



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LOS BACTERIÓFAGOS SOBRE LA DINÁMICA DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL DE RATONES CON OBESIDAD Y ALTERACIONES
METABÓLICAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
MARCO ANTONIO JIMÉNEZ RICO**

**TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Adrián Ochoa Leyva
Instituto de Biotecnología UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. José Luis Puente García
Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos
Instituto de Biotecnología UNAM**

Cuernavaca, Morelos, Octubre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Adrián Ochoa Leyva, en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, y se realizó gracias al financiamiento de los proyectos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD-2014-C01-234188 y CONACyT-Fronteras de la Ciencia 2019-263986, así como el proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM (IA203118 y IN215520).

Para este proyecto se contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca de maestría con número 887923.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco enormemente al doctor Adrián Ochoa Leyva, por asesorarme durante este proyecto y por permitirme formar parte del laboratorio, en el cual recibí grandes aprendizajes, asimismo agradezco sus consejos y apoyo.

Agradezco al Dr. José Luis Puente y la Dra. Rosa María Gutiérrez, y a los investigadores colaboradores e implicados en la evaluación y realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio. Por sus consejos y observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo, pues siempre mostraron empatía al compartir su conocimiento conmigo, y contribuyeron en mi formación académica y personal.

Agradezco a los nuevos amigos (del laboratorio y externos) que me acompañaron e hicieron más agradable esta etapa de mi vida, y aquellos que a pesar de los años y la distancia siguen estando presentes.

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, que gracias a su amor y su apoyo he podido salir adelante.

DEDICATORIA.

A mis padres, que son y siempre serán mi más grande ejemplo y motivación, y por el apoyo incondicional que siempre me brindan, y a mis hermanos, Ela y Fernando, pues a pesar de la distancia siempre están a mi lado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Obesidad y síndrome metabólico.	1
1.1.1. Definición y prevalencia.	1
1.1.2 Situación en México.	2
1.1.3. Fisiopatología.	4
1.2. La microbiota intestinal.	4
1.3 Microbiota intestinal en obesidad y síndrome metabólico.	6
1.4 Microbiota del ratón, como modelo de estudio de la microbiota humana.	9
3.5. Trasplantes de microbiota.	10
3.6. Bacteriófagos intestinales.	11
2. ANTECEDENTES.	13
3. HIPÓTESIS.	17
4. OBJETIVO GENERAL.	17
4.1. Objetivos específicos.	17
5. METODOLOGÍA.	18
5.1. Preparación del trasplante de VLPs.	18
5.1.1. Donadores de VLPs.	
5.1.2. Extracción de VLPs.	
5.1.3. Control de Calidad de muestra de VLPs: Determinación de presencia de bacterias.	

5.2. Diseño experimental.	19
5.2.1. Animales.	19
5.2.2. Trasplante de VLPs.	20
5.2.3. Pruebas metabólicas.	21
5.3. Caracterización de la Microbiota por Secuenciación del gen 16S.	22
5.3.1. Selección de muestras.	22
5.3.2. Extracción de ADN.	22
5.3.3. Amplificación del gen 16S y secuenciación masiva.	22
5.3.4. Procesamiento bioinformático de las secuencias del gen16S.	23
5.3.4.1. Control de calidad de las secuencias.	23
5.3.4.2. Obtención de OTUs y asignación taxonómica.	24
5.4. Análisis estadístico.	25
6. RESULTADOS.	26
6.1. Determinación de bacterias en inóculo de VLPs.	26
6.2. Caracterización de la microbiota intestinal por secuenciación del gen 16S (estudio piloto)	28
6.3. Trasplante de VLPs.	29
6.3.1. Pruebas de Tolerancia a la Glucosa y Resistencia a la Insulina.	29
6.4. Microbiota intestinal durante el trasplante con VLPs.	31
6.4.1. Procesamiento bioinformático.	31
6.4.2. Composición y diversidad de la microbiota durante el	

tratamiento.	32
6.4.3. Cambios diferenciales post-trasplante.	38
6.4.3.1. Diferencias transversales (grupo VLPs vs. Control).	38
6.4.3.2. Cambios longitudinales.	40
6.5. Correlación entre la microbiota y metabolismo de los ratones.	41
6.6. Posible colonización de bacterias tras el trasplante VLPs.	43
7. DISCUSIONES	46
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS.	53
9. CONCLUSIONES	54
10. REFERENCIAS	55
11. MATERIAL SUPLEMENTARIO.	67

RESUMEN.

La obesidad y el síndrome metabólico son problemas de salud pública mundial que se han asociado a alteraciones en la microbiota intestinal (Dabke et al., 2019). Los bacteriófagos son los virus más diversos y abundantes de la microbiota, teniendo el potencial de modular la estructura y función de las poblaciones bacterianas, pudiendo influir en la salud y el metabolismo del hospedero (Lin et al., 2019). En este contexto y con el objetivo de determinar el efecto de los bacteriófagos en la modulación de la microbiota y en el metabolismo del hospedero se realizó un trasplante de VLPs fecales de niños normopeso a ratones con obesidad y síndrome metabólico inducido por dieta alta en grasas, y se les dio seguimiento durante 18 semanas. Los ratones fueron semanalmente pesados y se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina antes y después de 10 y 17 semanas, y la microbiota fecal se caracterizó en diferentes puntos del tratamiento por secuenciación masiva del gen 16S bacteriano. No se observaron diferencias en el peso ni en la resistencia a la insulina de los ratones inoculados con VLPs en comparación con el grupo control durante el tratamiento. Se presentó una tendencia de mejora en la tolerancia a la glucosa en el grupo inoculado con VLPs en comparación con el control en la semana 17 post-trasplante. Por su parte, el análisis de beta diversidad mostró que la composición de la microbiota cambió a partir de la semana 1 en el grupo inoculado con VLPs y estos cambios persistieron en las semanas 10 y 17 post-trasplante, lo cual no se observó en el grupo control. Se identificó una reducción significativa en la abundancia de *Akkermansia muciniphila* y *Mucispirillum schaedleri* en el grupo inoculado con VLPs, y esta bacteria correlacionó positivamente con la intolerancia a la glucosa. Por el contrario, *Allobaculum* aumentó en el grupo inoculado con VLPs y esta bacteria presentó correlación inversa con la intolerancia a la glucosa. Los cambios en estas bacterias podrían contribuir a la tendencia de mejora en la tolerancia a la glucosa en este modelo. En este primer estudio de trasplante de VLPs de humano a ratones obesos con síndrome metabólico se presenta evidencia del papel que podrían jugar los bacteriófagos en la modulación de la microbiota en enfermedades asociadas a disbiosis, como la obesidad y el síndrome metabólico.

ABSTRACT.

Obesity and metabolic syndrome are global public health problems that have been associated with changes in the gut microbiota (Dabke et al., 2019). Bacteriophages are the most diverse and abundant viruses of the microbiota and comprises approximately 90% of faecal virus like particles (VLPs), having the potential to modulate the structure and function of bacterial populations and potentially influencing the health and metabolism of the host (Lin et al., 2019). In this context, and in order to determine the effect of bacteriophages on modulation of the microbiota and host metabolism, we performed a transplant of fecal VLPs from normal weight children to mice with obesity and metabolic syndrome induced by a high fat diet, and they were followed up for 18 weeks. Mice were weighed weekly and glucose tolerance and insulin resistance tests were performed before and after 10 and 17 weeks post-transplant, and the faecal microbiota was characterized at different points in the treatment by massive sequencing of the bacterial 16S gene. No differences in weight or insulin resistance were observed in mice inoculated with VLPs compared to the control group during treatment. There was a trend of improvement in glucose tolerance in the group inoculated with VLPs compared to the control at week 17 post-transplant. For its part, the analysis of beta diversity showed that the composition of the microbiota changed at the week 1 in the group inoculated with VLPs and these changes persisted in weeks 10 and 17 post-transplant, which was not observed in the control group. A significant reductions in the abundance of *Akkermansia muciniphila* and *Mucispirillum schaedleri* were identified in the group inoculated with VLPs, and this bacterium positively correlated with glucose intolerance. In contrast, *Allobaculum* increased in the group inoculated with VLPs and this bacterium had an inverse correlation with glucose intolerance. Changes in these bacteria could contribute to the trend of improvement in glucose tolerance in this model. In this first study of transplanting human VLPs into obese mice with metabolic syndrome, we present evidence of the role that bacteriophages could play in modulating the microbiota in diseases associated with dysbiosis, such as obesity and metabolic syndrome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Obesidad y síndrome metabólico.

1.1.1. Definición y prevalencia.

La obesidad se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa corporal y resulta de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético (Romieu et al., 2017). Es un problema pandémico cuya prevalencia ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a diversos factores, tales como: cambios dietéticos mundiales caracterizados por un aumento de la ingesta de alimentos hipercalóricos con abundantes grasas y carbohidratos, y tendencias a la disminución de la actividad física. La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) por un índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m² (Blüher, 2019). La prevalencia de obesidad varía según el país, desde un 3.7% en Japón a 38.2% en los Estados Unidos (Figura 1). Existen también diferencias entre sexos, siendo por lo general más frecuente en mujeres que en hombres (Kanter & Caballero, 2012). A nivel mundial, la obesidad aumentó a un ritmo alarmante en niños y adolescentes, de 0.7% a 5.6% en niños y de 0.9% a 7.8% en niñas entre 1975 y 2016. Esta tendencia de incremento en estas edades son motivo especial de preocupación por la predicción de cómo esto podría afectar a las poblaciones adultas de un futuro cercano (Blüher, 2019). En un estudio longitudinal que involucró 34,196 niños alemanes, cuyas medidas antropométricas fueron medidas durante su niñez y adolescencia, se observó que casi el 90% de los niños que fueron obesos a los 3 años de edad, presentaron sobrepeso u obesidad también en la adolescencia (Keller et al., 2018). Asimismo, la obesidad con frecuencia se acompaña de otras alteraciones metabólicas (Blüher, 2019).

El síndrome metabólico (SM) se define como un conjunto de alteraciones fisiológicas, bioquímicas y clínicas, cuya presencia aumenta el riesgo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), algunos tipos de cáncer y otras enfermedades como hígado graso no alcohólico, síndrome de ovario poliquístico,

enfermedades renales crónicas, entre otras (Esposito et al., 2012; Gutierrez-Solis & Banik, 2018).

Se han utilizado diferentes criterios para definir y diagnosticar el SM, la mayoría de ellos incluye la presencia de obesidad, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol HDL, e hipertensión. Uno de los criterios más utilizados es el propuesto por el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (ATP III), que define el SM por la presencia de 3 o más de las alteraciones recién mencionadas (Gutierrez-Solis & Banik, 2018).

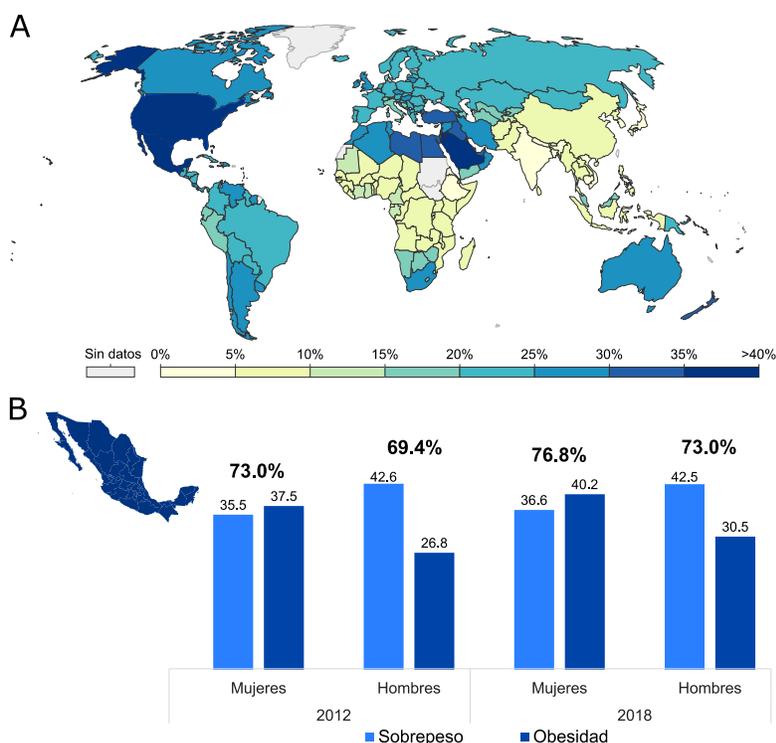
Hasta ahora, los intentos en la aplicación de terapias y/o medidas de prevención contra la obesidad y SM no han disminuido su alta prevalencia. Por ejemplo, las estrategias terapéuticas destinadas a controlar la obesidad incluyen intervenciones en el estilo de vida, tratamientos farmacológicos y cirugía bariátrica (Maffeis, 2019). Las modificaciones en el estilo de vida (como cambios en la dieta y ejercicio) son generalmente costosas y han sido propensas a la reincidencia en la mayoría de los pacientes. Por otro lado, los fármacos utilizados como tratamiento para obesidad, como el orlistat o lorcaserina, son por lo general costosos y se asocian a efectos adversos tras su uso a largo plazo. El uso de lorcaserina, por ejemplo, se ha asociado a una mayor frecuencia de cáncer colorectal, pancreático y de pulmón (Tak & Lee, 2020). Hasta el momento, la cirugía bariátrica es el método más efectivo para controlar la obesidad, aunque este procedimiento se asocia con riesgos y complicaciones quirúrgicas importantes (Zhang et al., 2019).

1.1.2 Situación en México.

En México, la situación es alarmante puesto que los índices de obesidad y SM son muy elevados. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2018, uno de cada tres niños (35.6 %) padece obesidad o sobrepeso (ENSANUT, 2018). Asimismo, Medina, O. *et. al.* reveló que el 44% de los niños mexicanos obesos o con sobrepeso presentan también SM (O. N. Medina et al., 2016).

En adultos la prevalencia es aún mayor: dos de cada tres (75.2 %) mexicanos mayores de 20 años son obesos o presentan sobrepeso (ENSANUT, 2018) (Figura 1). En cuanto a SM, un meta-análisis que incluye 15 artículos epidemiológicos (con cohortes que varían en un rango de 76 a 5240 individuos por estudio) reporta prevalencias de 54%, 48%, 36% y 31% en adultos mexicanos, utilizando los criterios *IDF*, *AHA/NHLBI*, *ATP III* y *OMS*, respectivamente (Gutierrez-Solis & Banik, 2018). En general, estos criterios consideran la presencia de las alteraciones metabólicas previamente mencionadas y sus diferencias pueden ser consultadas en este meta-análisis. Con estos altos índices, no es de asombrarse que las principales causas de muerte en este país sean las ECV (20.1 %), DM2 (15.2 %) y cáncer (12.0%) (INEGI, 2018). Se requieren de nuevas, seguras y efectivas terapias para frenar la creciente prevalencia de la obesidad y SM metabólico en nuestro país.

Figura 1. (A) Obesidad en población adulta a nivel mundial (Datos e imagen obtenidos de la Organización Mundial de la Salud, consultados en 2020). (B) Porcentaje de obesidad y sobrepeso en población adulta mexicana (20 o más años de edad). El sobrepeso se define por presentar un índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 y la obesidad $IMC > 30$ (Datos e imagen obtenidos de Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018).



1.1.3. Fisiopatología

La patogénesis del síndrome metabólico no se ha elucidado por completo pero se han descrito diversas hipótesis de los mecanismos involucrados. Actualmente, el más aceptado involucra a la resistencia a la insulina con flujo de ácidos grasos e inflamación crónica de bajo grado (McCracken et al., 2018).

La resistencia a la insulina se define como la disminución en la sensibilidad o respuesta a las acciones metabólicas de la insulina sobre sus órganos blanco generando glucotoxicidad, lipotoxicidad e inflamación. Asimismo, el exceso de tejido adiposo que caracteriza a la obesidad, juega un papel importante en la inducción de la resistencia a la insulina. Los adipocitos y los macrófagos (infiltrados en este tejido) liberan citocinas proinflamatorias que promueven el desarrollo de un estado subclínico de inflamación crónica. Estas citocinas, pueden interferir en la vía de señalización de la insulina en las células blanco, propiciando así la resistencia (G. Medina et al., 2018).

En los últimos años, se han incrementado las evidencias de la fuerte asociación que existe entre la microbiota intestinal y diversas enfermedades como obesidad, SM, y DM2, pudiendo tener un papel importante en la patogénesis (Dabke et al., 2019; Festi et al., 2014).

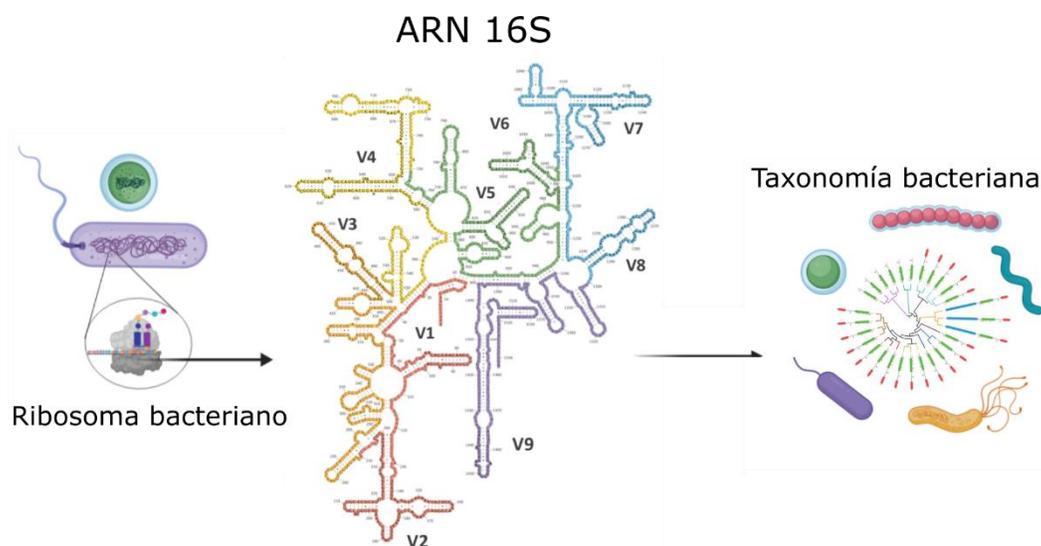
1.2. La microbiota intestinal

El cuerpo humano es colonizado por una gran diversidad de microorganismos incluyendo bacterias, arqueas, hongos, protozoos, así como virus de eucariotas y procariotas. El conjunto de estos microorganismos constituyen la microbiota, la cual está presente en cada parte del cuerpo humano expuesta al ambiente externo (piel, tracto gastrointestinal, respiratorio y genital) (Gilbert et al., 2018).

La gran mayoría de los estudios que reportan la composición de la microbiota se enfocan en la fracción bacteriana (Duerkopid, 2018). El ARN ribosomal 16S (o 16S rARN) es el componente de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, y está compuesto por 9 regiones hipervariables (V1-V9), que han sido ampliamente utilizadas como marcadores para estudiar la taxonomía y filogenia de bacterias (Figura 2). Las

investigaciones realizadas por secuenciación masiva de este gen y por metagenoma de tipo *shot-gun* han permitido la determinación de la composición de comunidades bacterianas en diferentes ambientes (Rajendhran & Gunasekaran, 2011).

