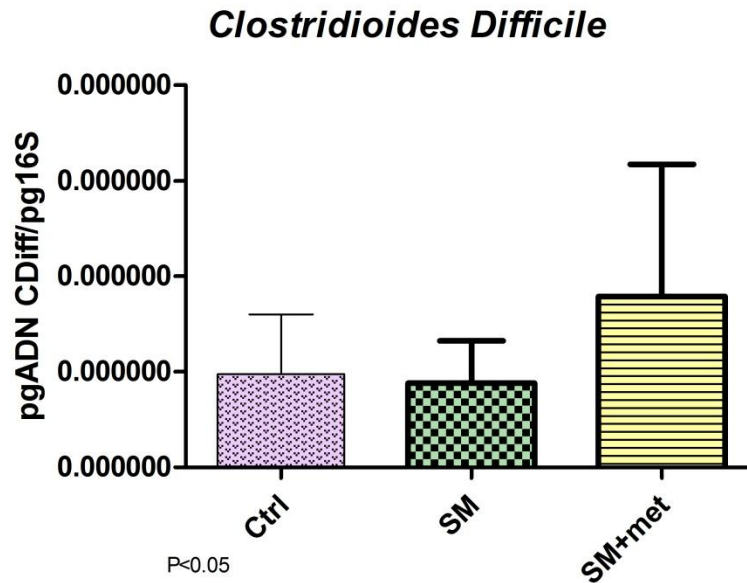
Se muestra la abundancia relativa en pg de ADN del género *Bifidobacterium spp* en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 11 se puede observar que no se presentaron cambios estadísticamente significativos entre los tres grupos de estudio, sin embargo, los valores de la expresión para el grupo que recibió metformina, SM+Met mostraron una tendencia de disminución al compararlos con los grupos Ctrl y SM.

**Figura 12. Cambios en la abundancia relativa en pg de ADN del gen de *Clostridioides Difficile*.**

Se muestra la abundancia relativa en pg de ADN de la especie *Clostridioides Difficile* en los grupos Ctrl (n=5), SM (n=5) y SM+Met (n=4). Prueba estadística U Mann-Withney, los valores son representados como media y desviación estándar, valor  $p \leq 0.05$ .



En la figura 12 se puede observar que no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos al comparar los tres grupos de estudio, aunque sí se muestra una tendencia de aumento de esta especie bacteriana en el grupo que recibió metformina, el grupo SM+Met.

## 8. DISCUSIÓN

Actualmente el SM representa un problema importante de salud pública a nivel mundial por lo que la importancia de su estudio y factores asociados ha ido aumentando, se sabe que un patrón alimentario inadecuado compuesto por alimentos con alta densidad energética y deficiente valor nutrimental ha provocado un aumento en el consumo de energía que supera la demanda energética, esto aunado a un estilo de vida sedentario son un factor clave en el desbalance sobre la acumulación de tejido adiposo, conllevando al padecimiento de obesidad y de manera asociada a la manifestación de anomalías en el perfil bioquímico del individuo, impactando de manera negativa en el estado de salud, por lo tanto surge la necesidad de aplicar medidas de tratamiento, tal es el caso de la intervención nutricional por medio de régimen alimenticio, cambios en los hábitos alimentarios y en el estilo de vida, sin embargo, en los casos en los que esto no es suficiente se opta por un tratamiento farmacológico, como la administración de MET, uno de los fármacos principalmente prescritos como tratamiento de DM2 y también de SM .

Ha ido en aumento el interés por el estudio del perfil bacteriano de la MI, no solo en condiciones de salud óptima, sino también durante el padecimiento de diversas patologías pues la evidencia apunta que ésta puede tener un impacto sobre la salud de su hospedero, pues está fuertemente involucrada en procesos de nutrición y de respuesta inmune, por lo cual es importante conocer el efecto que puede ejercer el consumo de fármacos sobre su homeostasis, existe una gran variabilidad en los resultados reportados pues al depender dicha colonización de diversos factores, entre estos la dieta, el estado fisiológico, factores genéticos, y etapa de la vida es complicado



dar por sentado una colonización específica, sin embargo, no se resta importancia al hecho de indagar y reportar los cambios que puedan existir. Debido a lo anterior mencionado en este estudio se utilizó un modelo de dieta alta en sacarosa, la cual es uno de los principales componentes de la dieta en México, pese a que es conocida la importancia de la disminución de su consumo se ha reportado poco el efecto que puede ejercer, principalmente durante el padecimiento de SM o DM de manera simultánea al tratamiento con metformina, por lo cual es importante identificar los posibles efectos que pueda generar ya que tendrán un impacto sobre la salud.