Figura 2. El gen que codifica para el ARN 16S del ribosomal bacteriano consta de 9 regiones hipervariables y es un marcador filogenético.



En el tracto gastro-intestinal de humanos y en ratones (uno de los modelos animales más utilizados para el estudio de la microbiota (Hugenholtz & de Vos, 2018)) predominan las bacterias de los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria. La composición y complejidad varía dentro de las diferentes regiones del tracto gastrointestinal. El mayor número de especies se concentran en los segmentos distales, principalmente en el colon, donde predominan los filos Firmicutes y Bacteroidetes en humanos y ratones, mientras que sólo unas pocas especies habitan el estómago (Dieterich et al., 2018).

Otro componente abundante e importante de la microbiota son los virus, la mayoría de ellos son bacteriófagos (Keen & Dantas, 2018) y se hablará de ellos más adelante. Los microorganismos eucariotas como hongos y protozoos constituyen una parte más pequeña pero potencialmente importante de la microbiota (Laforest-Lapointe &

Arrieta, 2018), aunque en este trabajo nos enfocaremos en el papel de las bacterias y los bacteriófagos.

La microbiota intestinal se encuentra en constante interacción con el hospedero y desempeñan funciones cruciales para mantener la homeostasis y salud física y mental de éste. Entre estas funciones se incluyen su contribución en el metabolismo y absorción de nutrientes provenientes de la dieta, metabolismo de xenobióticos, mantenimiento de la función de la barrera intestinal y del sistema inmune, así como la protección contra microorganismos patógenos (Conlon & Bird, 2015; Yadav et al., 2018). Las señales químicas de la microbiota pueden actuar localmente en el intestino pero también pueden tener efectos a nivel sistémico (por ejemplo, en el eje intestino-cerebro) (Duvallet et al., 2017).

La composición de la microbiota está influenciada por múltiples factores, incluyendo factores genéticos del hospedero, el tipo de parto (natural o cesárea), alimentación en la infancia puesto que la leche materna no es estéril, estilo de vida, consumo de medicamentos, especialmente antibióticos, y la dieta (Conlon & Bird, 2015; Wen & Duffy, 2017).

1.3 Microbiota intestinal en obesidad y síndrome metabólico.

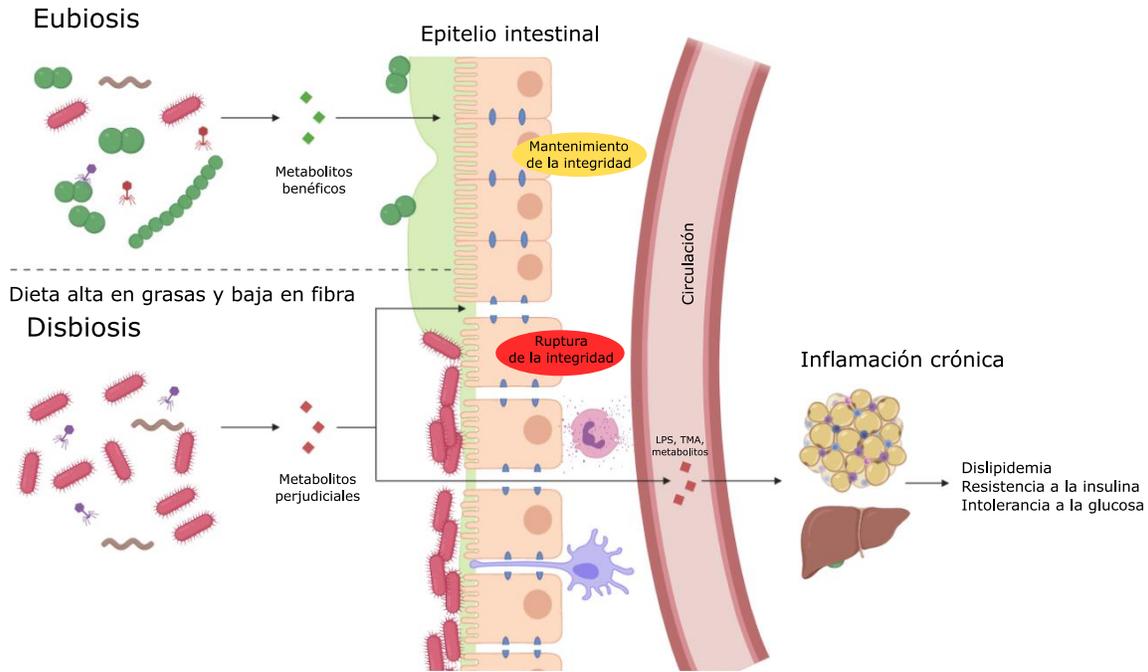
Se ha definido como disbiosis a los cambios en la composición, diversidad o función de la microbiota, que se asocian a un estado perjudicial de salud para el hospedero (Hegde et al., 2018). Diversas enfermedades se han asociado con una disbiosis intestinal, entre ellas se incluyen la obesidad y el SM, algunos tipos de cáncer (colorectal, hepatobiliar o gástrico), enfermedades neurológicas (Alzheimer, Parkinson o autismo) y autoinmunes como esclerosis múltiple (Cryan et al., 2020; Duvallet et al., 2017; Helmink et al., 2019).

Se han propuesto mecanismos que respaldan la conexión entre la microbiota y el metabolismo del hospedero. Se ha descrito que una dieta alta en grasas induce disbiosis intestinal, lo cual resulta en un incremento en metabolitos o productos microbianos perjudiciales que pueden alterar la integridad del epitelio intestinal (p. ej. por la alteración de las uniones estrechas entre los colonocitos). Esta pérdida de la integridad

aumenta su permeabilidad, es decir, permite el paso de metabolitos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o trimetilamina (TMA), hacia la circulación sistémica, contribuyendo en la inflamación crónica de hígado y del tejido adiposo, lo cual se asocia a enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y otras condiciones del síndrome metabólico (Figura 3)(Dabke et al., 2019). Aunado a esto, una dieta baja en fibra puede influir en la síntesis de metabolitos microbianos importantes en la regulación del metabolismo, la inmunidad y el comportamiento (Morrison et al., 2020). La falta prolongada de fibra se ha asociado a una mayor abundancia de bacterias capaces de degradar las mucinas que componen la mucosa intestinal, como *Akkermansia muciniphila* (Makki et al., 2018). Esta barrera es la primera línea de defensa física contra la invasión de bacterias, así que su daño puede incrementar el paso de bacterias o productos bacterianos y agravar lo antes mencionado (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

En la obesidad, diferentes estudios en humanos y animales han mostrado que existe una tendencia a tener menor diversidad bacteriana en individuos con obesidad en comparación con los normopeso. Sin embargo, este patrón no se replica en todos los estudios (Becerra et al., 2020; Castaner et al., 2018). En cuanto a diferencias en la composición taxonómica, en un principio, la obesidad se asociaba a un mayor ratio Firmicutes/Bacteroidetes, es decir, una mayor proporción de Firmicutes que de Bacteroidetes, de igual forma, esto no se reproduce con investigaciones más recientes en diferentes cohortes (Castaner et al., 2018). Probablemente, las discrepancias entre los estudios se deban a diferencias en la dieta, origen geográfico, estado metabólico entre las cohortes, o las metodologías experimentales y bioinformáticas empleadas para caracterizar la microbiota (Castaner et al., 2018; García-López et al., 2020).

Figura 3. Microbiota y metabolismo del hospedero. Una dieta alta en grasas promueve la ruptura de la integridad del epitelio intestinal, provocando la entrada de metabolitos o productos microbianos a la circulación sistémica, interfiriendo en el metabolismo del hospedero. Por otro lado, la falta de fibra provoca el daño de la mucosa intestinal por acción de bacterias que metabolizan las mucinas que componen esta barrera (Figura modificada de Dabke et al., 2019)



Así mismo, entre los distintos estudios se han identificado bacterias diferencialmente abundantes y que se asocian a esta patología. En un estudio publicado por López-Contreras (2018), analizando la región V4 del 16S rARN, reportan la composición de la microbiota de niños sanos y obesos mexicanos con alteraciones metabólicas, reportando a *Bacteroides eggertii* como diferencialmente abundante en los niños obesos, con respecto de los sanos. Por el contrario, hallaron a *Bacteroides plebeius* y miembros de la familia *Christensenellaceae* mayormente abundantes en los niños normopeso. La diversidad no fue significativamente diferente entre niños normopeso y obesos, pero sí correlacionó negativamente con la resistencia a la insulina. También la presencia de *Odoribacter* se correlacionó negativamente con los niveles de insulina y resistencia a la insulina (López-Contreras et al., 2018). Otro estudio reciente publicado por nuestro laboratorio mostró que en una cohorte de 27 niños mexicanos, se presenta una mayor riqueza de niños con obesidad y SM, en comparación con los normopeso. Asimismo, se encontró a *Collinsella aerofasciens* diferencialmente más abundante en los

niños obesos con SM en comparación con los niños normopeso o con los obesos (sin SM). Esta bacteria correlacionó positivamente con los niveles de triglicéridos y negativamente con el colesterol HDL (Becerra et al., 2020).

A pesar de existir asociación entre estas alteraciones metabólicas y la disbiosis intestinal, este tipo de estudios transversales por sí solos no pueden explicar una relación causa-efecto. Por su parte, los trasplantes de microbiota han aportado evidencia experimental convincente de la posible relación causal entre estos microorganismos y el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo a la obesidad y el SM (de Groot et al., 2017).

1.4 Microbiota del ratón, como modelo de estudio de la microbiota humana.

Los ratones son el modelo de elección para la mayoría de los estudios de microbiota, puesto que, con experimentos controlados, permiten estudiar las alteraciones y las complejas interacciones entre la microbiota y el hospedero (Nguyen et al., 2015). La microbiota intestinal de los ratones, al igual que la del humano, está dominada por los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Se ha encontrado que la microbiota de ambos mamíferos es cualitativamente similar, compartiendo alrededor de 80 géneros bacterianos, pero en términos cuantitativos se encuentran grandes diferencias, pues las proporciones entre los géneros más abundantes difieren entre ambas especies (Hugenholtz & de Vos, 2018). La microbiota intestinal murina varía entre cepas. La cepa C57BL/6 ha sido ampliamente utilizada en estudios de microbiota y en estudios de obesidad y alteraciones metabólicas, puesto que es capaz de desarrollar obesidad severa, elevada adiposidad, intolerancia a la glucosa y moderada resistencia a la insulina (Kleinert et al., 2018). La colonización intestinal de microbiota humana en esta cepa ha sido bastante exitosa: el 80% de los géneros bacterianos se encontraron en los ratones y en las muestras de los donantes humanos, lo cual no se ha reproducido con otras cepas (Hugenholtz & de Vos, 2018). Este modelo representa una herramienta poderosa en la investigación de la microbiota intestinal y ofrece la posibilidad de realizar experimentos que serían demasiado invasivos para los seres humanos.

1.5. Trasplantes de microbiota.

Hoy en día, sabemos que el trasplante de microbiota fecal (TMF) de un hospedero donador a uno receptor, puede transformar el fenotipo de éste (de Groot et al., 2017). A nivel clínico, el mejor ejemplo son los TMF que se han aplicado como tratamiento para infecciones por *Clostridium difficile* (ICD) desde hace más de 60 años, cuando el Dr. Eiseman (1958) trató a 4 pacientes con colitis pseudomembranosa grave causada por la infección por este patógeno. El tratamiento consistió en trasplantar infusiones de materia fecal proveniente de donadores sanos. Sorprendentemente, los pacientes se recuperaron rápida y completamente (de Groot et al., 2017). Desde este experimento, el TMF se ha aplicado ampliamente para tratar la infección por esta bacteria (Kim et al., 2018).

Asimismo, existe evidencia experimental en animales y humanos que respalda la conexión y el posible papel causal de la microbiota intestinal en el desarrollo de obesidad y SM. En 2006, el grupo de investigación de J. Gordon demostró una mayor ganancia de peso en ratones C57BL/6 libres de gérmenes (*Germen Free*, GF o gnotobióticos) que fueron trasplantados con microbiota cecal de ratones obesos, en comparación con los que recibieron el trasplante de donadores sanos (Turnbaugh et al., 2006). Asimismo, en otro estudio más reciente realizado en ratas con SM inducido por fructosa, se observó disminución en los niveles de triglicéridos plasmáticos y en intolerancia a la glucosa, tras recibir trasplantes fecales de ratas sanas (Di Luccia et. al. 2015).

Se han realizado trasplantes de microbiota de humano a ratón, observándose cambios en el fenotipo de estos animales. Ridaura et al (2013) fueron los primeros en introducir heces de humano en ratones GF (cepa C57BL/6), confirmando una mayor ganancia en el peso de los animales que recibieron materia fecal de una adolescente con obesidad, en comparación con los ratones tratados con las heces de su gemela delgada. Además, demostraron que la adquisición del fenotipo de obesidad en estos ratones se evita cuando se juntan en la misma jaula con los que recibieron la microbiota de la gemela

delgada. Este efecto de protección resultó ser dependiente de la dieta, puesto que se observó con la dieta normal pero no con la dieta alta en grasas (Ridaura et al., 2013).

Son limitados los estudios en humanos de TMF en SM. En 2012, Vrieze et. al. demostraron un aumento significativo en la sensibilidad a la insulina en pacientes que recibieron infusiones de microbiota intestinal provenientes de donadores sanos (Vrieze et al., 2012). Otro estudio, más reciente mostró el mismo efecto en pacientes obesos con síndrome metabólico, quienes mostraron mejoría después de 6 semanas de haber recibido el TMF de donadores sanos. Esto, además, correlacionó con cambios en la composición de la microbiota intestinal y con el incremento de metabolitos plasmáticos asociados a un estado metabólico saludable, como el ácido γ -aminobutírico (Kootte et al., 2017). Por el contrario, en otro estudio clínico reciente de doble ciego que involucró 24 adultos obesos con leve resistencia a la insulina, no se observó diferencia en los parámetros metabólicos al ser tratados semanalmente con cápsulas de microbiota fecal proveniente de donadores sanos durante 6 semanas, en comparación con el grupo que recibió el tratamiento placebo. Posiblemente, las diferencias entre los distintos estudios se deban a la heterogeneidad de las diferentes cohortes y la composición y/o diversidad de la microbiota de los donadores y los pacientes receptores. Se requieren de nuevos estudios para aumentar el éxito de estas intervenciones basadas en modular la microbiota de estos pacientes con la finalidad de mejorar su metabolismo (Yu et al., 2020).

1.6. Bacteriófagos intestinales.

Con respecto a los virus intestinales (virobiota o viroma intestinal), los bacteriófagos (o fagos) son los más abundantes y muestran una gran diversidad (Keen & Dantas, 2018).

Los fagos son virus que infectan bacterias específicas a través del reconocimiento de estructuras receptoras de la superficie bacteriana, y se han categorizado, de acuerdo a su ciclo de infección, en al menos dos subclases: fagos líticos (o virulentos) y temperados (o profagos-lisogénicos). Después de interactuar con la bacteria hospedero, el fago lítico inyecta su ADN a la célula y comienza la expresión de genes de virulencia que conducen al secuestro de la maquinaria celular para replicar el ADN del

fago y producir sus propias proteínas. Esto resulta en la producción de una gran cantidad de partículas virales dentro de la bacteria que termina con su lisis. Por el contrario, el ADN de los fagos temperados pueden integrarse al cromosoma bacteriano y replicarse junto con él en un estado latente. El genoma del fago temperado insertado en el bacteriano se denomina profago. Eventualmente, bajo ciertas condiciones se puede inducir la escisión de estos profagos y entrar en un ciclo lítico (Ganeshan & Hosseinidoust, 2019).

Los bacteriófagos y sus hospederos bacterianos se encuentran en perpetua interacción (De Sordi et al., 2019a). El conocimiento de la mayoría de estas interacciones proviene de estudios de fagos que infectan bacterias principalmente patógenas o de importancia clínica, bajo condiciones específicas de cultivo en el laboratorio. El concepto de infección de bacterias por fagos intuitivamente nos hace pensar en que esto traerá consecuencias negativas para la población bacteriana, sin embargo, esto no siempre es así. Los fagos participan en la transferencia horizontal de genes entre bacterias, es decir, pueden transferir información genética de una bacteria a otra proporcionándoles nuevas funciones, como una expansión en la capacidad metabólica, mayor tolerancia a estresores ambientales, resistencia a antibióticos, e incluso virulencia, que les confiere ventajas para sobrevivir en un nicho competitivo (Chatterjee & Duerkop, 2018; Keen & Dantas, 2018). Debido a la gran cantidad de integrasas en el análisis de viomas, se ha sugerido que la mayoría de los fagos en el intestino son temperados (Alejandro Reyes et al., 2010). Se ha determinado que diversos factores de estrés como la luz UV o antibióticos pueden inducir la escisión del profago del cromosoma bacteriano, activándose así la forma virulenta (De Sordi et al., 2019). Algunos componentes de la dieta han mostrado tener efecto en la inducción *in vitro* de profagos en bacterias de la microbiota como *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Enterococcus faecalis* (Boling et al., 2020) y se ha visto que en el tracto gastrointestinal, la inflamación es un inductor de la escisión de estos virus. Aunque se ha asumido que la inducción de un profago resulta en la inevitable lisis de la célula bacteriana, en el caso del patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*, la inducción del profago ϕ 10403S no conduce a la muerte de esta bacteria, sino facilita la expresión de genes que le permiten escapar del fagosoma y así

sobrevivir (Keen & Dantas, 2018). Estos estudios nos dan una idea sobre lo que podría suceder en un ambiente complejo como lo es tracto gastrointestinal, y en cómo estos fagos pueden influir en la salud del hospedero.

2. ANTECEDENTES

La relación de los bacteriófagos intestinales y la salud o enfermedad del hospedero está comenzando a explorarse. Estos virus pueden desempeñar un papel importante en mantener el equilibrio de las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal (Carding et al., 2017). Algunos estudios reportan que los fagos superan a las bacterias en abundancia en el intestino (Duerkopid, 2018). La gran mayoría de estos pertenecen al orden de los *Caudovirales*, que incluye a las familias de doble cadena de ADN (*Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae*), y a las familias de ADN de cadena sencilla (*Microviridae* e *Inoviridae*)(Shkoporov & Hill, 2019).

Los bacteriófagos pueden jugar un papel importante en la inmunidad del hospedero frente a bacterias. Como se ha mencionado previamente, la mucosa intestinal es la primera línea de defensa física contra la invasión de bacterias (Vancamelbeke & Vermeire, 2017), y se ha propuesto que la adherencia de bacteriófagos a las mucinas (modelo *Bacteriophages adherence to mucus, BAM*) que componen el moco intestinal, constituye un mecanismo de inmunidad al hospedero al evitar la colonización e infiltración bacteriana a los tejidos subyacentes (Barr et al., 2013).

El análisis del viroma intestinal humano ha proporcionado evidencia del papel potencial de los virus en mantener la homeostasis o promover la enfermedad. Se ha observado además de disbiosis bacteriana, alteraciones en las poblaciones de virus en enfermedades como Diabetes Mellitus tipo 1 y 2, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, *Intestinal Bowel Disease*) y cáncer colorectal. En la Tabla 1 se resumen los hallazgos en las poblaciones virales, particularmente en los bacteriófagos, que se han hallado en estas enfermedades.

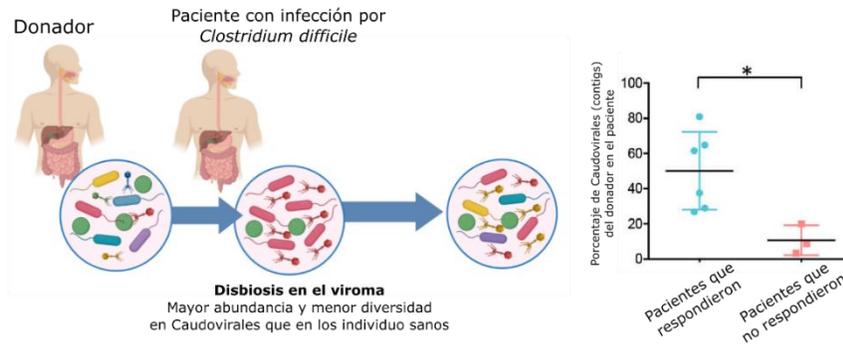
Tabla 1. Estudios de alteraciones en el fagoma intestinal en enfermedades humanas.

Enfermedad	Resultado	Referencia
Diabetes tipo 1 (DT1)	Menor diversidad Shannon y riqueza de <i>Myoviridae</i> y <i>Podoviridae</i> en niños con DT1 que en niños sin DT1.	Zhao et al., 2017
Diabetes tipo 2 (DT2)	Mayor en abundancia relativa de las familias <i>Podoviridae</i> y <i>Siphoviridae</i> en sujetos con DT2.	Ma et al., 2018
Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, <i>Intestinal Bowel Disease</i>)	Incremento en Caudovirales en individuos con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn.	Norman et al., 2016
Cáncer colorectal (CRC)	Los bacteriófagos de la familia <i>Siphoviridae</i> y <i>Myoviridae</i> se asociaron al CRC.	Hannigan et al., 2018
	Se observó una mayor diversidad en pacientes con CRC en comparación con individuos sanos y mayor abundancia de fagos <i>Inovirus</i> y <i>Tonalikevirus</i>	Nakatsu et al., 2018
Infección por <i>Clostridium difficile</i> (ICD)	Mayor abundancia de <i>Caudovirales</i> y menor diversidad de éstos en pacientes con ICD.	Zuo et al., 2018

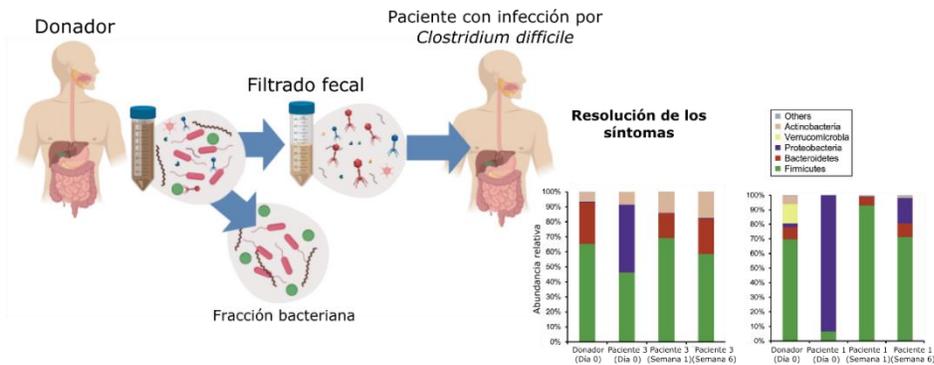
Tao, Z. et al. (2018) observaron que los pacientes con ICD, además de presentar disbiosis en las comunidades bacterianas, muestran también un viroma alterado, caracterizado por un incremento en la abundancia de *Caudovirales*, pero una menor diversidad de éstos, en comparación con individuos sanos. Además, observaron que el éxito del TMF en los pacientes con ICD se asocia con la riqueza de *Caudovirales* en los donadores y con la colonización post-TMF de estos virus en los pacientes, lo cual sugiere que los fagos pueden ser componentes importantes del TMF (Figura 4A). Los autores señalan que estos virus tienen el potencial de alterar la composición y función de la microbiota del hospedero y así influir en los resultados del tratamiento (Zuo et al., 2018).

Figura 4. Trasplantes de comunidades virales en enfermedades asociadas a disbiosis. (A) Zuo et al (2018) muestran que los pacientes con infección por *Clostridium difficile* muestran disbiosis en el viroma y que los pacientes que responden al trasplante de microbiota fecal presentan una mayor proporción de virus del donador que aquellos que no responden. (B) Ott et al (2017) reportan que el trasplante de filtrados fecales (sin la fracción bacteriana) fue suficiente para la resolución de los síntomas en 5 pacientes con infección severa por *C. difficile*. (C) Reyes et. al mostró que las poblaciones bacterianas en el intestino pueden ser moduladas tras la inoculación por VLPs.

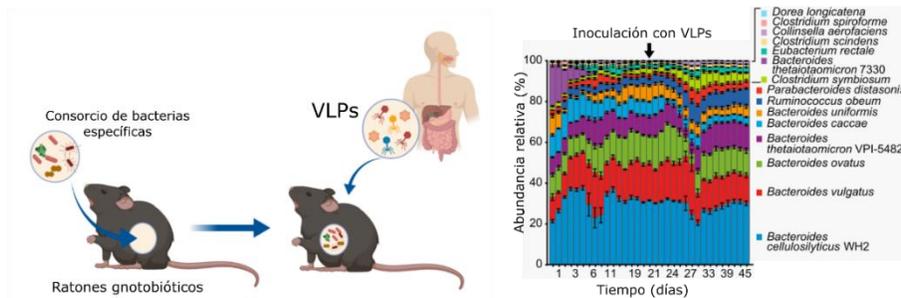
A



B



C



En otro estudio clínico, Stephan O. et. al (2017) trasplantaron filtrados (libres de bacterias) de la muestra fecal de donadores sanos a cinco pacientes con ICD, en lugar del convencional TMF donde se emplea la microbiota completa. Los pacientes internados fueron dados de alta al día siguiente de haber recibido el tratamiento, no presentaron efectos adversos y se mantuvieron libres de síntomas por al menos 6 meses. Asimismo, los análisis de 16S mostraron una restauración de la microbiota en los pacientes dentro de la primera semana post-tratamiento, asemejándose a la microbiota del respectivo donador (Figura 4B). Los autores mencionan la posible contribución de los bacteriófagos en el éxito de estos trasplantes (Ott et al., 2017).

Uno de los primeros experimentos realizados para determinar la influencia de los fagos sobre las bacterias en el intestino fue el realizado por Reyes, A. et. al (2013), en el cual se aislaron VLPs a partir de muestras fecales de humanos sanos, las cuales fueron inoculadas a ratones GF, colonizados previamente con un consorcio de bacterias específicas. Se observaron cambios en los perfiles taxonómicos bacterianos dentro de la primera semana post-inoculación (Figura 4C). Asimismo, se observó correlación en el incremento de los fagos introducidos con reducciones en bacterias particulares (A. Reyes et al., 2013).

En otro estudio similar pero más reciente, Bryan B. et al. (2019) determinaron la dinámica de la modulación de la microbiota intestinal por fagos líticos específicos en ratones gnotobióticos colonizados por un consorcio definido de bacterias comensales humanas, demostrando que estos virus no sólo inducen alteraciones cuantitativas en las bacterias susceptibles a ser infectadas, sino que también desencadenan efectos sobre otras bacterias no susceptibles (diminución o aumento), provocando, a su vez, cambios en la concentración de metabolitos que se sabe que afectan al hospedero (Hsu et al., 2019).

Recientemente, Lin, D. et. al (2019) realizaron un experimento sobre el efecto a corto plazo del trasplante de VLPs entre ratones. En este experimento observaron que la composición de la microbiota ileal de ratones mantenidos con dieta normal, al recibir VLPs de ratones obesos, tiende a migrar hacia una microbiota característica de la

obesidad. Asimismo, se observaron incrementos en la diversidad alfa (índices Shannon, chao1, Simpson y OTUs observados) en el grupo trasplantado con VLPs. El experimento se limita a determinar el efecto del tratamiento hasta el día 3 post-trasplante, por lo que no se sabe si estos cambios persisten (Lin et al., 2019). De esta manera, los bacteriófagos tienen el potencial de influir en la composición, estructura y función de la microbiota intestinal, y así, en la salud del hospedero.

Aunque, como se ha mencionado, la microbiota engloba diferentes tipos de microorganismos, a partir de ahora se empleará el término “microbiota intestinal” haciendo referencia únicamente a la fracción bacteriana, la cual será objeto de estudio en este trabajo.

3. HIPÓTESIS

Las partículas virales (VLPs) fecales de niños normopeso trasplantadas a ratones obesos con síndrome metabólico, inducen cambios en el perfil taxonómico y/o diversidad de la microbiota intestinal de estos animales dentro de 18 semanas post-trasplante.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto longitudinal de las VLPs aisladas de niños normopeso en la microbiota intestinal de ratones con obesidad y síndrome metabólico.

4.1. Objetivos específicos.

- Determinar si existe presencia de bacterias en la preparación de VLPs empleadas como inóculo en este experimento.
- Describir los cambios en el fenotipo de los ratones tras el trasplante con VLPs. y su asociación con la microbiota intestinal.
- Caracterizar la taxonomía y diversidad de la microbiota antes y después del transplante con VLPs.

5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación del trasplante de VLPs.

5.1.1. Donadores de VLPs.

Las VLPs a inocular fueron aisladas a partir de muestras fecales de 10 niños pareados por edad y por sexo residentes de la Ciudad de México, seleccionados a partir de una cohorte del Dr. Samuel Canizales de Instituto Nacional de Medicina Genómica, con quien colaboramos en el presente proyecto. Los niños presentaron las siguientes características:

- Mexicanos mestizos en al menos tres generaciones.
- 7 a 10 años de edad.
- Peso normal (percentil < 75 ajustado por edad y sexo).
- Niveles normales de triglicéridos (< 100 mg/dL).
- Niveles normales de colesterol HDL (> 50 mg/dL).

Criterios de exclusión:

- Enfermedades genéticas.
- Reciente pérdida de peso.
- Consumo de antibióticos dentro de los últimos 6 meses.
- Infecciones gastrointestinales o diarreas en los últimos 3 meses.

5.1.2. Extracción de VLPs.

Las muestras fecales de estos niños se sometieron a un proceso de filtración y lavados de acuerdo al protocolo de Reyes et al. para la obtención de VLPs: cada muestra fue resuspendida en buffer SM y se centrifugó a 4700 x g por 30 minutos para eliminar partículas grandes. El sobrenadante que contiene las VLPs se filtró para eliminar la fracción bacteriana utilizando un filtro de 0.45 µm. Posteriormente, este filtrado fue purificado utilizando un Amicon de 100KDa para retener las VLPs realizando lavados con buffer SM. Finalmente la fracción retenida que contiene las VLPs se resuspendió en el mismo buffer (A. Reyes et al., 2013). La presencia de VLPs y su cuantificación se determinó por microscopía de epifluorescencia. Posteriormente, las 10 muestras se

mezclaron en cantidades iguales en una muestra única (*pool-VLPs*) para servir de inóculo en el trasplante.

5.1.3. Control de Calidad de muestra de VLPs: Determinación de presencia de bacterias.

La posible presencia de bacterias viables y su caracterización en la muestras purificadas de VLPs, se determinaron por (1) cultivo y (2) secuenciación del gen 16S, y se complementó con los datos obtenidos en la cuantificación de estas muestras por microscopía de epifluorescencia.

1) Cultivo del *pool-VLPs*:

Se sembraron 5 μ L del *pool-VLPs* (2.2×10^7 de VLPs) y 5 μ L de buffer SM como control negativo en placas de agar sangre (agar-15%, NaCl-5%, infusión de músculo cardiaco-10%, peptona-10% y sangre humana-5% recién extraída por punción venosa) y se incubaron a 37 °C, por 72 horas bajo condiciones aerobias.

2) Secuenciación del 16S del *pool-VLPs*.

Se extrajo ADN de la muestra del *pool-VLPs* y se amplificó la región V3-V4 del gen 16S para su secuenciación empleando 12.5 ng de DNA, empleando la metodología que se describirá más adelante en el apartado 4.3.

5.2. Diseño experimental.

5.2.1. Animales.

Se emplearon 12 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 3 a 4 semanas de edad, los cuales fueron mezclados aleatoriamente durante 4 semanas y alimentados con una dieta estándar (3.1 kcal/g= 18.6% proteína, 44.2% carbohidratos y 6.2% grasa; Teklad Global 2018). Posteriormente, estos animales fueron separados en 2 grupos experimentales "*Control*" y "*VLPs*" (6 ratones por grupo), cada uno dividido en dos jaulas de 3 ratones cada una. A partir de este momento, ambos grupos fueron alimentados durante 14 semanas con dieta alta en grasas (5.24 kcal/g= 20% proteína, 20% carbohidratos y 60 % de grasas; *Research Diets* cat. D12492) para desarrollar el

modelo de obesidad-síndrome metabólico previamente estandarizado por la estudiante de doctorado Rubiceli Manzo Durán del Grupo de la Dra. Leonor Pérez del IBT, con quienes colaboramos en el presente proyecto. Este modelo se caracteriza por presentar obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hipertrigliceridemia.

Este momento previo al trasplante será referido de ahora en adelante como “Pre-trasplante” o “Día 0”.

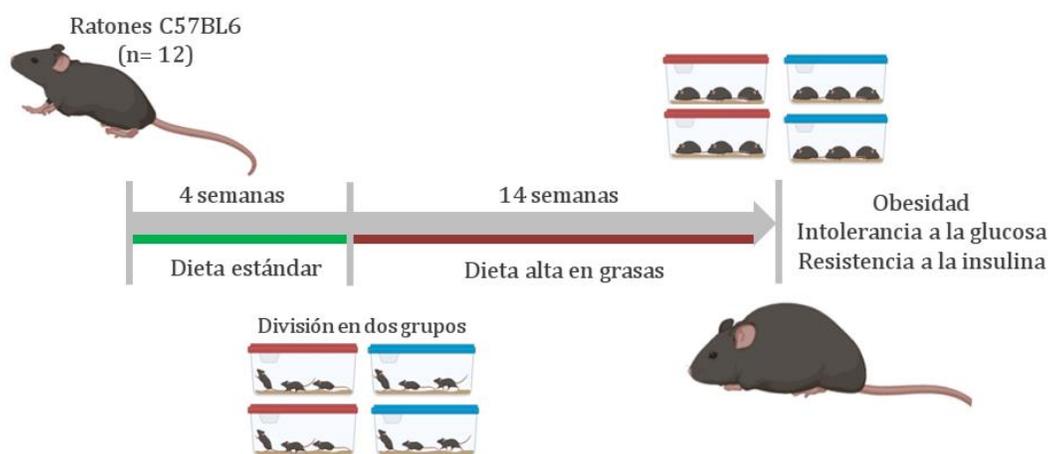


Figura 5. Desarrollo del modelo murino experimental de obesidad y alteraciones metabólicas. Ratones C57BL6 macho (n=12) de 3-4 semanas de edad fueron alimentados con dieta estándar por 4 semanas. Posteriormente, estos animales fueron divididos en 2 grupos de 6 ratones (3 por cada jaula) y se les cambió a una dieta alta en grasas que mantuvieron por 14 semanas hasta desarrollar obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Modelo murino de obesidad y síndrome metabólico estandarizado por Rubiceli Manzo Durán, del grupo de investigación de la doctora Leonor Pérez).

5.2.2. Trasplante de VLPs.

Para neutralizar el pH gástrico de los ratones, se administraron 100 μL de NaHCO_3 al 1.33%. Posteriormente, cada grupo de ratones recibió por vía oral el tratamiento correspondiente: 200 μL de buffer SM para el grupo *Control*, mientras que el grupo *VLPs* recibió 200 μL de la suspensión con VLPs (4.4×10^8 VLPs). Ambos grupos permanecieron con dieta alta en grasas durante 18 semanas y al término de este tiempo

los ratones fueron sacrificados. Se colectaron las muestras fecales de cada ratón en el Día 0, diariamente durante la primera semana post-trasplante, y semanalmente hasta el final del experimento. Las muestras se preservaron en solución de *RNA Later* (Invitrogen) a -70 °C. Los ratones fueron pesados cada semana.

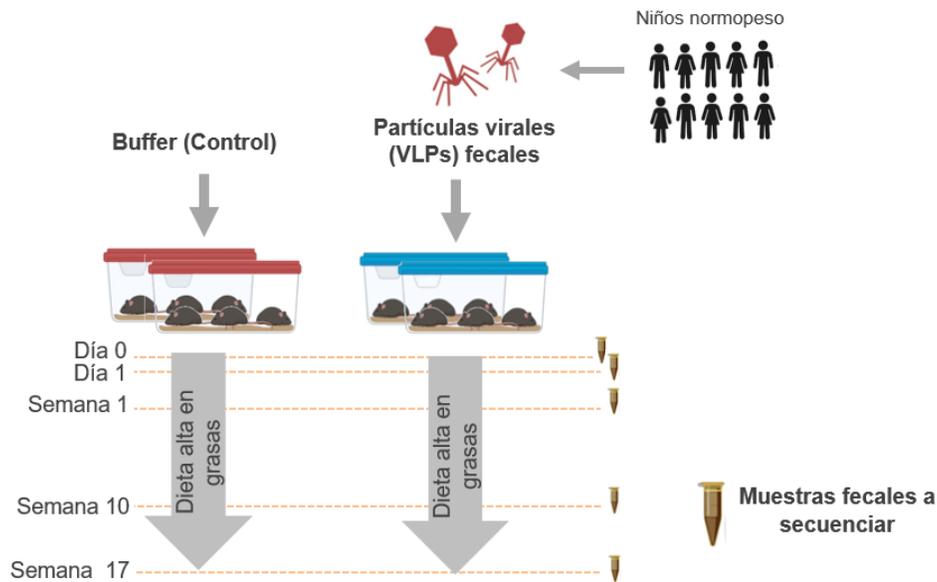


Figura 6. Trasplante de partículas virales (VLPs). Dos grupos de 6 ratones macho de la cepa C57BL/6 obesos y con alteraciones metabólicas (resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa) recibieron un trasplante de VLPs aisladas de muestras fecales de niños mexicanos normopeso, o buffer como control. Después del tratamiento, ambos grupos se mantuvieron con dieta alta en grasas durante 18 semanas. Se secuenciaron muestras fecales en el día 0 (antes del trasplante) y en el día 1, semana 1, 10 y 17 post-trasplante.

5.2.3. Pruebas metabólicas.

Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa en las semanas 10 y 17 post-trasplante, y de resistencia a la insulina en las semanas 11 y 18 post-trasplante. La primera consistió en la administración de glucosa, seguida de su medición en sangre al transcurrir 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Mientras que para realizar la prueba de resistencia a la insulina se administró insulina, determinando de igual manera los niveles de glucosa en los mismos intervalos de tiempo. La administración de glucosa o insulina se realizó por vía intraperitoneal y la glucosa fue medida con ayuda de un glucómetro tomando la muestra sanguínea a partir de la cola del roedor.