Es importante iniciar hablando en términos de cambios sobre la MI durante el padecimiento de SM, se ha observado en estudios previos que efectivamente existe una relación entre la MI y el padecimiento de los factores asociados al SM, principalmente la obesidad, uno de los primeros estudios en reportarlo concluyó que se observa una disminución de bacterias pertenecientes al filo *Bacteroidetes* y un aumento sobre el filo *Firmicutes* [30], con el paso del tiempo más estudios reportaron resultados similares a éste, por lo tanto se le ha propuesto como un perfil bacteriano característico de la obesidad y sus padecimientos asociados. Estos cambios sobre la MI resultan poco convenientes tomando en cuenta que se ha asociado al filo *Firmicutes* con una mayor recolección de la energía, de manera que ayudaría a perpetrar un balance energético positivo en el individuo, el cual representa un mayor consumo de energía comparado con el requerimiento energético, provocando una mayor acumulación de tejido adiposo. Lo anterior fue evidenciado por un estudio consecuente al primero mencionado [35], en el cual Turnbaugh y colaboradores realizaron trasplante fecal de un grupo de ratones que padecían obesidad a un grupo de ratones con un intestino libre de microorganismos,

posterior al trasplante se pudo observar que los ratones que recibieron dicho trasplante mostraron una ganancia de peso desarrollando obesidad.

Para el presente trabajo, se utilizó la amplificación del gen 16S como medida indirecta de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra de heces y por lo tanto del contenido intestinal. Dicha metodología se basa en la amplificación de una zona del gen 16S bacteriano que es específica para cada microorganismo y por otro lado también se amplifica una región conservada del gen 16S común a todas las bacterias, lo que nos permite hacer una inferencia indirecta de la cantidad del microorganismo en cuestión y al mismo tiempo sobre la cantidad total de bacterias presentes en la muestra. Para el análisis de resultados, se realizaron dos tipos de metodología. Las gráficas iniciales (figuras 3 – 9) muestran el análisis de la abundancia relativa de la especie o género en cuestión es decir, realizando una relación entre el valor del CT obtenido para cada bacteria y el CT del gen ARN 16S general de la región conservada. Sin embargo, para resultados más precisos fue necesario evaluar la cantidad en pg de ADN bacteriano utilizando curvas estándar específicas para cada microorganismo. Por lo anterior, se realizó una curva de calibración o curva estándar utilizando ADN genómico bacteriano comercial, el cual se vende purificado y cuantificado. Sin embargo, solo fue posible evaluar dos géneros bacterianos: *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp* y una especie: *Clostridiodes Difficile*, esta segunda metodología fue realizada con el fin de evaluar la eficiencia de la reacción la cual puede tener un impacto sobre la cantidad de ADN que se detecta, pues considera el rendimiento de la reacción de PCR tomando en cuenta variables del ensayo como las condiciones de la enzima polimerasa y el diseño de los iniciadores o “primers”, los cuales son factores que producen diferencias en los

resultados. Posteriormente, se pudo intrapolar el valor de CT de cada muestra en la curva estándar correspondiente y se obtuvo la cantidad de ADN en pg presente en las mismas. Se elaboró el análisis estadístico de los nuevos gráficos y no se observaron los cambios significativos, sin embargo, se pudieron observar tendencias de cambio sobre la colonización de algunas bacterias, como fue el caso de los géneros *Lactobacillus spp* y la especie *Faecalibacterium Prausnitzii*, en las cuales se observó una tendencia a disminuir, cabe mencionar que los resultados para *Lactobacillus spp* fueron semejantes en ambos tipos de análisis mostrando la disminución en la cantidad de las mismas bajo el tratamiento con metformina.

De acuerdo a lo observado nuestro modelo de SM no produce cambios significativos en la colonización intestinal por bacterias de los géneros y especies que se considera ejercen un efecto benéfico sobre la salud, en particular de *Lactobacillus spp* (Figura 3 Figura 10), el cual se ha reportado actúa con un efecto protector sobre la acumulación de tejido adiposo, expresión de genes proinflamatorios y una reducción en niveles de triglicéridos en modelos de obesidad en ratas [69]. Así mismo, en el SM no se observaron cambios en la abundancia relativa de la especie *Faecalibacterium Prausnitzii*, la cual ha sido descrita como benéfica pues se ha reportado como una de las principales bacterias productoras de butirato un ácido graso de cadena corta (AGCC) el cual funciona como fuente de energía para los colonocitos, ayudando a mejorar la integridad de la barrera intestinal [70][71]. Por otro lado pudo observarse en el grupo SM una tendencia de aumento para el género *Bifidobacterium spp* cuando se analizó utilizando la curva estándar (Figura 11), lo cual es un resultado interesante pues este género se considera como bacterias benéficas para la salud, por lo tanto como efecto de

la disbiosis intestinal ocasionada por el padecimiento de SM lo esperado sería observar una disminución en su cantidad, sin embargo, el cambio no es estadísticamente significativo y la desviación estándar obtenida en el análisis de abundancia nos indica una mayor dispersión en los datos. En cuanto a las bacterias consideradas patógenas se pudo observar que no hubo cambios significativos al realizar la comparación, sin embargo, se observó cierta tendencia de disminución de *Clostridioides Difficile* y *Escherichia Coli* en el grupo representativo de SM, lo cual resulta interesante pues como se mencionó anteriormente lo esperado radica en obtener un aumento de especies no benéficas como efecto de la disbiosis intestinal, especialmente de *Escherichia Coli*, ya que se ha reportado que durante el padecimiento de SM se presenta un descenso de las bacterias productoras de butirato, esto conduce a un aumento de oxígeno luminal propiciando el aumento en el crecimiento de sus cepas de tipo patógeno, influyendo de manera negativa sobre la salud del huésped [72][73].

De manera que los resultados no indican un cambio sobre la MI en el modelo de SM, podemos proponer que dicho modelo solo es útil para estudiar los cambios patológicos derivados de una dieta alta en carbohidratos simples y de esta manera analizar el efecto aislado de este tipo de compuestos sobre la microbiota aportando nuevo conocimiento, pues la mayor parte de los estudios realizados han hecho uso de modelos de inducción del SM mediante un aumento en lípidos o un aumento de lípidos e hidratos de carbono en conjunto, también podría deberse a la diferencia en la temporalidad de la misma, ejemplo de esto es un estudio que hizo uso de una dieta alta en lípidos durante 28 semanas [7], posterior a ello sí se observó un cambio sobre la MI en el padecimiento de

SM, por lo que podría realizarse un ajuste en el periodo de inducción siendo mayor a 16 semanas como fue usado en este estudio.

Por otro lado, para observar el efecto del tratamiento con MET se compararon los grupos SM y SM + MET, observándose algunos cambios estadísticamente significativos. Particularmente, para *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*, se observó una disminución de la colonización por ambos géneros una vez que recibieron tratamiento con MET (Figuras 3, 4 y 10), aunque es importante recordar que los cambios no están sujetos a un cambio previo en la MI durante el padecimiento de SM, por lo que podemos establecer que el cambio en estas bacterias se debe únicamente al tratamiento con metformina. Anteriormente se mencionó el papel que implica la suplementación de *Lactobacillus spp* sobre la prevención de obesidad [69], de igual manera la suplementación de especies de *Bifidobacterium spp* ha demostrado que juega un papel importante en la prevención de dicho padecimiento, también se ha relacionado con una mejora sobre la resistencia a la insulina [74], de manera que el decremento observado en nuestro estudio implica una desventaja para la salud del huésped, a su vez nuestros resultados muestran un contraste con el estudio previo realizado por Wu y colaboradores, en el que hicieron uso de muestras de heces fecales de pacientes con DM2 tratados con MET, en el cual se observó un aumento de *Bifidobacterium spp* posterior al tratamiento con el fármaco, indicando que observaron una mejoría sobre la disbiosis intestinal de los sujetos, estos resultados podrían diferir debido a la influencia de la dieta, por lo tanto es difícil establecerlo pues se desconocen las características de la dieta de la población de estudio [5], asimismo, se ha reportado que la MET induce un aumento en la colonización de *Lactobacillus spp*, pues un estudio realizado en ratones

con mutación espontánea de diabetes que fueron tratados con MET mostraron un aumento sobre la colonización de dicho género [58]. En cuanto a la especie *Clostridioides difficile* la cual fue analizada con ambos tipos de metodología se pudo observar una inconsistencia en la expresión de genes, para el análisis de abundancia relativa no se observaron cambios estáticamente significativos y tampoco pudo observarse una tendencia de aumento o disminución, en cambio para el análisis de abundancia en pg de ADN se observó una tendencia de aumento sobre el grupo tratado con MET, sin embargo, el cambio no es estadísticamente significativo y se puede observar que la desviación estándar es grande, por lo que es complicado establecer si la administración de MET tuvo una repercusión en nuestro modelo, de ser así, esto implicaría una desventaja sobre la salud pues se ha relacionado a esta especie bacteriana con las principales infecciones de tracto gastrointestinal cuyo cuadro clínico va desde diarrea leve hasta colitis fulminante y megacolon tóxico, también se encarga de la secreción de dos enterotoxinas, la tipo A y tipo B, las cuales causan disrupción de la barrera intestinal y de manera similar a la obesidad desatan una respuesta inflamatoria sistémica, lo cual se ha propuesto como un mecanismo de la patogénesis de la resistencia a la insulina, pues al activar respuesta inflamatoria de manera persistente esto podría interferir sobre sus mecanismos de señalización [75][76]. El análisis de abundancia en pg de ADN del género *Bacteroides* y de la especie *Escherichia coli* nos indica que no se observaron cambios estadísticamente significativos o tendencias de cambio, por lo tanto deducimos que la MET no ejerció un efecto en la colonización de este género y de esta especie, sin embargo, lo esperado sería obtener un aumento sobre la colonización de *Bacteroides*, ya que se ha reportado un aumento sobre su