5.3. Caracterización de la microbiota por secuenciación del gen 16S.

5.3.1. Selección de muestras.

Con el objetivo de determinar la dinámica de la microbiota intestinal tras el trasplante de VLPs, se seleccionaron las muestras fecales obtenidas en cinco diferentes puntos del tratamiento: día 0, día 1, semana 1, 10 y 17 post-trasplante. Asimismo, para secuenciar se seleccionaron 4 ratones por grupo (2 por cada caja), excluyendo a los ratones con mayor peso en el Día 0.

Como parte de la estandarización previa del método, utilizando muestras fecales de un grupo de ratones obesos ajenos al experimento (n=5), se evaluó la diferencia entre extraer el ADN por separado de cada muestra, para luego ser mezclados en una sola reacción a secuenciar (*pool* de ADN) *versus* mezclar las muestras fecales (*pool* de heces) realizando así una sola extracción y secuenciación.

Finalmente, se decidió extraer el ADN genómico y secuenciar las muestras fecales de forma individual, seleccionando de esta manera un total de 40 muestras (2 grupos x 4 ratones x 5 días= 40). En la Tabla S1 se presentan las muestras a secuenciar con los identificadores que se manejarán de aquí en adelante.

5.3.2. Extracción de ADN.

La extracción del ADN genómico se realizó con el kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe (Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante sin modificaciones, eluyendo el ADN en 50 μ L de agua. La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % y se cuantificó con Qubit™.

5.3.3. Amplificación del gen 16S y secuenciación masiva.

Para la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S se emplearon los siguientes oligonucleótidos o *primers* universales:

Forward Primer =

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse Primer =

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Se utilizaron 12.5 ng de ADN como templado. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 min; 25 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg; y finalmente a 72 °C por 5 min. En la Tabla S1 se presenta la mezcla de PCR de cada muestra. Los productos obtenidos de ~500 pb fueron purificados utilizando perlas magnéticas (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) con el fin de eliminar restos de oligonucleótidos y secuencias cortas.

Los amplicones purificados fueron mezclados con diferentes secuencias *barcodes* en proporción equimolar para su secuenciación pareada en la plataforma de *Illumina Miseq* (2x250) de acuerdo al protocolo estándar.

5.3.4. Procesamiento bioinformático de las secuencias del gen 16S:

5.3.4.1. Control de calidad de las secuencias.

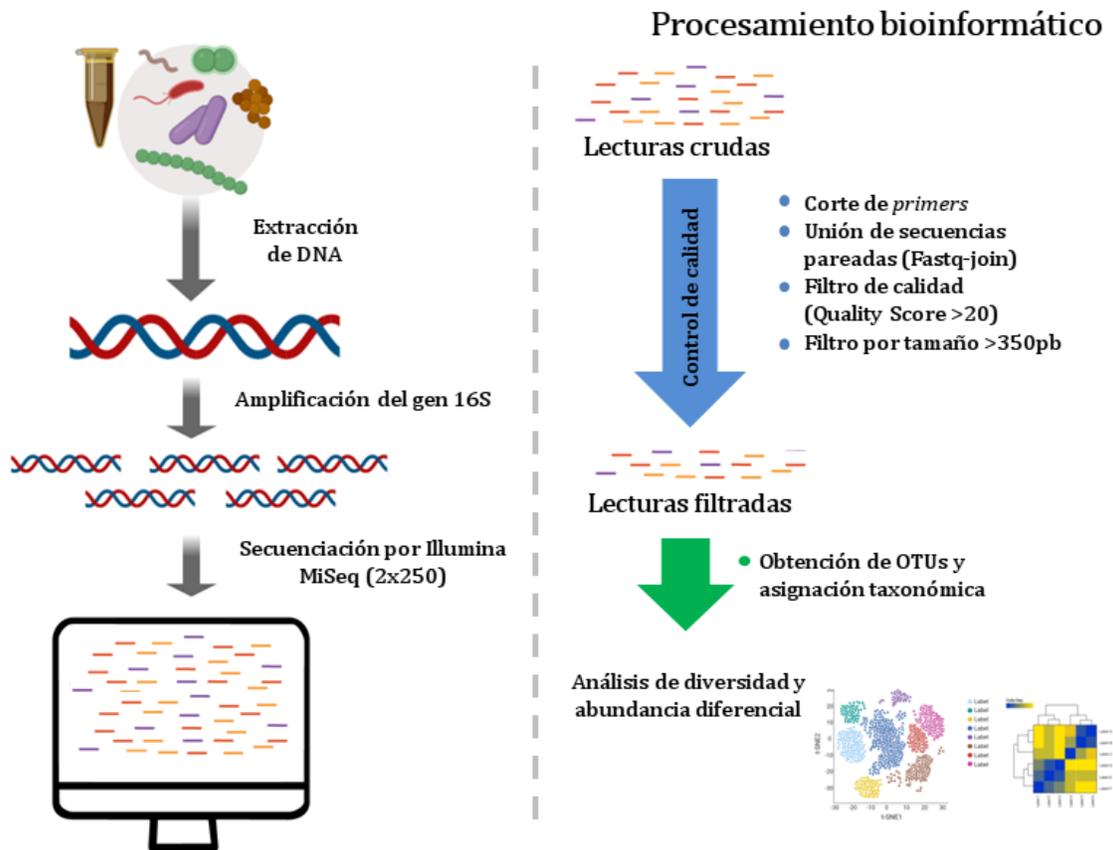
En la Figura 7 se esquematiza el análisis bioinformático empleado. Se obtuvieron, para cada muestra secuenciada, dos archivos con lecturas (o secuencias) en formato Fastq, correspondientes a las cadenas pareadas *Forward* (R1) y *Reverse* (R2). Los primeros nucleótidos (nt) de cada una de las lecturas (extremo 5') corresponden a los *primers* utilizados para la amplificación. Estos fueron removidos cortando 17 y 21 nt en los extremos 5' de la R1 y R2, respectivamente, utilizando *Fastx_trimmer* (Fastx Tools).

Se visualizó la calidad de las lecturas con *Fastqc* y, por decrementos en la calidad, se cortaron las secuencias R2 en el extremo final (3') dejándolas a una longitud de 220 nt. La unión de las lecturas R1 y R2 se realizó usando *Fastq-join* (Bioconda).

Posteriormente, con la herramienta *Sliding Window* del programa *Trimmomatic*, las lecturas fueron filtradas usando ventanas de 4 nucleótidos aceptando puntuaciones de

calidad iguales o superiores a 20. Finalmente, se filtraron las secuencias de longitud igual o mayor a 350 nt para asegurar regiones V3-V4 completas del gen 16S (García-López et al., 2020).

Figura 7. Diagrama de flujo metodológico general para la caracterización de la microbiota fecal por secuenciación del gen 16S.



5.3.4.2. Obtención de OTUs y asignación taxonómica.

La asignación taxonómica bacteriana de las lecturas filtradas se realizó con QIIME v.1.9. Para la obtención de *Operational Taxonomic Units* (OTUs) se utilizó el método de referencia cerrada (comando `pick_closed_reference_otus.py`) empleando la base de datos *GreenGenes*. La tabla de OTUs obtenida se filtró eliminando aquellos con abundancia menor al 0.1%, con el objetivo de analizar el *core* de la microbiota,

eliminando OTUs raros o transitorios, o potenciales errores de secuenciación (Astudillo-García et al., 2017).

Se calcularon los índices de diversidad alfa: Shannon, Chao1 y *Observed OTUs*, empleando 10000 rarefacciones a la profundidad de la muestra más pequeña, utilizando el comando *alpha_rarefaction.py* de QIIME v.1.9. La diversidad beta se determinó empleando las distancias Bray Curtis, Jaccard y UNIFRAC (*weighted* y *unweighted*), y se utilizó el análisis de coordenadas principales (PCoA) para visualizar la proximidad (similitud) o lejanía (disimilitud) de las muestras en los gráficos de dos dimensiones. El análisis de abundancia diferencial de bacterias entre grupos se realizó con DESeq2, empleando el servidor web *Microbiome Analyst* (Dhariwal et al., 2017).

5.4. Análisis estadístico.

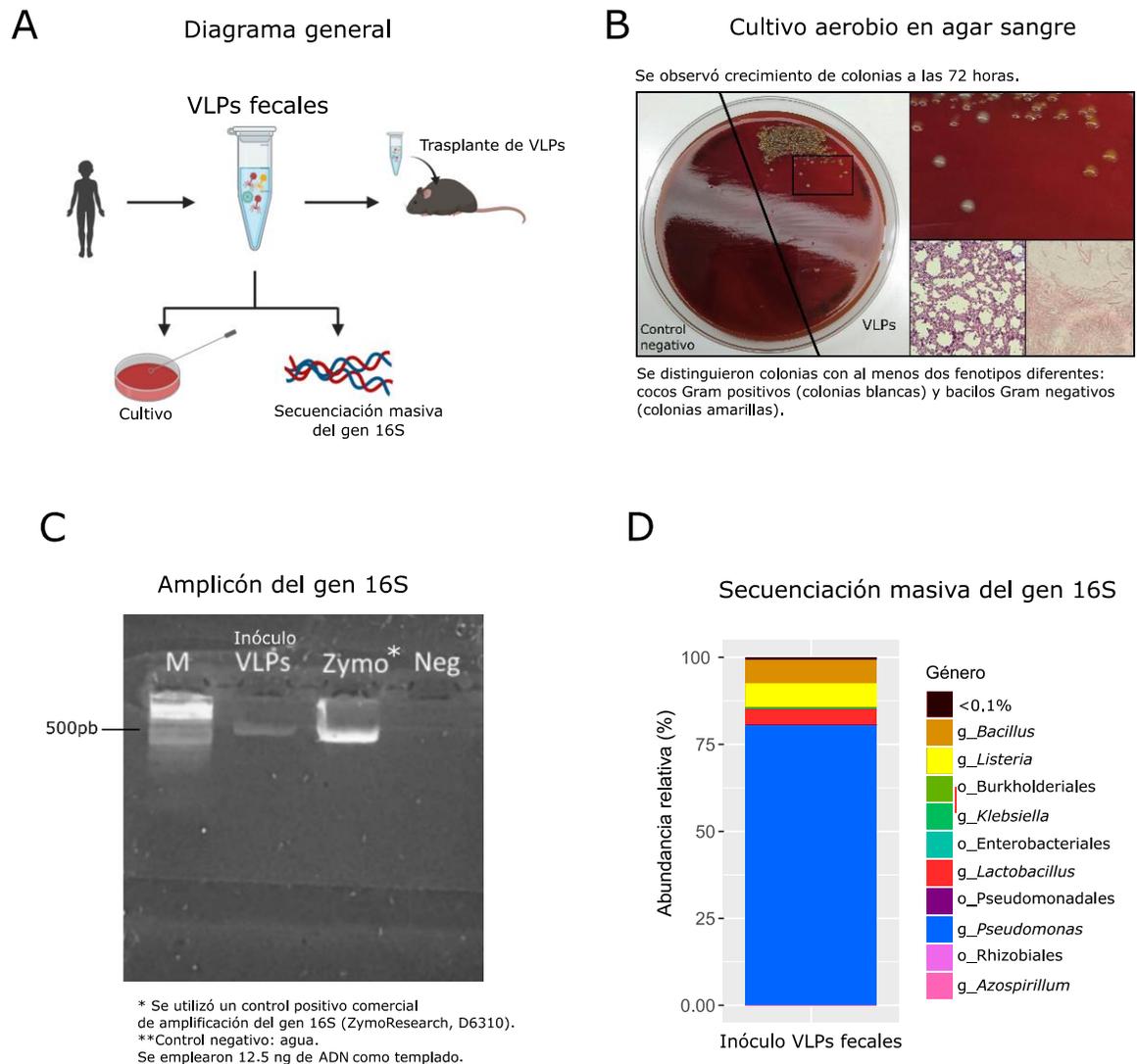
Las comparaciones entre los grupos del peso y las pruebas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, se realizaron utilizando pruebas *t de Student*, empleando la función *compare_means* de la paquetería básica de R, con un previo análisis de la normalidad de los datos por una prueba de *Shapiro*. El área bajo la curva de glucosa se calculó con la función *AUC* de la librería *DescTools* de R, empleando el método del trapezoide (Kc et al., 2018). Para las comparaciones en la beta diversidad de la microbiota se utilizó el método no paramétrico ANOSIM empleando 999 permutaciones, con previa evaluación de la dispersión empleando *Betadisper* de la librería *Vegan* de R. La abundancia diferencial de grupos taxonómicos se realizó por el método DESeq2, tomando como significativos valores de $FDR < 0.05$ y un punto de corte de *log₂fold changes (log₂FC)* de 1.5 (Dhariwal et al., 2017).

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de bacterias en inóculo de VLPs.

Se determinó la presencia de bacterias en la muestra de VLPs fecales que sirvió de inóculo en este experimento (Figura 8A). La cuantificación previa por microscopía de epifluorescencia mostró que la cantidad de VLPs (2.2×10^6 VLPs/ μ L) es mayor en comparación al número de potenciales células bacterianas (5×10^5 bacterias/ μ L), representando el 81,4% vs. el 18.6% de las partículas fluorescentes presentes en las micrográficas, respectivamente. Para determinar la presencia de bacterias viables se realizó un cultivo aerobio en agar sangre de la muestra de VLPs, donde se pudieron observar colonias de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, indicando la presencia de bacterias vivas posiblemente en baja cantidad, puesto que las colonias se hicieron visibles hasta las 72 hrs (Figura 8B). Ante la imposibilidad de aislar e identificar la totalidad de bacterias viables por cultivo, se prosiguió a caracterizar la muestra de VLPs por secuenciación masiva del gen 16S. La amplificación de la región V3-V4 generó una banda tenue en comparación con un control positivo (Figura 8C), empleando la misma cantidad de DNA (12.5 ng), lo cual sugiere que la cantidad de ADN bacteriano es baja en relación al ADN total de dicha muestra. La secuenciación mostró una predominancia de *Pseudomonas* (76.2%), seguida de *Listeria seeligeri* (6.8%), *Bacillus* (6.7%) y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (4.5%). El resto de las secuencias asignadas corresponde a bacterias con abundancia menor al 1% (Figura 8D). Teniendo en cuenta que la secuenciación del ADN bacteriano no nos permite saber si éste se encuentra dentro de células bacterianas viables, no podemos excluir que cierta proporción se trate de ADN libre en el medio o de bacterias muertas. Con estos resultados consideramos que si llega a existir presencia de bacterias viables en el inóculo de VLPs sería mínima, y su posible transferencia y colonización en los ratones durante el trasplante será abordado más adelante en el apartado 5.5.

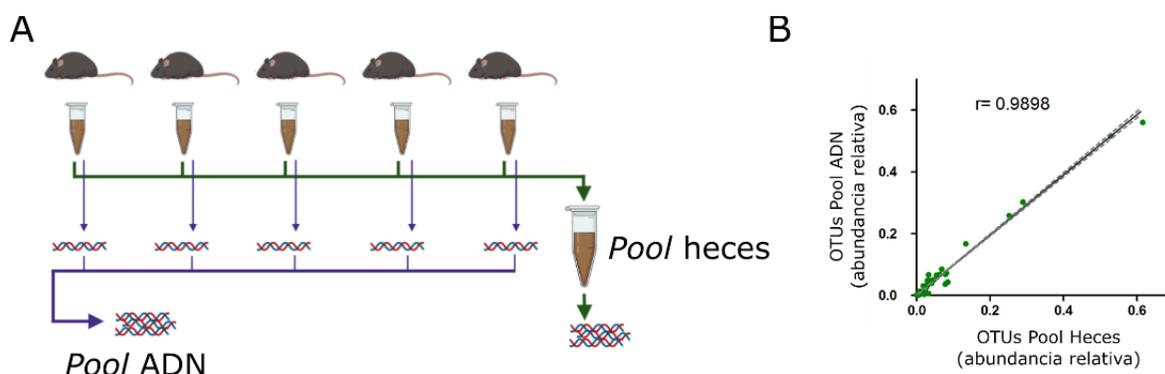
Figura 8. Presencia y caracterización de bacterias o en el inóculo de VLPs fecales. (A) Diagrama general: Se extrajeron partículas virales (VLPs) fecales de niños normopeso. Se realizó un cultivo aerobio y se caracterizó el ADN bacteriano presente por secuenciación masiva del gen 16S (región V3-V4) en esta muestra de VLPs. (B) Cultivo en agar sangre (37 °C bajo condiciones aerobias). Dentro de las primeras 48 horas no se observó crecimiento. (C) Producto de amplificación (amplicón) del gen 16S de la muestra de VLPs. La banda esperada de ~500pb se observa tenue en comparación con el control positivo de amplificación. En ambos se emplea 12.5 ng de DNA (D) Perfil de 16S de la muestra de VLPs fecales. Se presenta la abundancia relativa a nivel de género.



6.2. Caracterización de la microbiota intestinal por secuenciación del gen 16S (Estudio piloto).

Como estudio piloto para estandarizar la técnica de secuenciación y los análisis bioinformáticos, utilizando muestras fecales de un grupo de ratones obesos ajenos al experimento ($n=5$), se evaluó la diferencia entre extraer el ADN por separado de cada muestra, para luego ser mezclados en una sola reacción a secuenciar (*pool* de ADN) *versus* mezclar las muestras fecales (*pool* de heces) realizando así una sola extracción y secuenciación (Figura 9A). Se realizó la secuenciación masiva del gen 16S (región V3-V4) de ambas muestras. Se obtuvo una buena correlación entre las dos muestras en términos de la abundancia relativa a nivel de OTUs (Figura 9B), lo cual indica que no hay diferencia entre realizar *pool* de muestras fecales o de ADN. Aunque finalmente, para este experimento decidimos extraer y secuenciar las muestras de manera individual sin realizar *pools*, los resultados de este estudio piloto son de utilidad para el laboratorio al momento de decidir cómo extraer y secuenciar las muestras en futuros experimentos con la finalidad de disminuir costos.