colonización posterior a la administración de MET en un modelo de SM generado con una dieta alta en lípidos realizado en ratones [7]. En cuanto a la especie *Escherichia Coli* lo esperado sería observar una disminución en su colonización como efecto de reversión de la disbiosis intestinal, sin embargo, dos estudios realizados usando muestras de heces fecales de individuos con padecimiento de DM2, han reportado un aumento sobre su colonización posterior a la administración de MET, debido a esto es difícil suponer la razón de dicho cambio, pues las características de la dieta de este estudio realizado no se especifican lo cual podría sesgar el vínculo entre ambos estudios ya que dicho estudio utiliza 3 tipos de cohorte pertenecientes a los países de China, Suecia y Dinamarca, los cuales cuentan con hábitos alimentarios completamente diferentes y resultados de abundancia de especies diferente, ya que la colonización de la MI está fuertemente asociada a la dieta, esto podría intervenir [5][59]. Finalmente el análisis de abundancia absoluta de la especie *Faecalibacterium Prausnitzii* nos indica un cambio estadísticamente significativo al observarse una disminución en el grupo tratado con MET, debido al papel benéfico que implica a la salud esta especie podría considerarse que el fármaco no ayuda a revertir la disbiosis intestinal, sin embargo, al igual que en el resto de comparaciones es importante recordar que no se presentaron cambios significativos sobre la MI durante el padecimiento de SM por los tanto es importante seguir realizando estudios para poder establecer un perfil bacteriano específico de dicho padecimiento en el que la dieta sea monitoreada para evitar posibles sesgos debido a su influencia.

## **9. CONCLUSIÓN**

En este estudio no se observaron cambios significativos sobre la MI durante el padecimiento de SM en un modelo murino.

La administración de MET en un modelo de SM generado con dieta alta en sacarosa en ratas promovió algunos cambios sobre la colonización de algunas las especies o géneros que fueron considerados en este estudio, sin embargo, se debe considerar que el número de especies o géneros utilizados es insuficiente para determinar un perfil bacteriano preciso, por lo que se recomienda realizar estudios exhaustivos en el que se puedan analizar un mayor número de bacterias, esto contribuirá a establecer un enterotipo característico del padecimiento de SM mediado por una dieta alta en sacarosa y de esta manera identificar los posibles efectos que pueda inducir dicho fármaco, por lo tanto nuestros resultados nos permiten sugerir que la administración de MET no ayuda a revertir la disbiosis intestinal, al promover un aumento en la colonización de bacterias benéficas para salud en un modelo murino de SM generado por una dieta alta en sacarosa.

## **10. PERSPECTIVAS**

Como se ha mencionado en la conclusión, es importante mencionar que los géneros o especies bacterianas considerados en este estudio conforman una parte mínima del extenso MI, por lo que sería ideal realizar estudios de secuenciación masiva que aporten conocimiento de un mayor número de especies bacterianas y poder establecer un enterotipo certero del efecto que puede generar la MET sobre la MI, con la finalidad de



en un futuro poder establecer un tratamiento en el cual la MI pueda verse beneficiada y a su vez mejorar el estado homeostático del individuo.

## 11. LITERATURA CITADA

- [1] Icaza-Chávez M. E., "Gut microbiota in health and disease," *Integr. Med. Res.*, vol. 78, no. 4, pp. 240–248, 2014.
- [2] L. Abenavoli *et al.*, "Gut Microbiota and Obesity : A Role for Probiotics," pp. 1–27, 2019.
- [3] F. Guarner and J. Malagelada, "La flora bacteriana del tracto digestivo," vol. 26, no. Supl 1, pp. 1–5, 2003.
- [4] E. A. Andreadis *et al.*, "The Effect of Metformin on the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease Risk Factors in Overweight and Obese Subjects – The Carmos Study," *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, vol. 117, pp. 175–180, 2008.
- [5] H. Wu *et al.*, "Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug," *Nat. Med.*, vol. 23, no. 7, pp. 850–858, 2017.
- [6] M. G. Rodríguez-Angeles, "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*," *Salud Publica Mex.*, vol. 44, no. 5, pp. 464–475, 2002.
- [7] H. Lee, "Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota," vol. 80, no. 19, pp. 5935–5943, 2014.
- [8] A. Paula, B. Moreira, T. Fiche, S. Texeira, A. B. Ferreira, and M. Geraiis, "Influence of a high-fat diet on gut microbiota", intestinal permeability and metabolic endotoxaemia," pp. 801–809, 2012.
- [9] G. Soto-Estrada, L. Moreno-Altamirano, D. Pahua Díaz, G. Soto-Estrada, L. Moreno-Altamirano, and D. Pahua Díaz, "Panorama epidemiológico de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México " *Rev. la Fac. Med.*, vol. 59, no. 6, pp. 8–22, 2016.
- Petli glissona i kołmierza ortopedycznego.," *Postpy Chir.*, vol. 2, pp. 94–98, 1955.
- [10] B. Evia and J. Roberto, "no transmisibles . El laboratorio también juega," *Rev. Latinoam de Patol Clin Med Lab.*, vol. 65, no. 1, pp. 4–17, 2018.
- [11] Obesity update- OECD.(2021).Retrieved 2 September 2014, from <https://www.oecd.org/health/obesity-update.htm>.
- [12] G. C. Flores, A. Laura, and G. Morales, "Asociación de sobrepeso y obesidad con cifras de presión elevada en niños de edad escolar," *Aten Fam.*, vol. 27, no. 3, pp. 140–144.
- [13] I. Isabel *et al.*, "Metformina : Uso clínico y actualización," *Rev Med Hondur.*, vol. 87, no. 1, 2019.
- [14] A. Mu, C. Diaz-perdigones, and F. J. Tinahones, "Microbiota y diabetes mellitus tipo 2", *Endocrinología y Nutrición.*, vol. 63, no. 10, pp. 560–568, 2016.
- [15] C.Carvajal, "Síndrome metabólico: definiciones, epidemiología, etiología, componentes y tratamiento , " *Rev Medicina Legal de Costa Rica - Edición Virtual*, vol. 34, no. 1, 2017.
- [16] G. M. Reaven, "Pathophysiology of insulin resistance in human disease," *Physiol. Rev.*, vol. 75, no. 3, pp. 473–486, 1995.
- [17] Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr, International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, Hational Heart, Lung, and Blood

- Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, & International Association for the Study of Obesity (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120(16), 1640–1645. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- [18] S. K. Panchal *et al.*, “High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 57, no. 1, pp. 51–64, 2011.
- [19] D. Giugliano, A. Ceriello, and K. Esposito, “The Effects of Diet on Inflammation. Emphasis on the Metabolic Syndrome,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 677–685, 2006.
- [20] E. Rodríguez-Correa, I. González-Pérez, P. I. Clavel-Pérez, Y. Contreras-Vargas, and K. Carvajal, “Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice?,” *Nutr. Diabetes*, vol. 10, no. 1, 2020.
- [21] A. M. James, Y. Collins, A. Logan, and M. P. Murphy, “Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 23, no. 9, pp. 429–434, 2012.
- [22] E. Denova-Gutiérrez *et al.*, “Dietary patterns are associated with metabolic syndrome in an urban Mexican population,” *J. Nutr.*, vol. 140, no. 10, pp. 1855–1863, 2010.
- [23] N. M. McKeown, J. B. Meigs, S. Liu, E. Saltzman, P. W. F. Wilson, and P. F. Jacques, “Carbohydrate Nutrition, Insulin Resistance, and the Prevalence of the Metabolic Syndrome in the Framingham Offspring Cohort,” *Diabetes Care*, vol. 27, no. 2, pp. 538–546, 2004.
- [24] A. Esmailzadeh, P. Mirmiran, and F. Azizi, “Whole-grain consumption and the metabolic syndrome: A favorable association in Tehranian adults,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 59, no. 3, pp. 353–362, 2005.
- [25] A. Esmailzadeh and L. Azadbakht, “Whole-grain intake, metabolic syndrome, and mortality in older adults [3],” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 83, no. 6, pp. 1439–1440, 2006.
- [26] A. Esmailzadeh, M. Kimiagar, Y. Mehrabi, L. Azadbakht, F. B. Hu, and W. C. Willett, “Fruit and vegetable intakes, C-reactive protein, and the metabolic syndrome,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 84, no. 6, pp. 1489–1497, 2006.
- [27] E. Denova-Gutiérrez, J. O. Talavera, G. Huitrón-Bravo, P. Méndez-Hernández, and J. Salmerón, “Sweetened beverage consumption and increased risk of metabolic syndrome in Mexican adults,” *Public Health Nutr.*, vol. 13, no. 6, pp. 835–842, 2010.
- [28] R. Dhingra *et al.*, “Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community,” *Circulation*, vol. 116, no. 5, pp. 480–488, 2007.
- [29] P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, J. I. Gordon, R. E. Ley, and F. Ba, “Obesity alters gut microbial ecology,” *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 102, no. 31, pp. 11070–11075, 2005.
- [30] F. Armougom, M. Henry, B. Vialettes, D. Raccah, and D. Raoult, “Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients,” *PLoS ONE.*, vol. 4, no. 9, pp. 1–8, 2009.
- [31] R. Balamurugan, G. George, J. Kabeerdoss, J. Hepsiba, A. M. S. Chandragunasekaran, and B. S. Ramakrishna, “Short Communication Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children,” *British Journal of Nutrition.*, vol. 103, pp. 335–338, 2010.
- [32] M. Million *et al.*, “Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*,” *International Journal of Obesity.*, vol. 36, no. 6, pp. 817–825, 2011.

- [33] M. Ferrer *et al.*, “Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure,” *Environmental Microbiology.*, 2012.
- [34] P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon, “An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest,” *Nature.*, vol. 444, no. 21/28, pp. 1027–1031, 2006.
- [35] G. B. Parry, “Review Articles: Geruint B. Puny: Elites and Influence,” *Gov. Oppos.*, vol. 10, no. 2, pp. 240–243, 1975.
- [36] M. G. Castro-Martínez, V. Castillo-Anaya, A. Ochoa-Aguilar, and S. A. Godínez-Gutiérrez, “La metformina y sus aplicaciones actuales en la clínica,” *Med. Interna Mex.*, vol. 30, no. 5, pp. 562–574, 2014.
- [37] J. Ildefonso, A. Rodulfo, T. N. Blanco, G. Aure, and A. Palacios, “Metformina, el fármaco paradigma del siglo XXI,” *Med. interna (Caracas).*, vol. 33, no. 1, pp. 4–18, 2017.
- [38] H. Tilg and A. R. Moschen, “Microbiota and diabetes: An evolving relationship,” *Gut*, vol. 63, no. 9, pp. 1513–1521, 2014.
- [39] B. Stecher, L. Maier, and W. D. Hardt, “‘Blooming’ in the gut: How dysbiosis might contribute to pathogen evolution,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 4, pp. 277–284, 2013.
- [40] J. F. García-Mazcorro, E. Garza-González, A. G. Marroquín-Cardona, and J. L. Tamayo, “Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad,” *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 38, no. 7, pp. 445–466, 2015.
- [41] C. Alberto and P. Pereira, “Microbiota intestinal humana y dieta,” *Cienc Tecn UTEQ.*, vol. 12, no 1, pp. 31-42, September, 2019.
- [42] F. Turrón, D. Van Sinderen, and M. Ventura, “Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*”, *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 149, pp. 37–44, 2011.
- [43] C. Stanton, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. Van Sinderen, “Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites,” *Food biotechnology*, vol. 16, pp. 198–203, 2005.
- [46] R. M. Martínez, K. G. Hultén, U. Bui, and J. E. Clarridge, “Molecular analysis and clinical significance of *Lactobacillus* spp. Recovered from clinical specimens presumptively associated with disease,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 30–36, 2014.
- [47] J. M. Wells, “Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, no. 1, p. S17, 2011.
- [48] J. Xu *et al.*, “A Genomic View of the Human – *Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis,” *SCIENCE.*, vol. 299, no. March, pp. 2074–2077, 2003.
- [49] M. Arumugam *et al.*, “Enterotypes of the human gut microbiome,” *Nature.*, vol. 12, no. 473, pp. 174-180, 2011.
- [50] S. Miquel *et al.*, “*Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 255–261, 2013.
- [51] R. Martín *et al.*, “*Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model,” *BMC Microbiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–12, 2015.
- [52] A. H. Carlsson *et al.*, “*Faecalibacterium prausnitzii* supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 48, no. 10, pp. 1136–1144, 2013.
- [53] Y. M.-R. L. Monroy-Dasta M.C., Castro-Barrera T., Fernández-Perrino F.J., “Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas,” *ContactoS*, vol. 73, pp. 63–72, 2009.
- [54] A. M. Seekatz, V. B. Young, A. M. “*Clostridium difficile* and the microbiota Find the latest version : *Clostridium difficile* and the microbiota,” *J Clin Invest.*, vol. 124, no. 10, pp. 4182–4189, 2014.
- [55] P. Hookman and J. S. Barkin, “*Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and

- colitis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 15, no. 13, pp. 1554–1580, 2009.
- [56] C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, and R. Knight, "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota," *Nature*, vol. 489, no. 7415, pp. 220–230, 2012.
- [57] J. J. Sebastián-Domingo and C. Sánchez-Sánchez, "From the intestinal flora to the microbiome," *Rev. Esp. Enfermedades Dig.*, vol. 110, no. 1, pp. 51–56, 2018.
- [58] H. Lee, "Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 19, pp. 5935–5943, 2014.
- [59] W. Zhang, J. H. Xu, T. Yu, and Q. K. Chen, "Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 118, no. April, 2019.
- [60] K. Forslund *et al.*, "Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota," *Nature*, vol. 528, no. 7581, pp. 262–266, 2015.
- [61] M. Zhang, R. Feng, M. Yang, C. Qian, Z. Wang, and W. Liu, "Effects of metformin , acarbose , and sitagliptin monotherapy on gut microbiota in Zucker diabetic fatty rats," *BMJ Open Diab Res Care.*, vol. 7, pp. 1–11, 2019.
- [62] J. E. Suárez, "Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos," *Nutr. Hosp.*, vol. 31, pp. 3–9, 2015.
- [63] V. Robles-Alonso and F. Guarner, "Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana," *Nutr. Hosp.*, vol. 28, no. 3, pp. 553–557, 2013.
- [64] T. D. D. L, C. Ibarra, and C. Velasquillo, "de la polimerasa ( PCR ) y de la PCR en tiempo real."
- [65] E. N. Biotecnología and S. R. Elsa, "BIOTECNOLOGÍA MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PCR ALUMNOS : CORTAZAR MARTÍNEZ," 2004.
- [66] P. Aguilera, M. R. Tachiquín, M. Graciela, R. Munive, and B. P. Olvera, "PCR en tiempo real," *Herramientas moleculares aplicadas en ecología.*, pp. 175–202.
- [67] D. Dna, "PROBLEMA BIOQUÍMICO," *REB.*, vol. 32, no. 1, pp. 36–39, 2013.
- [68] J. Balderas-Villalobos, T. Molina-Muñoz, P. Mailloux-Salinas, G. Bravo, K. Carvajal, and N. L. Gómez-Viquez, "Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 305, no. 9, pp. 1344–1353, 2013.
- [69] A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogus, A. Palva, and T. Rinttila, "Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR," *J Appl Microbiol.*, vol. 97, no. 6, pp. 1166–1177, 2004.
- [70] M. Miyoshi, A. Ogawa, and S. Higurashi, "Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice," *European Journal of Nutrition*, vol. 53, pp. 599–606, 2014.
- [71] L. Watterlot *et al.*, "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients," *PNAS*, vol. 105, no. 43, 2008.
- [72] S. Miquel *et al.*, "Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*" *Gut Microbes.*, vol. 5, no. 2, pp. 146–151, 2014.
- [73] K. Dabke, G. Hendrick, S. Devkota, K. Dabke, G. Hendrick, and S. Devkota, "The gut microbiome and metabolic syndrome The gut microbiome and metabolic syndrome," *J Clin Invest.*, vol. 129, no. 10, pp. 4050–4057, 2019.
- [74] M. X. Byndloss *et al.*, "Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion," *Science.*, vol. 357, no. 6351, pp. 570–575, 2017.