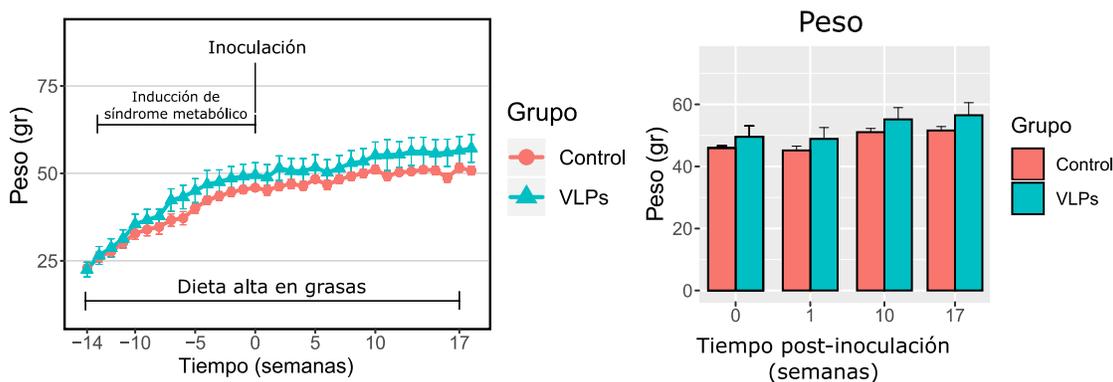
Figura 9. Estudio piloto. (A) Diagrama de flujo; como parte de la estandarización previa del método, utilizando muestras fecales de un grupo de ratones obesos ajenos al experimento ($n=5$), se evaluó la diferencia entre extraer el ADN por separado de cada muestra, para luego ser mezclados en una sola reacción a secuenciar (*pool* de ADN) *versus* mezclar las muestras fecales (*pool* de heces) realizando así una sola extracción y secuenciación. Ambas muestras se secuenciaron (región V3-V4 del gen 16S) (B) Correlación entre la abundancia relativa de OTUs de ambas muestras.



6.3. Trasplante de VLPs.

Dos grupos de ratones fueron alimentados con DAG durante 14 semanas para inducir obesidad y alteraciones metabólicas, y fueron posteriormente inoculados con VLPs (n=6) o buffer (Control, n=6). Después del tratamiento, estos animales se mantuvieron con esta misma dieta durante 18 semanas (Ver Diagrama Experimental en Figuras 5 y 6). Como era de esperarse, estos ratones aumentaron de peso rápida y significativamente durante las primeras 14 semanas en respuesta a la DAG (de 23.5 ± 3.9 g a 49.6 ± 6.6 g, $p < 1 \times 10^{-8}$). Continuando con esta dieta, los dos grupos mantuvieron su tendencia de aumento de peso después del tratamiento y hasta el final del experimento, sin diferencias significativas entre ambos (Figura 10).

Figura 10. Peso de los ratones durante la inducción del síndrome metabólico con dieta alta en grasas y después de la inoculación con VLPs (n=6) o buffer (Control, n=6). Los puntos corresponden a la mediana de cada grupo con su error estándar. El 0 corresponde al día de la inoculación. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos.



6.2.1. Pruebas de Tolerancia a la Glucosa y Resistencia a la Insulina.

En las curvas de las Figuras 11A se puede observar que después de la administración intraperitoneal de glucosa, los niveles sanguíneos de este carbohidrato se elevan alcanzando su punto máximo después de 30 y 60 min, y tienden a regresar a los valores basales después de 120 min. En los ratones inoculados con VLPs, en la semana 17 post-trasplante se observa que este punto máximo de glucosa sérica tiende a ser menor en comparación con el control, especialmente en el minuto 60 (Figura 11A). Este efecto de disminución se ve reflejado en el área bajo curva (ABC) (Figura 11B), indicando una

tendencia de aumento en la tolerancia a la glucosa en los ratones trasplantados con VLPs en la semana 17. Además, en este grupo, estos valores de glucosa (minuto 60) y de ABC son significativamente menores a los del día 0 ($p=0.047$ y $p=0.031$, Figuras 11A y 11B). Con respecto a la prueba de resistencia a la insulina no se observaron tendencias marcadas ni diferencias significativas en los puntos de la curva ni en el ABC entre los grupos, ni comparando contra el día 0 (Figura 12).

Figura 11. Prueba de Tolerancia a la Glucosa. (A) Curvas de concentración de glucosa sérica promedio antes (0 min) y después (15, 30, 60 y 120 min) de la administración intraperitoneal de glucosa, en los días 0 (pre-trasplante) y semanas 10 y 17 post-trasplante, de los grupos inoculados con VLPs ($n=6$) y buffer (Control, $n=6$). **(B)** Mediana del área bajo la curva con error estándar. Significancia: $*p < 0.05$.

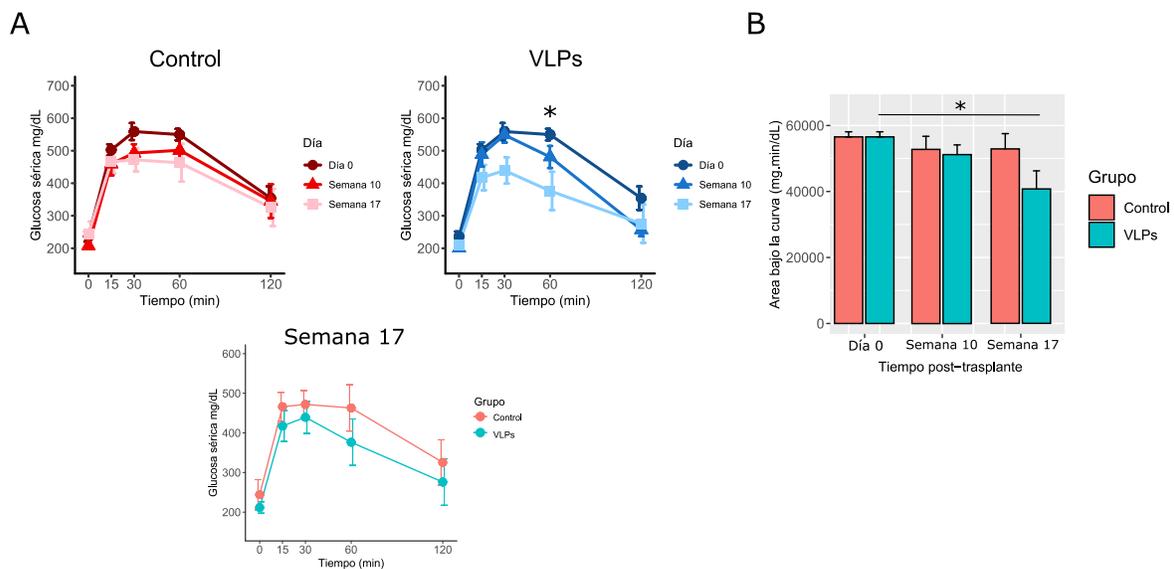
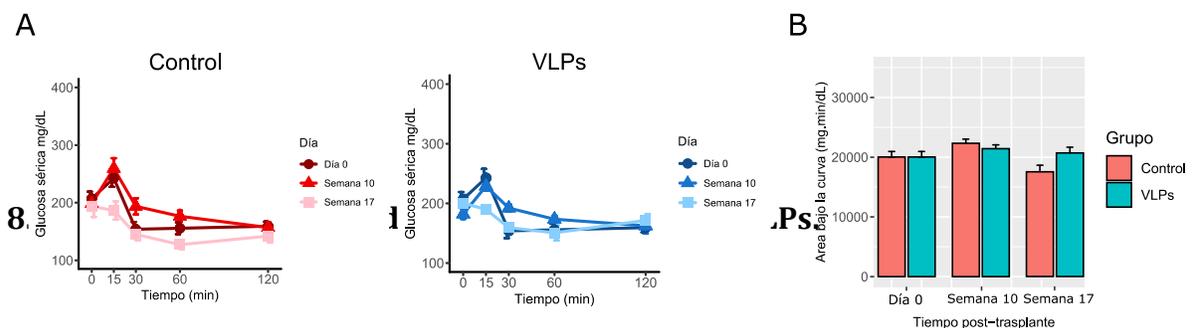
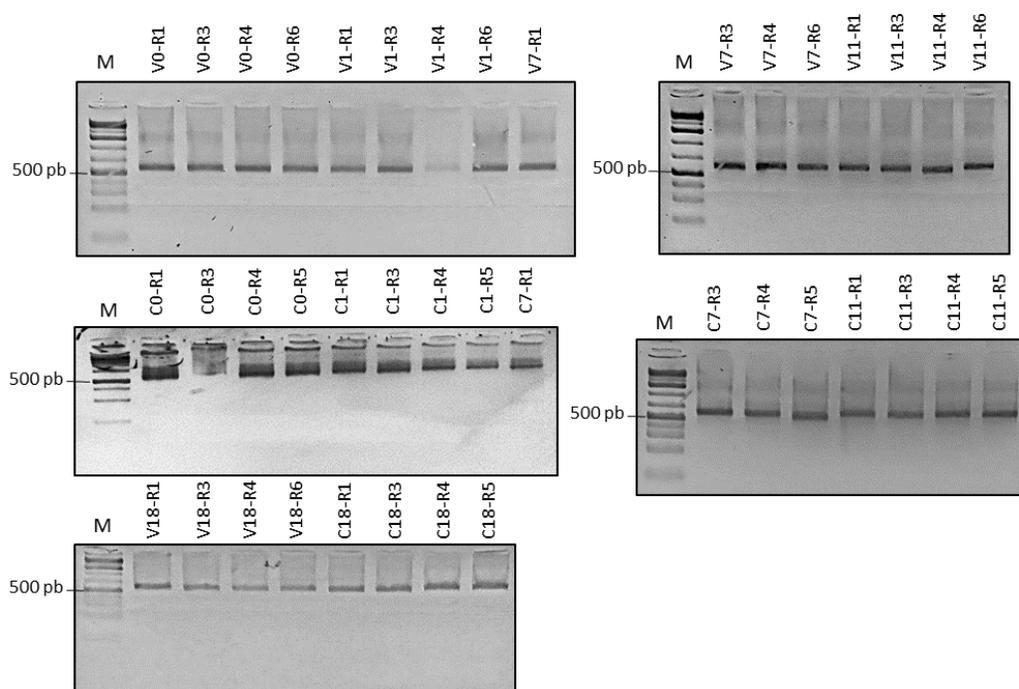


Figura 12. Prueba de Resistencia a la insulina. (A) Curva de concentración de glucosa sérica promedio antes (0 min) y después (15, 30, 60 y 120 min) de la administración intraperitoneal de insulina, en los días 0 (pre-trasplante) y semanas 10 y 17 post-trasplante de los grupos inoculados con VLPs ($n=6$) y Control ($n=6$). **(B)** Área bajo la curva.



Para determinar los cambios en la microbiota tras el trasplante con VLPs se seleccionaron 40 muestras, correspondientes a 4 ratones por grupo, secuenciando los días 0, 1, semanas 1, 10 y 17 post-trasplante (4 ratones x 2 grupos x 5 días= 40 muestras fecales). En la Figura 13 se presentan los geles de agarosa con las bandas de los amplicones esperados de ~500pb correspondientes a la región V3-V4 del gen 16S de estas muestras. La purificación con las perlas magnéticas logró eliminar las secuencias cortas.

Figura 13. Amplicones purificados (región V3-V4 del gen 16S) de muestras fecales de ratones inoculados con VLPs (V1-V20) y buffer control (C1-C20), en gel de agarosa al 2%.



6.4. Microbiota intestinal durante el trasplante con VLPs.

6.4.1. Procesamiento bioinformático de las secuencias

Se obtuvo una profundidad de secuenciación de 4,105,710 lecturas crudas por las 40 muestras, distribuidas en un rango de 58,811-118,199 lecturas por muestra, excepto la identificada como C0-R1 que contuvo 737,239, de la cual se realizó posteriormente un sub-muestreo al azar a la profundidad media del resto de las muestras. En promedio, el $95.3 \pm 0.7\%$ de estas secuencias pareadas lograron unirse con *Fastq-join* y el $99.9 \pm 0.01\%$ se mantuvieron después del filtro de calidad ($QS > 20$), de las cuales se

conservaron el $61.7 \pm 1.9\%$ aplicando el filtro por tamaño ($>350\text{pb}$) (García-López et al., 2020), en un rango de 31,761-69,484 lecturas por muestra. De estas, se asignaron el $44.5 \pm 2.7\%$ por QIIME, obteniendo un total de 2,681 OTUs diferentes, correspondientes a 12 filos, 22 clases, 38 órdenes, 74 familias, 99 géneros y 51 especies diferentes. Con la finalidad de analizar únicamente el “core” de la microbiota se eliminaron OTUs con abundancia menor al 0.1%, excluyendo así OTUs raros o transitorios, o potenciales errores de secuenciación (Astudillo-García 2017), quedándonos de esta manera con 141 OTUs, que corresponden al $88.0 \pm 2.0\%$ del total de secuencias asignadas (rango: 13,157-46,962 lecturas por muestra) a 7 filos, 9 clases, 9 órdenes, 19 familias, 19 géneros y 4 especies. Todos los análisis de diversidad y abundancia diferencial se realizaron aplicando este filtro de abundancia. La curva de rarefacción indica que la profundidad de secuenciación de todas las muestras es adecuada, ya que aumentando el número de secuencias no aumenta el número de especies obtenidas (Ver Figura S1). En la Tabla S2 se resume el análisis bioinformático por cada muestra.

6.4.2. Composición y diversidad de la microbiota durante el tratamiento.

De manera global, la microbiota de los ratones antes y después del tratamiento está dominada por los filos Firmicutes ($49.1 \pm 7.7\%$), Bacteroidetes ($40.5 \pm 5.6\%$), TM7 ($3.8 \pm 2.1\%$), Verrucomicrobia ($2.5 \pm 3.8\%$) y Proteobacteria ($2.7 \pm 1.6\%$). En las Figuras 14 y 15 se presenta la abundancia relativa promedio de los distintos niveles taxonómicos de ambos grupos (VLPs y Control) antes y en los puntos post-trasplante, y en la Figura S2 se encuentran las gráficas por cada ratón.

Figura 14. Perfil taxonómico a nivel de filo. Abundancia relativa promedio a nivel de filo, clase, orden y familia de cada grupo (VLPs y Control) antes (día 0) y en los diferentes puntos post-trasplante.

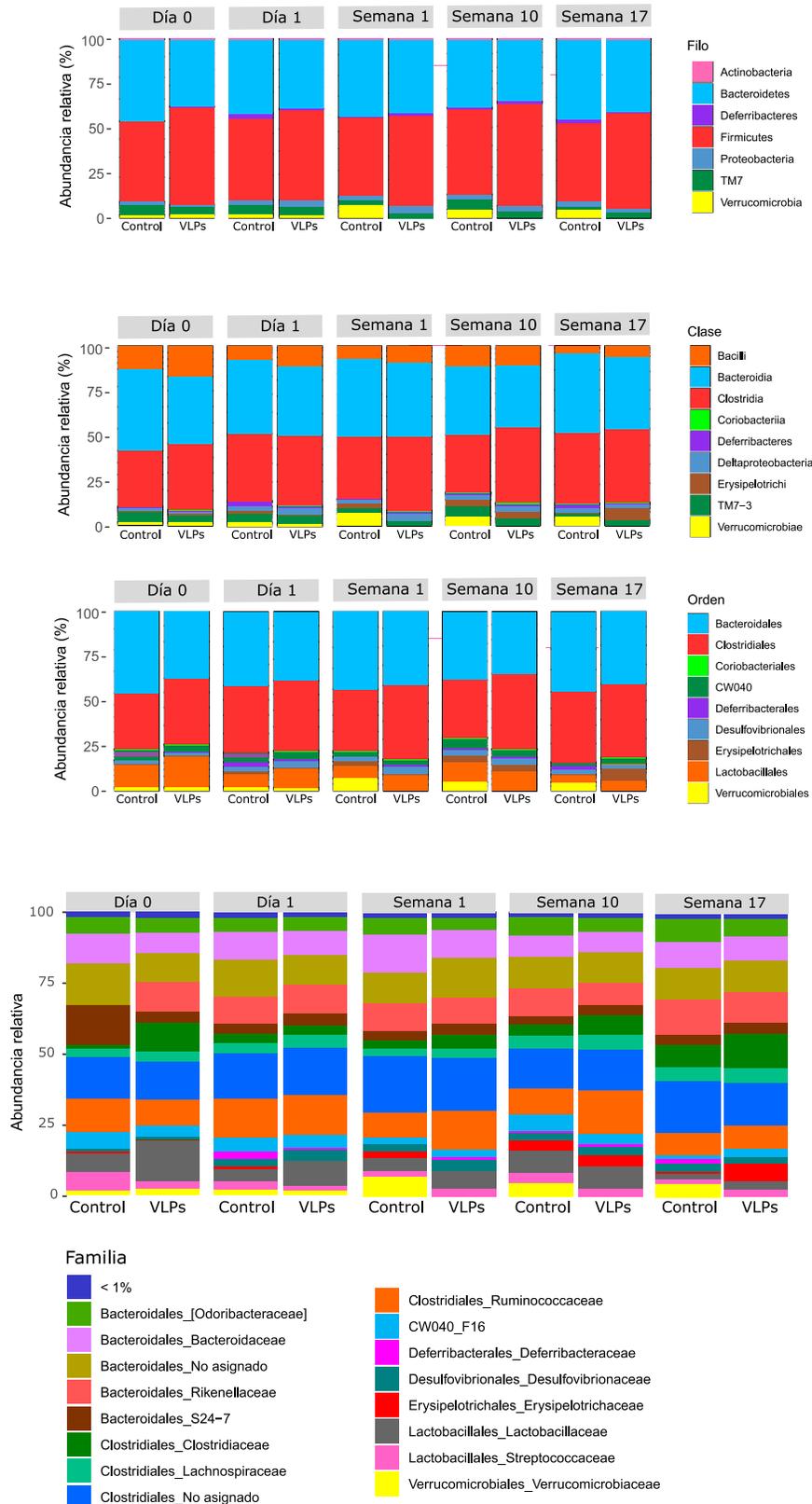
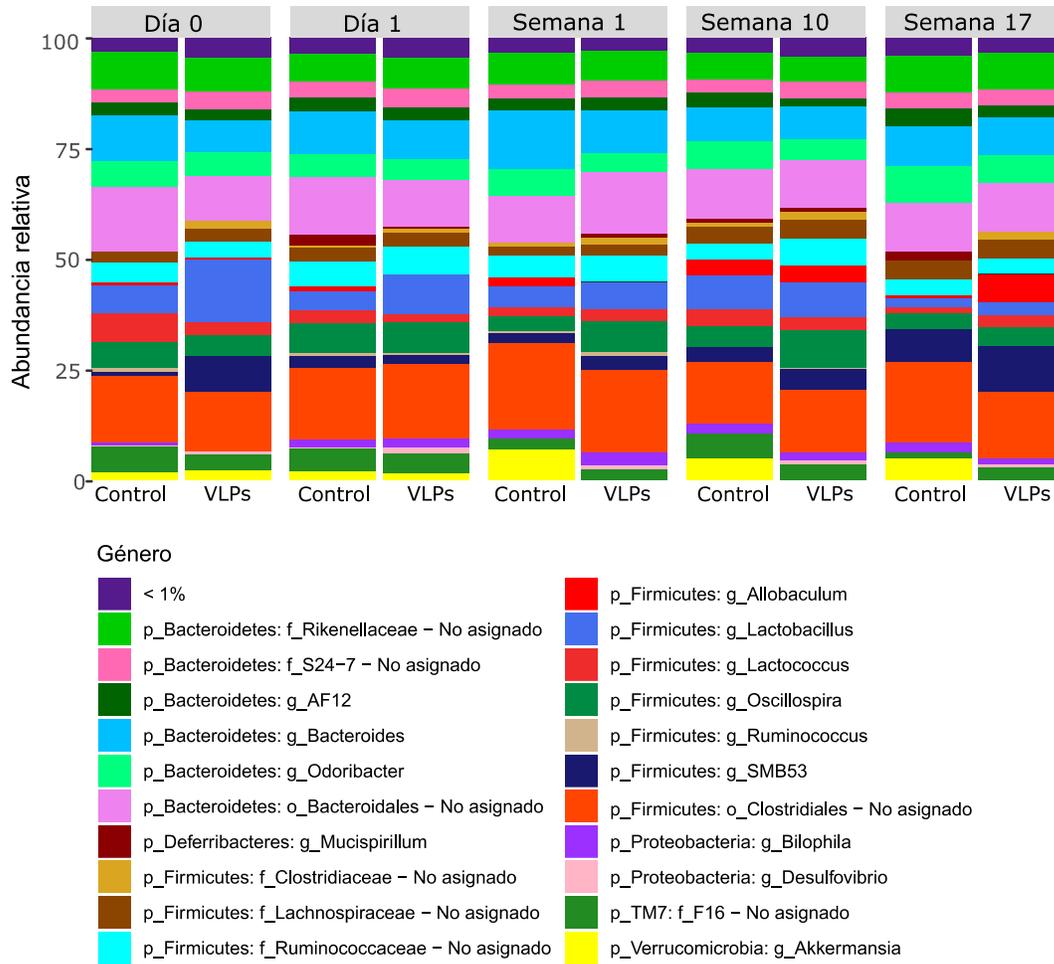


Figura 15. Perfil taxonómico a nivel de género. Abundancia relativa promedio a nivel de género de cada grupo (VLPs y Control) antes (día 0) y en los diferentes puntos post-trasplante. p: filo, c: clase, o: orden, f: familia, g: género.