- [75] S. Kondo *et al.*, “Antiobesity Effects of Bifidobacterium breve Strain B-3 Supplementation in a Mouse Model with High- Fat Diet-Induced Obesity Antiobesity Effects of Bifidobacterium breve Strain B-3 Supplementation,” *Biosci Biotechnol Biochem.*, vol. 8451, no. 8, pp. 1656–1661, 2014.
- [76] J. Barra-Carrasco, C. Hernández-Rocha, P. Ibáñez, A. M. Guzmán-Durán, M. Álvarez-Lobos, and D. Paredes-Sabja, “Esporas de Clostridium difficile y su relevancia en la persistencia y transmisión de la infección,” *Rev. Chil. Infectol.*, vol. 31, no. 6, pp. 694–703, 2014.
- [77] C. J. Lee, “Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance,” *Ann N Y Acad Sci.*, vol. 1461, no. 1, pp. 37-52–16, 2020.
- [78] Secretaría de salud. (2018). Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-015-SSA2-2018, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus (NOM-015-SSA2-2018)

Cuernavaca, Morelos, a 06 de septiembre de 2021.

Asunto: Voto aprobatorio.

MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN

DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN

UAEM P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante **REBECA BETZAIRA VELAZQUEZ VILLADA** de la Licenciatura en Nutrición, he leído y revisado la tesis titulada: **“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO.”**, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE,



Dra. Ollin Celeste Martínez

Profesor Investigador de Tiempo Completo



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

**OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2021-10-12 14:44:51 | Firmante**

Jmt1yTlylcC8xSYI38SPx4YLO5tmlDBcAfgU2EBnGh9CCIRmaMhRXz8TpX40v8T/8fjj8f3o5oh6n99z7Z5LXHybZVgDU+JZCjUdebP3gWqfaZqZ7atOiW2MTX7/yt8KXsyWsBpSJ8Oo/HjJLJahG3gbAYrnXumxEEjp7q8pnhFxFgeErRCz36iODgrRHvv0LM9w0XYMCN6yLKx0Hx5Q0HYktmhVylC81XzwGmvR19XIlectx1ng4yXwEKIt7YSkdpRGaZZH2zSmMXDmQJMqhggs0Oz4Us5ThVX9InBRIPgmrjaaAalL2kqSA1Fv2Ld7E2DLFnjltC/3ksqfSGZ7A==

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



[QB1OxN8Xg](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1hQfSJ5G1WccAwrRS5mXNbegNKbDj0j7>



Cuernavaca, Morelos, a 07 de junio de 2021.

Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante **REBECA BETZAIRA VELAZQUEZ VILLADA** de la Licenciatura en Nutrición, he leído y revisado la tesis titulada: “EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO.”, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE,

**Dra. Delia Vanessa López Guerrero**  
Profesora-Investigadora Tiempo Completo





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

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2021-06-07 22:54:01 | Firmante**

mJo6Sx03AIAAnE/oOBnA9t+SAoI3Y2bRxuxLqZICe8kVDkBVPPAzxq5VWwRnQbduEAlk2xJ3r7bJUu+aMNewJNTa3ut/GMdtLACCZdpwOoCWSRbI4GNvANxIswQY4p47LvD8z5LK98xBxGnU01cF+I9EOIa+iFjZvMlvumHt7mdU2BJVPzh9dpgZvBN9PbGeMn9OlcQ9ebQUTWvyWN054fQtJplx8eUW2sdtes4Rskb6q4hZk2ThnQWryUQdUn0bPgFJ1P/+hk05uvNbaWHk8Kno3sENW7nKTBelC/exOTalgO2ol/J5K6wLjgnBduJTAoFnGziFMuYplUXZoUFYw==

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



**g9An65**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Ppa89Qg9dC57jlqlv3rK0kFildWHfPOH>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

**FACULTAD DE NUTRICIÓN**

Cuernavaca, Morelos, a 12 de octubre de 2021.  
Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante **REBECA BETZAIRA VELAZQUEZ VILLADA** de la Licenciatura en Nutrición, he leído y revisado la tesis titulada: “EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO.”, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**Mtra. Ana Ivonne Romero Roldán**



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

**ANA IVONNE ROMERO ROLDAN | Fecha:2021-10-12 12:09:04 | Firmante**

KWaDZu6iNz2kTxRRVfvGyGtdBeZ6KXaYI1v3o6Y1/n5ANI7AnlOVz743TChpbWNwAHLBGLX+xXKdknmoiC5P19aWRjtx34CDeOzF+8Us0bUGpSTEpYBDuNf/DCgVvpFG8FvWcgWz4NLw0DDub13ylAJpUF+OWrRbXLxfKr+1u1biqMG7d8IDKyh3YxT/VN4iP0Wdp9RO4auEDxkC/Uyo+DpwwPonmBrzEwg6RmZzfgZS/JAkAafNGiU8gSCStWsXc3W90s8nL GwUz6NXE1W87HpgtBln5G6z+1E3rEAVEkMdfarS6nCJp3r4SznQBy43K50ONbfJeflu6mX32rkscg==

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



[KYDuHzN59](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hosXlkbzcVNzV3FNMSTPgkcn5vmpRGwM>



**FACULTAD DE NUTRICION**

Cuernavaca, Morelos, 20 de octubre de 2021.

Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JESICA LOPEZ BUCIO FABIAN**  
**DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICION, UAEM.**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de la estudiante **REBECA BETZAI RA VELAZQUEZ VILLADA** de la Licenciatura en Nutrición, he leído y revisado la tesis titulada: “EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE METFORMINA SOBRE LA COMPOSICION DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE SINDROME METABOLICO”, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
MCS Liliana Karina Valencia Estañón.



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

LILIANA KARINA VALENCIA ESTAÑÓN | Fecha:2021-10-20 20:27:56 | Firmante

L2fDzxdP9zeLx92NksqZ8+yEKfyhCwjCIQSU4DSevk58A6tynFrSxKtLVHbKpOH3hILSbQn6Ha+txJU9AAxt3g1v1KQWW8aQjheZv8+h6oL9utQjdBFPUe0k9krA9UCZMOBsafKsr8+gK5JNhoF5ZbB2iUqTYve+Un4UyPn1L7T2pBTt5p8rALOP3nLopXfCgz19LeT/CbplC1itUn34NIWgcrX/fUJ+5dxl507fBY950mZB3K3zPLdz6FYnWgIGW+7ipDJYyTKoY9NsJNFXOcZdi6QtHHZ5gBxRPkVr1NfOSrJRLjAF/8RYeQliCFnyanDPGqP3WWLgjh4yJku0bw==

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



**cJ8Q1IOXG**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/umX798uEMpw5iy50WZ2m1Uyd1aQkUYRK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

Cuernavaca, Morelos, a 08 de septiembre de 2021.  
Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante **REBECA BETZAIRA VELAZQUEZ VILLADA** de la Licenciatura en Nutrición, he leído y revisado la tesis titulada: “EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO.”, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE,

**Mtra. Alma Venosa Castañón**



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

**ALMA MARGARITA VENOSA CASTAÑÓN | Fecha:2021-10-14 21:50:28 | Firmante**

j86y+yDBxFneuTHbwL5hYImH5tragnlpNiyTgRnda9i0RMsvP8N/hsTPvldKJJSwjC0I+CS3TvDoHGGNDYOabQNqIlgND2Rkre9VB54VmOBar3gRlgoKkJyvqaz4z/3Kq30PhID9WHNcqj0YA+n/9Ued29GlimuCXSSudBf/QwXwZRb73GRE4YDRpR114KBd7C1LDkUCmu92TRCC1pEQXXtNVUj52yx+7gTJaZyls8QN1Dsa3ciD5ZaqtEIBW0oFYMS1IrGAlcwOV1Pn0eLdAisL/qq3kp1L8YhUlgI9l/pkkuGMa10sZFcl8ZFR9fBEzXi6x1hOVWvyCcJi38XBPtg==



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

[NByOghU9whttps://efirma.uaem.mx/noRepudio/2z0sol4JCZZ0A7c7bJYbcQ3fD4V3tko](https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2z0sol4JCZZ0A7c7bJYbcQ3fD4V3tko)