El análisis de beta diversidad reveló que las muestras se agrupan de acuerdo al tratamiento administrado, indicando diferencias significativas entre la composición de la microbiota de ambos grupos (VLPs vs. Control), empleando las distancias UNIFRAC *Unweighted* ($p=0.001$) y *Weighted* ($p=0.006$), Bray Curtis ($p=0.001$) y Jaccard ($p=0.001$). En los gráficos de PCoA (UNIFRAC *Unweighted*) se pueden diferenciar dos *clusters* (Figura 16). El primer *cluster* engloba todas las muestras del grupo Control y la mayoría de las muestras del día 0 y día 1 del grupo de VLPs. El segundo *cluster* incluye únicamente muestras del grupo inoculado con VLPs, siendo la mayoría de la semana 1, 10 y 17 post-trasplante. La muestra de la semana 1 post-trasplante de un ratón inoculado con VLPs (muestra V7-R1, ver Figura S3) se observa distante de ambos *clusters*. Ese mismo ratón en la semana 10 y 17 se ubica en el *cluster* del inicio, junto con

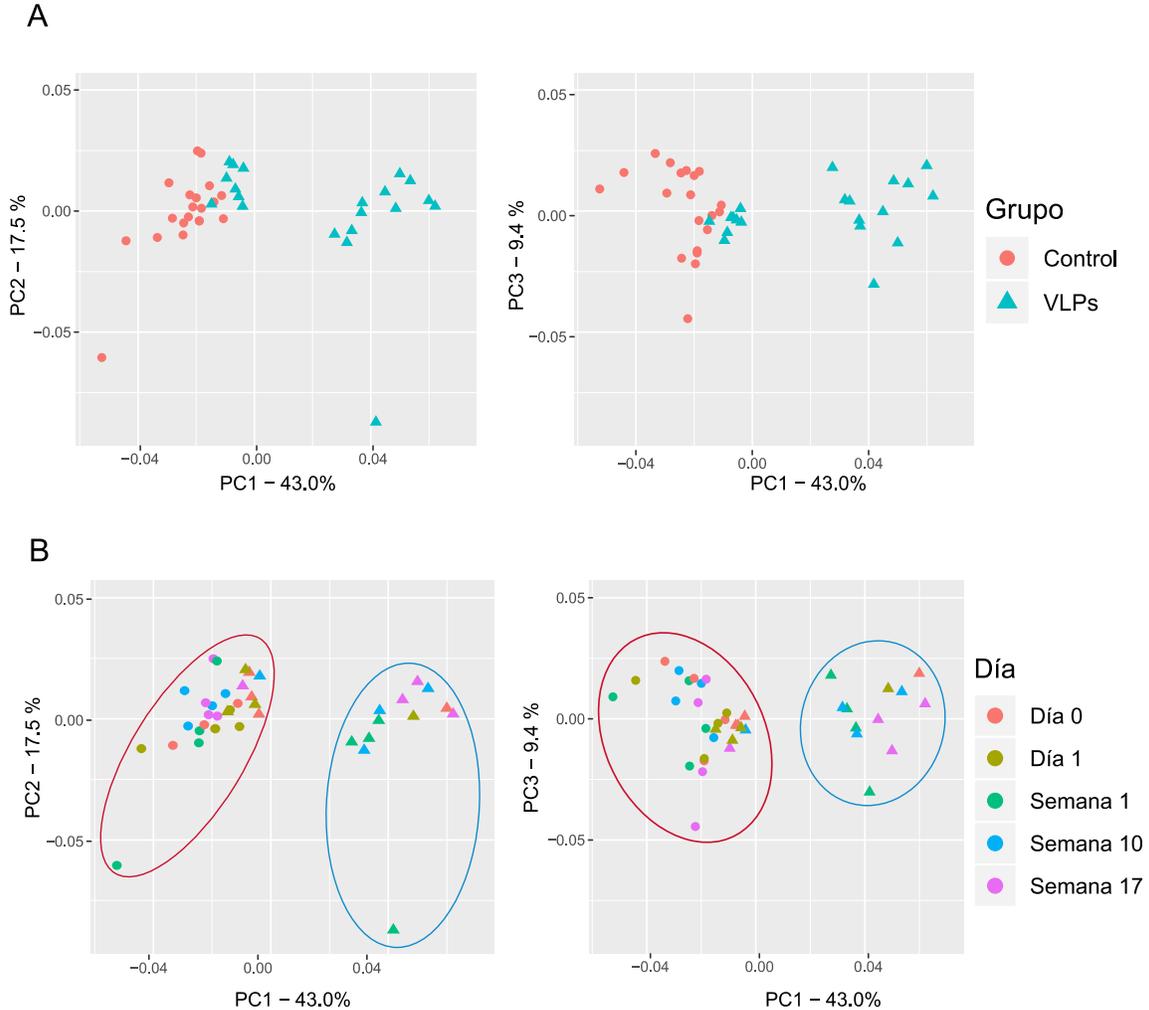
las muestras del grupo Control, indicando que no hubo cambios cualitativos en este individuo al final del experimento.

El PCoA elaborado con las distancias UNIFRAC *Weighted* no muestra un patrón claro de agrupación por grupo o por día post-tratamiento (Ver Figura S3), y la muestra V7-R1 no se encuentra separada como en el PCoA *Unweighted*, lo cual sugiere que los cambios en la composición de su microbiota en este ratón en la semana 1 post-trasplante se deben a cambios en OTUs con baja abundancia.

El análisis con Betadisper (datos no mostrados) reveló que no hay diferencias significativas entre la dispersión de cada grupo comparado, lo cual sugiere que las diferencias entre estos se deben a su composición y no a su dispersión.

Estos resultados indican que, en términos cualitativos y tomando en cuenta la filogenia, la composición de la microbiota de ambos grupos es similar entre sí antes (día 0) y durante el primer día post-trasplante, pero en la semana 1 se observan cambios en los ratones inoculados con VLPs, los cuales persisten hasta las semanas 10 y 17, siendo significativamente diferentes cuando se comparan con el resto de las muestras (ANOSIM, $p= 0.002$). Por el contrario, la microbiota del grupo inoculado con buffer se mantiene similar a su composición original durante todo el tratamiento.

Figura 16. Análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando las distancias UNIFRAC *unweighted* de las muestras fecales de ratones trasplantados con VLPs (n=20) o buffer (Control, n=20). **(A)** Las muestras están coloreadas por grupo y **(B)** día post-tratamiento. Se muestran los componentes PC1 vs PC2, y PC1 vs PC3. **(C)** Se puede apreciar que todas las muestras del grupo control (elipses rojas) se agrupan en el mismo *cluster*, mientras que la mayoría de las muestras del grupo de VLPs (elipses azules) de las semanas 1, 10 y 17 post-trasplante se segregan formando un segundo *cluster*.

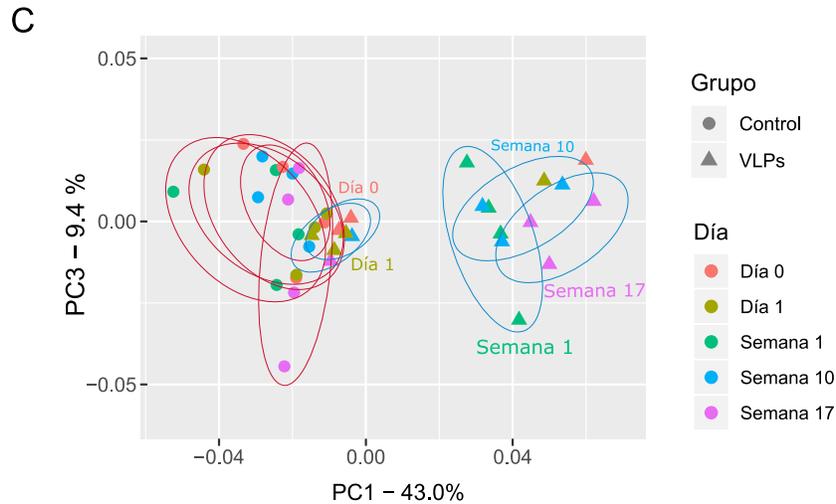


Comparación

ANOSIM

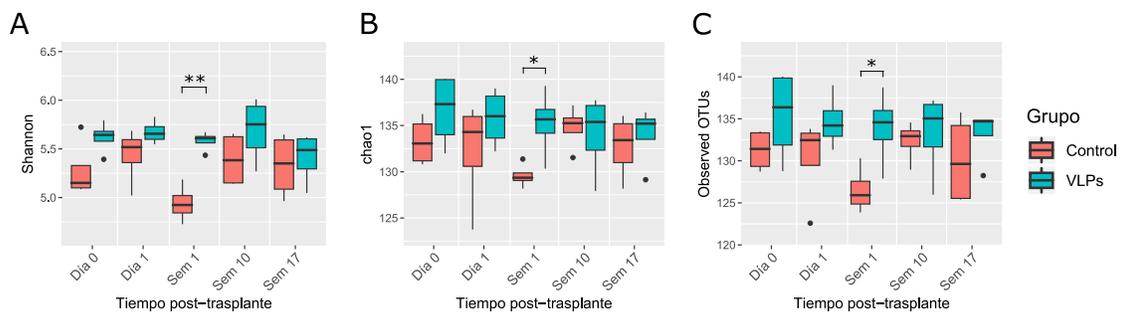
Control vs. VLPs	R= 0.325	p= 0.001
Control (D0) vs. VLPs (D0)	R= 0.198	p= 0.064
Control (S1+S10+S17) vs. VLPs (S1+S10+S17)	R= 0.432	p=0.001
Control (S1+S10+S17) vs. todas las muestras	R= 0.086	p=0.147
VLPs (S1+S10+S17) vs. todas las muestras	R= 0.370	p=0.002

D0= Día 0, S1= semana 1, S10= semana 10, S17= semana 17



Por otro lado, analizando la diversidad alfa se observó que en la semana 1, los índices de *Shannon*, *Chao1* y *OTUs observados* son significativamente menores en el grupo control con respecto al grupo inoculado con VLPs ($p=0.002$, 0.047 y 0.037 , respectivamente). En el resto de los puntos post-trasplante no hay diferencias entre ambos grupos en la diversidad alfa (Figura 17).

Figura 17. Índices de diversidad alfa: (A) Shannon, (B) Chao1 y (C) OTUs observados, de la microbiota fecal durante el trasplante con VLPs. Significancia: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.



Para describir los cambios en bacterias particulares durante el tratamiento y para realizar comparaciones intergrupales es necesario definir primero si la microbiota es diferente entre ambos grupos antes de la inoculación.

Antes del inicio del tratamiento con VLPs, este modelo murino de obesidad y síndrome metabólico presentó en promedio una mayor proporción de Firmicutes que de

Bacteroidetes (49.6 ± 7.8 % vs 41.4 ± 6.8 %, $p=0.04$). Dentro de los Firmicutes sobresalen el orden Clostridiales no asignados (14.2 ± 1.4 %), y los géneros *Lactobacillus* (10.3 ± 5.4 %), *Lactococcus* (4.6 ± 2.8 %) y *Oscillospira* (5.3 ± 1.7 %). Por su parte, entre los *Bacteroidetes* se encuentran en mayor abundancia el orden Bacteroidales no signados (12.4 ± 3.7 %), miembros no asignados de la familia S24-7 (f_S24-7_no asignado) y los géneros *Bacteroides* (8.8 ± 4.9 %) y *Odoribacter* (5.3 ± 1.7 %). La totalidad del filo TM7 corresponde a la familia F16 (4.7 ± 1.7 %), y Verrucomicrobia contiene únicamente a *Akkermansia muciniphila* (2.0 ± 1.8 %). En menor proporción se encuentra el filo Proteobacteria (1.5 ± 1.8 %), sobresaliendo la familia *Desulfovibrionaceae* (1.4 ± 1.3 %), que contiene los géneros *Bilophila* y *Desulfovibrio*.

Como se mencionó previamente, comparando ambos grupos en el día 0, no se observaron diferencias significativas en la beta diversidad calculada con las distancias Bray Curtis ($p=0.069$), y UNIFRAC *Unweighted* ($p=0.064$) y *weighted* ($p=0.059$). Tampoco se obtienen diferencias en las métricas de diversidad alfa (índices de Shannon, chao1 y OTUs observados; Figura 19) y se observa únicamente diferencial *Desulfovibrio* C21_C20, que se encuentra aumentado en el grupo de VLPs con respecto al Control (0.13 % vs 0.0001 %, $\log_2FC= 5.69$, $FDR= 0.002$), aunque esta bacteria representa menos del 1% de la microbiota en ambos grupos. Con esto, se considera que la microbiota en el día 0 es similar entre ambos grupos y sus cambios son comparables en los puntos post-trasplante.

6.4.3. Cambios diferenciales post-trasplante.

6.4.3.1. Diferencias transversales (grupo VLPs vs. Control).

Después del tratamiento, se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de bacterias específicas entre ambos grupos, utilizando el método DESeq2 y tomando como significantes valores de $FDR < 0.05$ (Figura 18). En el día 1 post-trasplante no se observaron diferencias, pero en la semana 1 se obtuvo que *Akkermansia muciniphila* (filo Verrucomicrobia) se encuentra fuertemente disminuida en el grupo inoculado con VLPs con respecto al control (0.0035 vs. 7.13 %, $\log_2FC= -$

10.9, FDR= 1×10^{-11}), esta diferencia se sigue observando en las semanas 10 (0.013 vs. 4.9 %, $\log_2FC=-8.24$, FDR= 6×10^{-5}) y 17 post-trasplante (0.001 vs 5.0 %, $\log_2FC=-11.9$, FDR= 8×10^{-10}). Esto puede notarse a simple vista en las gráficas de barras desde nivel de filo y en todos los niveles taxonómicos más bajos (Figuras 14 y 15). Estas diferencias en la abundancia de *Akkermansia muciniphila* fueron las más marcadas y se observaron tanto con el método DESeq2, como con LEfSe. En la Figura 19 se muestra la abundancia relativa de esta bacteria antes y en cada punto post-trasplante.

Por el contrario, en la semana 1 se observó a *Mucispirillum schaedleri* (filo Deferribacteres) más abundante en el grupo de VLPs (1.1 vs. 0.15 %, $\log_2FC=2.28$, FDR=0.008), aunque esto se invierte en la semana 17, siendo en este punto más abundante en el grupo control (0.33 vs. 2 %, $\log_2FC=-2.48$, FDR= 0.02) (Figuras 18 y 19). Siendo menos estrictos en la determinación de bacterias diferenciales, utilizando el valor de $p < 0.05$ como punto de corte de significancia y sin tomar en cuenta el FDR, se observan 16 grupos diferenciales entre ambos grupos, estos pueden ser consultados en la Figura S4.

Figura 18. Gráficos de abundancia diferencial. Bacterias diferenciales en el grupo de VLPs con respecto al Control en los puntos post-trasplante, empleando el método DESeq2. Se muestran únicamente los taxones con FDR<0.05 y punto de corte de *Log2fold change (Log2FC)* de 1.5. Los valores positivos de *Log2FC* (barras azules) significan sobreabundancia en el grupo de VLPs con respecto al Control, mientras que los negativos (barras rojas) indican menor abundancia en el grupo de VLPs con respecto al Control. (p: filo, c: clase, o: orden, f: familia, g: género, s: especie). En el día 1 post-inoculación no se observaron bacterias diferenciales entre ambos grupos.

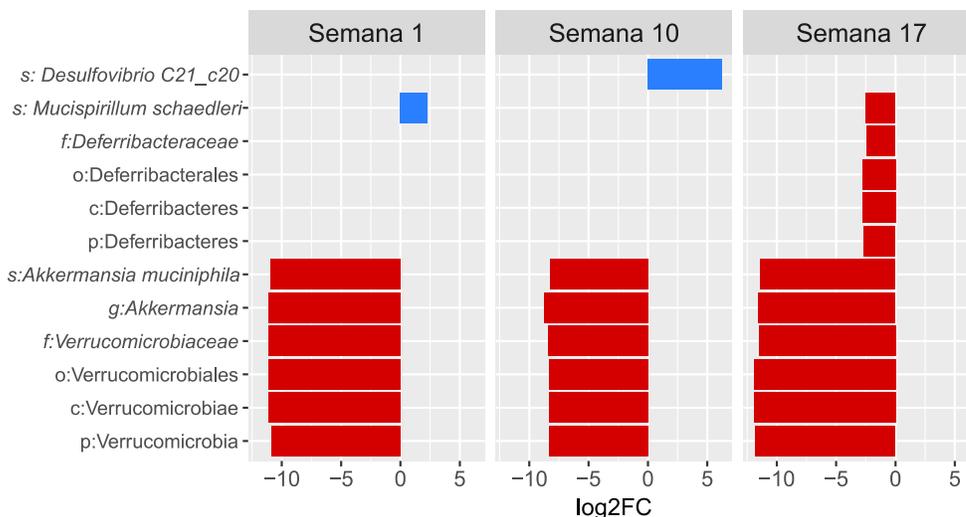
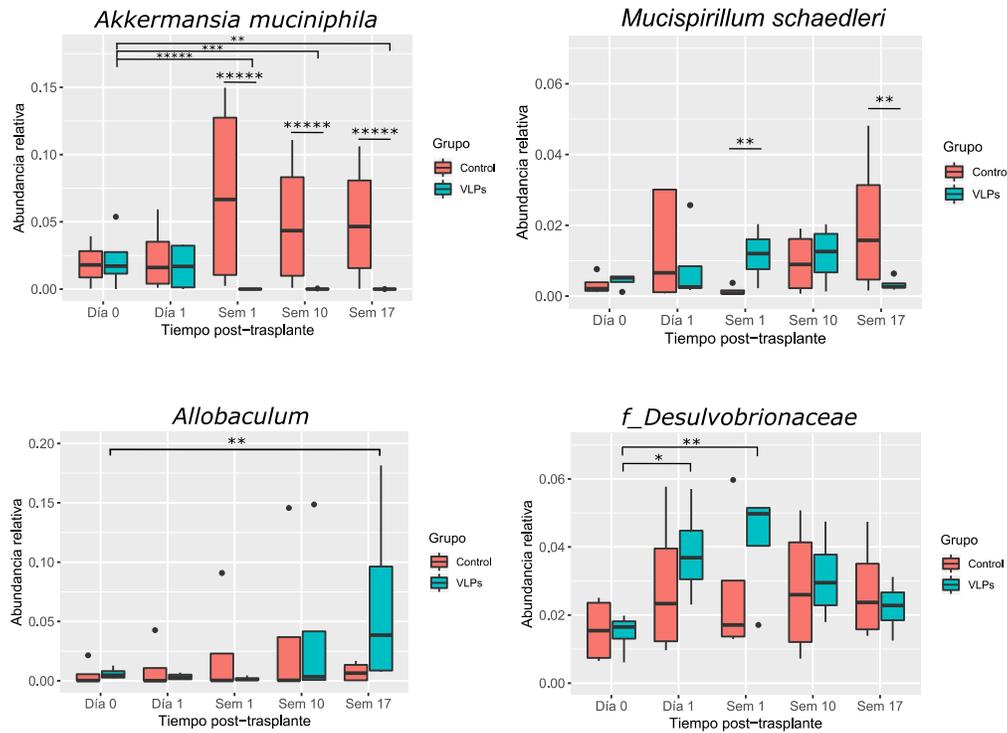


Figura 19. Abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila*, *Mucispirillum schaedleri*, *Allobaculum*, familia *Desulfovibrionaceae* y sus géneros *Desulfovibrio* y *Bilophila*, antes (día 0) y después del tratamiento con VLPs o buffer (control). Significancia: * FDR<0.05, ** FDR<0.01, *** FDR<0.001, **** FDR < 0.0001, ***** FDR< 0.00001.



6.4.3.2. Cambios longitudinales.

Los cambios longitudinales (a través del tiempo) de cada grupo se realizaron comparando el día 0 con cada punto post-trasplante, identificándose 30 grupos taxonómicos diferenciales con el método DESeq2 (FDR<0.05), los cuales se describen a detalle en el material suplementario (Figura S5). En resumen, en el grupo trasplantado con VLPs encontramos cambios a partir del primer día post-trasplante que se revierten al final del tratamiento, como el aumento en la familia *Desulfovibrionaceae* (filo Proteobacteria) (Figura 19), que comprende los géneros *Bilophila* y *Desulfovibrio*. Como podemos observar en la Figura 19, la abundancia de esta familia tiende a aumentar desde la semana 1, alcanzando una diferencia significativa en la semana 10, pero en la semana 17 las abundancias entre ambos grupos tienden a ser similares nuevamente.

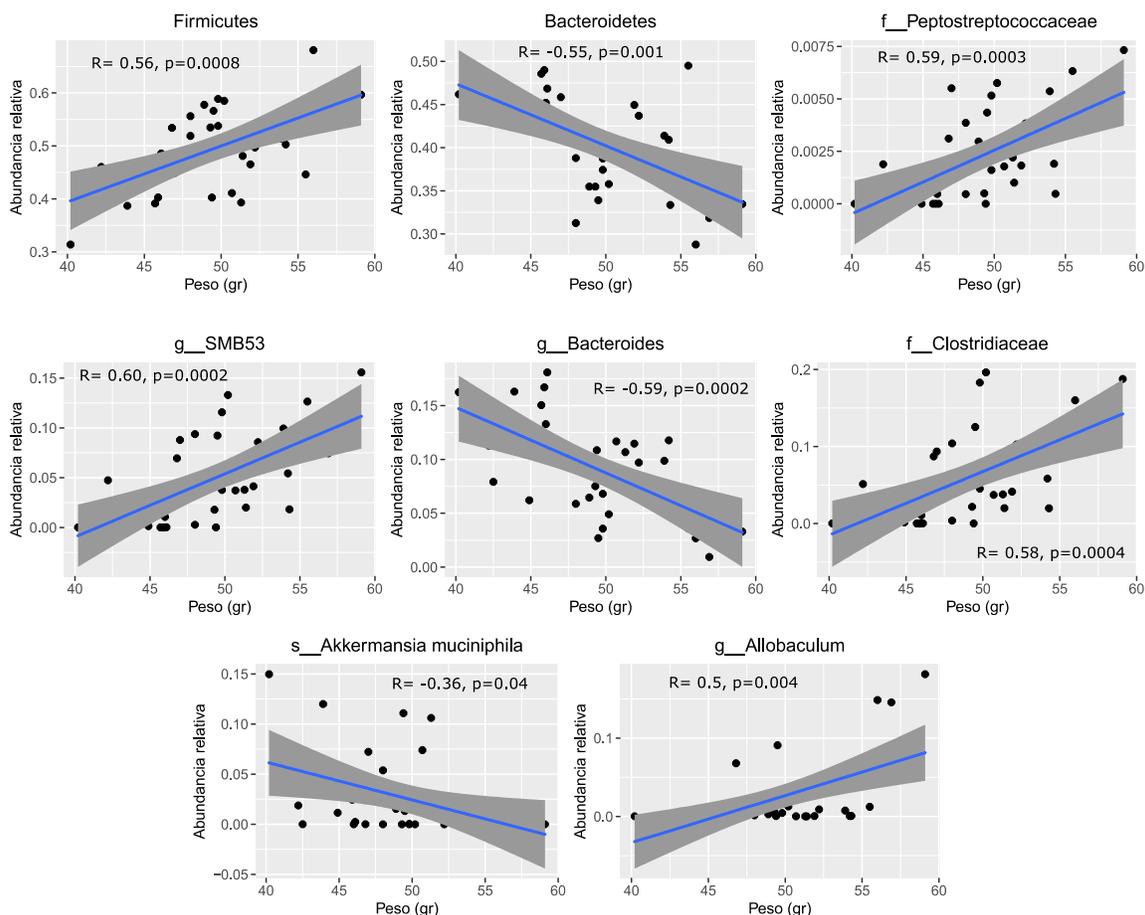
Como se ha mencionado, *Akkermansia muciniphila* se redujo significativamente desde la semana 1 en el grupo de VLPs y esta reducción persiste hasta las semanas 10 y 17 (Figura 19). Además, se presentaron cambios que se observan al final del experimento, como el incremento en el género *Allobaculum* ($\log_2FC= 3.46$, $FDR= 0.007$) y en su correspondiente familia *Erysipelotrichaceae* ($\log_2FC= 3.47$, $FDR= 0.01$) en el grupo inoculado con VLPs (Figura 19).

6.5. Correlación entre la microbiota y metabolismo de los ratones.

Se analizó si existe correlación entre las características metabólicas de estos animales y las abundancias de las taxas bacterianas de la microbiota intestinal que resultaron diferenciales entre el grupo control y el grupo inoculado con VLPs en los puntos post-tratamiento. De las 12 taxas diferenciales, *Akkermansia muciniphila* correlacionó negativamente con el peso ($r=-0.36$, $p=0.04$, Figura 20), y el mismo comportamiento se observó con su correspondiente familia *Verrucomicrobiaceae*, orden Verrucomicrobiales, clase Verrucomicrobia y filo Verrucomicrobia (Figura S6). Por el contrario, *Allobaculum* correlacionó positivamente con el peso ($r=0.5$, $p=0.004$, Figura 20), lo cual se observa también en sus niveles taxonómicos superiores (familia *Erysipelotrichaceae*, orden Erysipelotrichales y clase Erysipelotrichi, Figura S6). Asimismo, realizando el análisis tomando en cuenta todos los taxas asignados con abundancia mayor al 0.1%, se obtienen 42 taxas que correlacionan con el peso (Figura S6), entre ellos, el filo Firmicutes correlacionó positivamente ($r= 0.56$, $p=0.0008$, Figura 20), mientras que los Bacteroidetes correlacionaron negativamente ($r=-0.55$, $p=0.001$, Figura 20). Entre los taxas que presentan correlación más fuerte se encuentra el género *SMB53* ($r=0.60$, $p=0.0002$, Figura 20) y las familias *Peptostreptocaceae* ($r=0.59$, $p=0.0003$, Figura 20) y *Clostridiaceae* ($r=0.58$, $p=0.0004$, Figura 20) que correlacionan positivamente, mientras que el género *Bacteroides* presenta correlación inversa ($r=-0.59$, $p=0.0002$, Figura 20). Aunque en este experimento la tendencia de aumento de peso se mantuvo tras DAG en ambos grupos durante el tratamiento sin diferencias significativas entre ellos, estas correlaciones sugieren la relación entre la microbiota y el fenotipo del modelo murino de obesidad y síndrome metabólico, que se ha observado

en otros estudios en humanos y ratones (Becerra et al., 2020; Mujico et al., 2013; Nirmalkar et al., 2018).

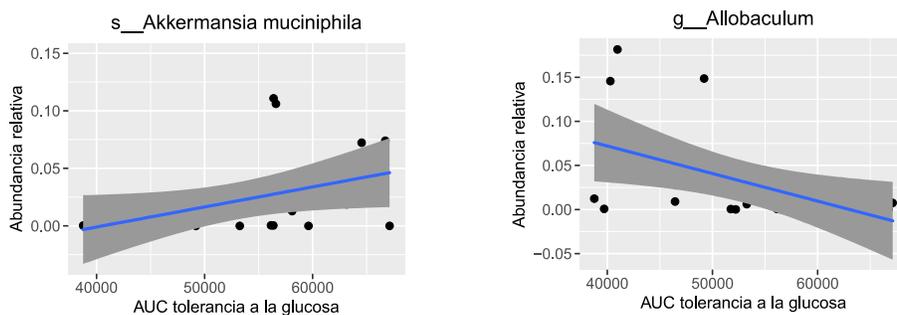
Figura 20. Gráficos de correlación entre la abundancia relativa de grupos taxonómicos bacterianos y el peso de los ratones.



Por su parte, se observó una tendencia de mejora en la prueba de tolerancia a la glucosa en el grupo inoculado con VLPs con respecto al control en la semana 17 post-trasplante. Además, los valores en la curva de la glucosa sérica a los 60 min (glu-60min) y ABC fueron significativamente menores en la semana 17 en comparación con el día 0 en el grupo inoculado con VLPs. De las taxas diferenciales, se obtuvo correlación positiva entre la abundancia de *Akkermansia muciniphila* con los valores de ABC ($r=0.46$, $p=0.04$) (Figura 23), es decir, esta bacteria se asocia con la intolerancia a la glucosa, e

interesantemente, su abundancia disminuyó drásticamente en el grupo inoculado con VLPs. Por el contrario, *Allobaculum* presentó correlación negativa ($r=-0.43$, $p=0.04$) y su abundancia relativa incrementó en el grupo inoculado con VLPs en la semana 17 post-trasplante. Los cambios en la abundancia de estas bacterias podrían estar relacionados con los cambios en la tolerancia a la glucosa. Asimismo, realizando el análisis tomando en cuenta todos los taxones asignados con abundancia mayor al 0.1%, se obtienen 7 taxones adicionales que correlacionan con el ABC de la prueba de tolerancia a la glucosa, los cuales pueden ser consultados en la Figura S6.

Figura 21. Gráficos de correlación entre la abundancia relativa de *Allobaculum* y *Akkermansia muciniphila* y el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa.



Con respecto a la prueba de resistencia a la insulina, no se obtuvieron taxones diferenciales que correlacionaran con los valores de ABC. Adicionalmente, tomando en cuenta todas las taxones con abundancia superior al 0.1% se obtiene que únicamente 5 de ellas correlacionan con el ABC (Figura S6).

Asimismo, se analizó si existe correlación entre los índices de diversidad alfa (*Shannon*, *Chao1* y *OTUs* observados) con estos parámetros metabólicos pero no se obtuvieron valores significativos.

6.6. Posible colonización de bacterias en conjunto con el trasplante VLPs.

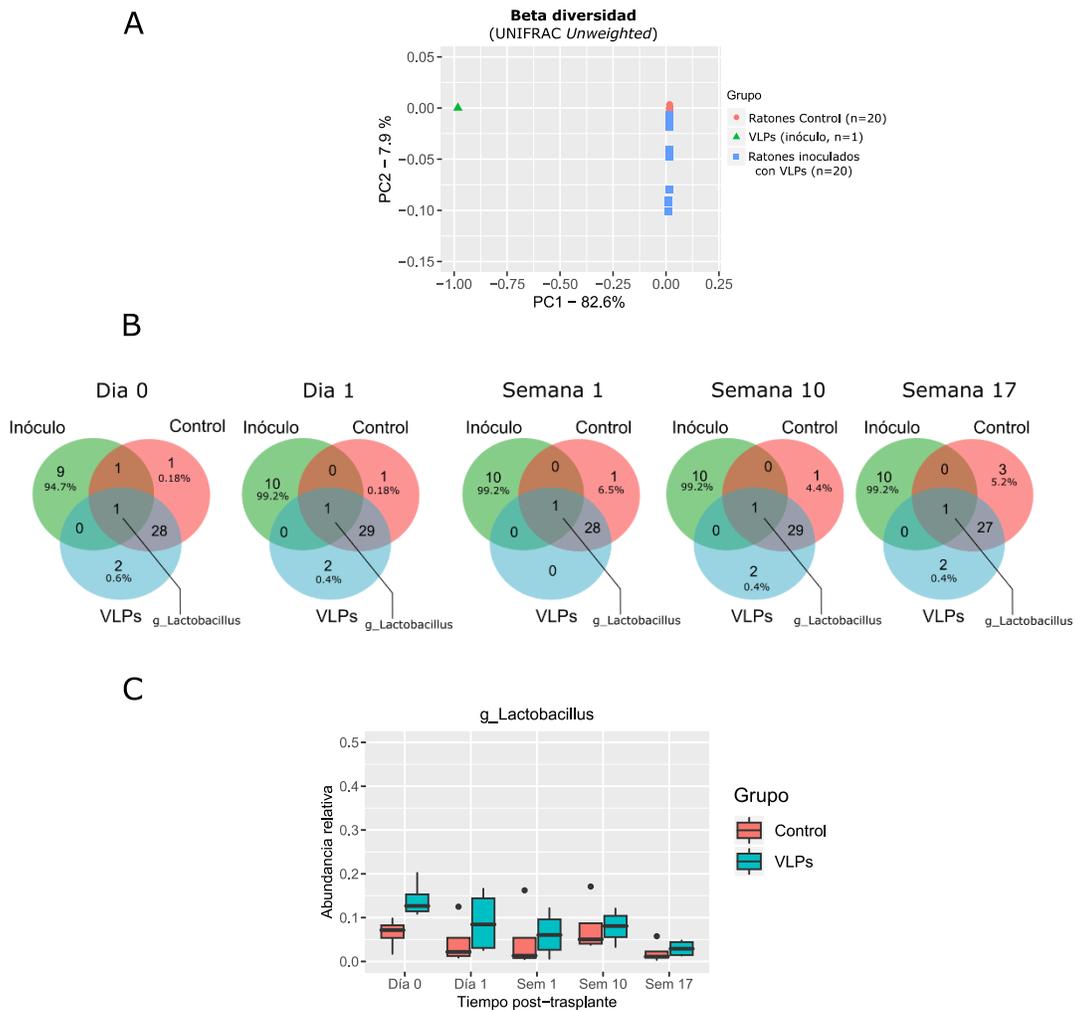
Para determinar si las bacterias presentes en la preparación de VLPs lograron integrarse a la microbiota de los ratones y así tomar en cuenta su posible papel en los resultados del trasplante, se realizó la secuenciación masiva del gen 16S de esta

muestra de VLPs (inóculo), la cual mostró la presencia de ADN de *Pseudomonas*, *Listeria* y *Bacillus*, siendo casi el 90% de las lecturas asignadas (Figura 8D). Estas bacterias estuvieron ausentes en los ratones en el día 0 y en los días posteriores al tratamiento. Se puede observar en el gráfico de PCoA (Figura 22A), que la muestra del inóculo se encuentra completamente distante a las 40 muestras fecales secuenciadas de los ratones, las cuales se ven agrupadas, reflejando así diferencias en la composición del ADN bacteriano del inóculo con respecto a la microbiota de los ratones.

Como podemos observar en los diagramas de Venn (Figura 22B), la única bacteria que se comparte entre el inóculo y los ratones (en ambos grupos) es el género *Lactobacillus*, que se encontró con una abundancia de 0.5% en el inóculo. Esta bacteria se halló en ambos grupos de ratones desde el día 0, y tras la inoculación no se detectaron tendencias de aumento o cambios significativos (Figura 22C). En la Figura S7 se presentan estos diagramas de Venn con los distintos niveles taxonómicos asignados.

Como se ha mencionado en la sección 5.1, a pesar de encontrar una ligera amplificación de la región V3-V4 del gen 16S bacteriano en la muestra de VLPs, no se descarta la posibilidad de que este ADN provenga de bacterias muertas o se encuentre libre en el medio. Asimismo, con estos resultados se demuestra que este ADN bacteriano no logró integrarse a la microbiota de los ratones durante el trasplante, al menos no a niveles detectables por nuestro método.

Figura 22. (A) Análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando las distancias UNIFRAC Unweighted de la muestra de VLPs (Inóculo, n=1) y de la microbiota fecal de los ratones antes y después del tratamiento con VLPs (n=20) y buffer Control (n=20). La muestra del inóculo se encuentra completamente separada del resto. **(B)** Diagrama de Venn de presencia/ausencia de los géneros bacterianos encontrados en el inóculo de VLPs fecales y como estos se encontraron en los ratones inoculados con dichas VLPs o buffer (control), en el día 0 (antes del tratamiento) y en los días 1, semana 1, 10 y 17 post-trasplante, tomando en cuenta aquellos con abundancia mayor al 0.1%. Los porcentajes dentro de cada círculo significan la abundancia relativa de dichos géneros. **(C)** Abundancia relativa de *Lactobacillus* en los ratones antes y en los puntos post-trasplante. No hay cambios significativos en los grupos durante el tratamiento.



7. DISCUSIONES

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio de trasplante de VLPs fecales de niños normopeso donadores a ratones obesos con síndrome metabólico, con el objetivo de determinar los cambios en el metabolismo de los animales y la dinámica de la microbiota intestinal posterior al trasplante.

En este experimento, no se observaron diferencias en el peso de los ratones inoculados con VLPs en comparación con el grupo control. Ambos grupos mantuvieron la tendencia de aumento de peso después del tratamiento durante las 18 semanas post-trasplante. Se ha comprobado que la transferencia de microbiota fecal a ratones libres de gérmenes (gnotobióticos) puede resultar en la adquisición del fenotipo donador (de Groot et al., 2017). Sin embargo, este efecto no se ha logrado replicar cuando el trasplante se realiza a hospederos convencionales, es decir, aquellos que reciben el trasplante sin haber pasado por un proceso previo de depleción de la microbiota residente. En humanos, los únicos tres estudios de trasplante de microbiota fecal en individuos con obesidad y síndrome metabólico no lograron disminuir el peso corporal de los pacientes (Kootte et al., 2017; Vrieze et al., 2012; Yu et al., 2020). Probablemente, la dificultad del éxito de estos trasplantes se deba a la competencia entre los microorganismos residentes y los introducidos en el trasplante, por ocupar y establecerse en el tracto gastrointestinal del hospedero receptor. Los trasplantes de microbiota fecal parecen ser más exitosos cuando la diversidad y riqueza del donador es mayor que la del receptor y cuanto los microorganismos trasplantados tienen menos competencia para establecerse en el nuevo hospedero (Zuo et al., 2018). Por ejemplo, la gran mayoría de los pacientes con infección por *Clostridium difficile* responden al trasplante de microbiota. Por lo general, estos pacientes son primeramente tratados con antibióticos con la finalidad de resolver la infección, lo cual resulta en una pérdida de riqueza y diversidad de la microbiota intestinal. Al no responder con el tratamiento antibiótico, los pacientes reciben el trasplante fecal que por lo general alivia los síntomas y resuelve la infección por este patógeno. Lo equivalente en humanos a los modelos animales gnotobióticos, sería que los pacientes recibieran un estricto tratamiento de antibióticos de amplio espectro con la finalidad de eliminar la microbiota residente, lo cual no se ha realizado previo a

trasplante fecales en obesidad por cuestiones éticas y el riesgo que representa para la salud del paciente (Yu et al., 2020). El trasplante de VLPs podría tener un efecto positivo sobre la obesidad en hospederos convencionales. En un reciente estudio publicado en 2020, Rasmussen y colaboradores emplearon ratones convencionales alimentados con dieta alta en grasas, los cuales recibieron un trasplante de VLPs fecales de ratones donadores normopeso. Este estudio reporta que los ratones inoculados con VLPs lograron disminuir significativamente la ganancia de peso inducida por la dieta alta en grasas (Rasmussen et al., 2020). Hay diferencias sustanciales entre este estudio y el nuestro que podría explicar que no se hayan observado cambios en el peso de nuestros ratones tras el trasplante de VLPs de humano. En primer lugar, el grado de obesidad de los animales al momento de recibir el trasplante difiere entre ambos estudios. Aunque Rasmussen reporta que la composición de la DAG empleada en su experimento es la misma que la utilizada en este trabajo, sus ratones fueron mantenidos durante 6 semanas con esta dieta antes de recibir el trasplante de VLPs, mientras que los nuestros fueron alimentados durante 14 semanas, aumentando de peso en un 200% con respecto al inicio de la DAG. Aunque Rasmussen no reporta el valor del peso de sus ratones, asumimos que su grado de obesidad al momento del trasplante es menor en comparación a los nuestros. En segundo lugar, la cantidad o dosis de VLPs administrada en su estudio fue 100 veces mayor que la nuestra y se aplicaron dos inoculaciones, mientras que nuestro experimento fue de dosis única. Estos factores pudieron facilitar la respuesta positiva a la inoculación de las VLPs en el experimento de Rasmussen.

La obesidad frecuentemente se acompaña de alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Dabke et al., 2019). Se han reportado tres ensayos clínicos de trasplante de microbiota a individuos obesos con síndrome metabólico, de los cuales, en dos se observó mejora en la sensibilidad a la insulina a las 6 semanas post-trasplante (Kootte et al., 2017; Vrieze et al., 2012), aunque Kootte reporta que este efecto se revierte a las 18 semanas post-trasplante, es decir, la mejora es temporal. Por el contrario, en el tercero y más reciente no se observó mejora en el síndrome metabólico a pesar de recibir repetidas capsulas con microbiota fecal de donadores sanos (Yu et al., 2020). Nuestros ratones inoculados con VLPs de niños normopeso mostraron una tendencia

de mejora en la tolerancia a la glucosa en comparación con el grupo control y no se obtuvieron cambios en la resistencia a la insulina. Por su parte, en el experimento ya mencionado de Rasmussen se observó una mejora significativa en la tolerancia a la glucosa en los ratones 6 semanas después de haber recibido el trasplante de VLPs fecales, aunque su estudio no evalúa el efecto en un período temporal más largo. En nuestro experimento, la tendencia de mejora en la tolerancia a la glucosa se observa en la semana 10 post-trasplante y se vuelve más pronunciada en la semana 17 post-trasplante, sugiriendo que el efecto de las VLPs sobre el metabolismo del hospedero podría ser más duradero que el trasplante convencional de microbiota fecal. Las alteraciones en la microbiota de los animales por efecto de las VLPs podrían estar relacionados a los efectos en el metabolismo (Hsu et al., 2019).

El trasplante de VLPs fecales de niños normopeso a ratones obesos con síndrome metabólico resultó en cambios en la microbiota de estos animales. En el día 0, este modelo murino presentó una composición de la microbiota intestinal similar a lo reportado en ratones con síndrome metabólico inducido por dieta alta en grasas, con una mayor proporción del filo Firmicutes, que correlacionan con el peso de los animales, y una menor proporción de Bacteroidetes con correlación inversa. El análisis de beta diversidad mostró que a partir de la primera semana post-trasplante, la composición bacteriana cambia en los ratones inoculados con VLPs, lo cual no se observa en el grupo control. Interesantemente, estos cambios se mantuvieron en las semanas 10 y 17 post-trasplante.

Existen pocos estudios que involucran la inoculación de VLPs o bacteriófagos en modelos animales con la finalidad de evaluar su efecto sobre la microbiota. En dos de ellos se demostró que ratones gnotobióticos colonizados con un consorcio de especies bacterianas intestinales son susceptibles a cambios en la abundancia de estas bacterias por la inoculación con VLPs (A. Reyes et al., 2013) o por la administración de bacteriófagos líticos específicos para dichas bacterias (Hsu et al., 2019), y estos cambios se observaron dentro de la primera semana post-inoculación, aunque ambos estudios se limitan a caracterizar la dinámica de la microbiota hasta 2 y 3 semanas post-inoculación, respectivamente. Por su parte, en el estudio de Lin reportan que la

microbiota del íleon de los ratones normopeso inoculados con VLPs de ratones obesos, tiende a cambiar hacia una microbiota característica de la obesidad en el día 4 post-inoculación, aunque tampoco se evalúa si estos cambios persisten (Lin et al., 2019).

Nuestro experimento longitudinal nos permitió observar que tras el trasplante de VLPs se presentan cambios en la semana 1 post-trasplante. Algunos de estos, como el aumento de miembros de la familia *Desulfobivibrionaceae*, se revierten en la semana 10 y 17 post-trasplante probablemente por la resiliencia de la microbiota, es decir, por su capacidad de retornar a su composición tras una perturbación (Lozupone, 2013). No obstante, otros cambios perduran o se presentan más tarde. El análisis de abundancia diferencial reveló a *Akkermansia muciniphila* drásticamente disminuida en el grupo inoculado con VLPs con respecto al grupo control en la semana 1 post-trasplante, y esta diferencia persiste en las semanas 10 y 17.

Akkermansia muciniphila es una bacteria abundante de la microbiota intestinal, que ha demostrado en diversos estudios tener un papel fundamental en la salud del hospedero (Macchione et al., 2019). Esta bacteria expresa enzimas capaces de metabolizar la fibra de la dieta produciendo ácidos grasos de cadena corta, como butirato, teniendo efectos positivos sobre el metabolismo del hospedero. Incluso se investiga ampliamente su uso como probiótico. Controversialmente, aunque se ha descrito su potencial anti-inflamatorio y su contribución en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal (Macchione et al., 2019), existen estudios que demuestran el papel de *A. muciniphila* como inductora de inflamación (Ganesh et al., 2013; Seregin et al., 2017). Asimismo, esta bacteria se ha asociado a colitis ulcerativa, cáncer colorectal y se ha encontrado aumentada en pacientes con enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple (Cirstea et al., 2018).

El efecto benéfico o perjudicial de esta bacteria sobre el hospedero podría estar determinado por la dieta. Arias, L. et al. reporta que una DAG prolongada (7 meses) induce el incremento de *Akkermansia muciniphila* (Arias et al., 2019), lo cual es consistente con nuestro experimento que tuvo una duración similar. Asimismo, se ha descrito que una dieta prolongada con falta de fibra produce daño en el epitelio

intestinal asociado a *Akkermansia muciniphila*. Esta bacteria se limita a metabolizar los carbohidratos de la fibra dietética, pero cuando estos no son proporcionados en la alimentación, *Akkermansia* puede desarrollarse degradando las mucinas que componen la barrera de la mucosa intestinal (Desai et al., 2016). Esta barrera comprende la primera línea de defensa física entre la microbiota intestinal y el hospedero, y su daño aumenta la permeabilidad del epitelio intestinal a productos microbianos, incrementando la activación de respuestas inflamatorias y la susceptibilidad a patógenos (Vancamelbeke & Vermeire, 2017). Asimismo, la pérdida de la integridad del epitelio intestinal está ligada a las alteraciones características del síndrome metabólico (Dabke et al., 2019). En nuestro estudio, los ratones fueron primeramente mantenidos con una DAG durante 14 semanas para el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico, y después del trasplante con VLPs continuaron con esta dieta por 18 semanas más. El proveedor indica que el contenido de fibra en esta dieta es bajo (6% de la composición total). Sugerimos que estas características de la dieta (baja en fibra) en el período prolongado de nuestro experimento (8 meses) pudieron favorecer la actividad perjudicial de *A. muciniphila* sobre la mucosa intestinal, contribuyendo así al síndrome metabólico.

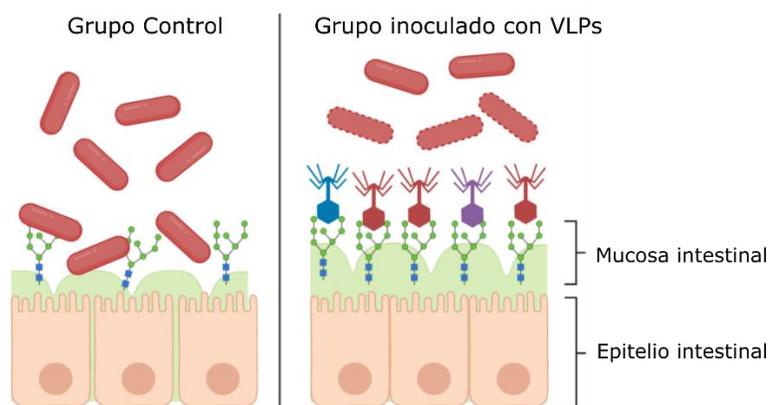
La abundancia de esta bacteria correlacionó positivamente con la intolerancia a la glucosa. De acuerdo con esto, se ha encontrado a *Akkermansia muciniphila* más abundante en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 en comparación con individuos sanos (Wang et al., 2012), sin embargo, en otros estudios se reporta lo contrario. La discrepancia podría estar sujeta a las diferencias en las cohortes y a sus dietas.

Por su parte, *Mucispirillum schaedleri* también es un comensal que se encuentra colonizando la mucosa intestinal (Robertson et al., 2005). Aunque esta bacteria aumenta ligeramente en el grupo inoculado con VLPs en la semana 1 post-trasplante, esto se invierte en la semana 17 observándose disminuida en comparación con el Control, lo cual es consistente con el estudio de DAG prolongada previamente mencionado (Arias et al., 2019). Esta bacteria se ha descrito como proinflamatoria (Loy et al., 2017), por lo que su presencia en nuestro modelo murino podría desencadenar efectos negativos similares a los descritos por *Akkermansia muciniphila*.

En nuestro modelo murino de severa obesidad y síndrome metabólico, sugerimos que la fuerte disminución de *Akkermansia muciniphila*, así como el decremento de *Mucispirillum schaedleri* en el grupo inoculado con VLPs pudo haber contribuido en la tendencia a mejorar la tolerancia a la glucosa de estos ratones.

El efecto de las VLPs podría explicarse con el modelo BAM (*Bacteriophage Adherence Mucus*), el cual describe que los bacteriófagos juegan un papel importante en la inmunidad del hospedero, puesto que a través de sus dominios *Ig-Like* presentes en sus cápsides, son capaces de adherirse a la mucosa intestinal, evitando así la invasión bacteriana (Barr et al., 2013). Posiblemente, las VLPs inoculadas lograron establecerse en la mucosa intestinal de los ratones controlando la población de *Akkermansia muciniphila* y *Mucispirillum schaedleri*, contribuyendo así en evitar la erosión de la mucosa, el paso de productos microbianos a través del epitelio intestinal en este grupo de ratones y así la inflamación (Figura 23).

Figura 23. Modelo propuesto del efecto de las VLPs inoculadas sobre la población de bacterias degradadoras de mucinas (*Akkermansia muciniphila*), tomando como base el modelo BAM (*Bacteriophage Mucus Adherence*, Barr et al., 2013). Consideramos que la dieta alta en grasas y baja en fibra prolongada favorece la degradación de la mucosa intestinal por acción de estas bacterias, agravando el síndrome metabólico (grupo control), y las VLPs inoculadas al adherirse a la mucosa controlan la sobrepoblación de estas bacterias contrarrestando esta degradación de la mucosa y limitando el paso de productos microbianos promotores de inflamación y de alteraciones en el metabolismo del hospedero.



Asimismo, en el grupo inoculado con VLPs se presentó un aumento en *Allobaculum* en la semana 17 post-trasplante, especialmente en dos de los cuatro ratones analizados.

En previos estudios, esta bacteria se ha encontrado incrementada en ratones y ratas con obesidad que mejoraron su estado metabólico tras la administración de prebióticos y probióticos (Bai et al., 2018; Sudun et al., 2019). *Allobaculum* ha correlacionado inversamente con marcadores proinflamatorios como IL-1 β y TNF- α (Sudun et al., 2019). Al igual que *Akkermansia muciniphila*, *Allobaculum* es productora de ácidos grasos de cadena corta como butirato (Greetham et al., 2004). Tal vez el aumento de *Allobaculum* en los ratones inoculados con VLPs pudiera compensar la disminución de *Akkermansia muciniphila* en la producción de ácidos grasos de cadena corta, que son benéficos para la salud y metabolismo del hospedero. Interesantemente, *Allobaculum* correlacionó negativamente con la intolerancia a la glucosa en nuestro experimento. A diferencia de *Akkermansia muciniphila* que se limita a utilizar las mucinas como fuente de energía, *Allobaculum* es capaz de metabolizar la glucosa para producir lactato o butirato y se ha demostrado en cultivos *in vitro* de microbiota murina que esta bacteria es altamente activa en la utilización de glucosa en comparación con el resto de las bacterias cultivadas, contribuyendo en el rápido catabolismo de este carbohidrato (Herrmann et al., 2017). Esto sugiere el posible efecto hipoglucemiante de *Allobaculum* sobre nuestros ratones inoculados con VLPs.

La mayoría de los virus intestinales son bacteriófagos (Sausset et al., 2020) y las interacciones entre estos virus introducidos y las bacterias de la microbiota residente pueden ser muy complejas (Szelachowska et al., 2017). Por ejemplo, la reducción de bacterias específicas puede deberse al efecto directo lítico de los fagos sobre éstas, como la posible explicación que planteamos de *Akkermansia muciniphila* basándonos en el modelo BAM, o bien, puede estar sujeta a interacciones inter-bacterianas, donde la depleción o incremento de bacterias susceptibles a fagos líticos pueden desencadenar efectos en la abundancia de otras bacterias no susceptibles (Hsu et al., 2019). Asimismo, los fagos al ser vehículos de la transferencia horizontal de genes entre bacterias pueden contribuir en la modificación de su metabolismo y sus funciones, que a su vez tienen efecto sobre el hospedero (Shkoporov & Hill, 2019). En este estudio no es posible determinar estos mecanismos, pero el efecto de transferir VLPs de diferentes especies, en este caso de humano a ratón, y observar modificaciones en la microbiota y el

metabolismo de los animales es interesante por el hecho de que la mayoría de los estudios de modulación de la microbiota son realizados en ratones, con la idea de en algún momento escalarlo a humanos. La transferencia de filtrados fecales en el éxito de infección por *Clostridium difficile* (Ott et al., 2017) y el uso de bacteriófagos para combatir infecciones de bacterias resistentes a antibióticos como *Mycobacterium tuberculosis* en ensayos clínicos (Azimi et al., 2019) es alentador en el sentido de que estos virus pudieran en un futuro utilizarse como tratamiento auxiliar para otras enfermedades.

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS.

Los resultados de este estudio nos indican que sí valdría la pena estudiar a los bacteriófagos como moduladores de la microbiota. Sin embargo, para llegar a conclusiones más robustas y determinar que el efecto de trasplantar VLPs sobre la mejora del metabolismo de los ratones se debe a que las VLPs provienen de individuos sanos, se debería incluir un grupo control mantenido con la misma dieta que reciba VLPs de individuos obesos o con síndrome metabólico, con esto se tendría más evidencia de que el fenotipo adquirido se debe al origen de las VLPs trasplantadas, y no al simple hecho de ser VLPs.

Asimismo, en este trabajo no se caracterizaron las VLPs inoculadas, por lo que para futuros experimentos sería deseable caracterizarlas por secuenciación de tipo *shot-gun*, para poder correlacionar los bacteriófagos introducidos con el efecto sobre la microbiota y el fenotipo del individuo receptor.

La secuenciación masiva del gen 16S es una poderosa herramienta que nos permitió detectar las especies bacterianas presentes y sus cambios durante el trasplante de VLPs en términos de abundancia relativa. Sería apropiado realizar un análisis cuantitativo de *targets* específicos, por ejemplo, validar por PCR cuantitativa (qPCR) los niveles de *Akkermansia muciniphila*, que en nuestro experimento resultó en cambios particularmente interesantes.

Sabemos que el modelo murino de obesidad y síndrome metabólico previamente establecido presenta valores alterados de colesterol HDL y VLDL, sin embargo, en este

estudio no se evaluaron los cambios en estos metabolitos por efecto del trasplante de las VLPs, ni tampoco se evaluaron marcadores inflamatorios o de daño en la permeabilidad intestinal (como el LPS circulante). En futuros estudios podrían incluirse estas evaluaciones que darían soporte a lo que hallamos.

Como se ha mencionado, las modificaciones en la dosis, ya sea tanto en el número de inoculaciones, como en la cantidad de VLPs a inocular, podrían arrojar mejores resultados. Al inicio de nuestro experimento no teníamos el antecedente del estudio de Rasmussen (que fue publicado a inicios del 2020), pero sus resultados, junto con los nuestros, nos indican que las VLPs y los bacteriófagos merecen seguir siendo estudiados con el objetivo de entender la compleja interacción entre la microbiota y el síndrome metabólico.

9. CONCLUSIONES

En este primer estudio de trasplante de VLPs de humano a ratones obesos con síndrome metabólico, encontramos que la microbiota puede ser modulada a largo plazo (17 semanas post-trasplante) pudiendo contribuir positivamente sobre el metabolismo de estos animales. La disminución de *Akkermansia muciniphila* y *Mucispirillum schaedleri* y el aumento de *Allobaculum* en el grupo que recibió el trasplante de VLPs podría contribuir a la tendencia de mejora en la tolerancia a la glucosa. Nuestros resultados en concordancia con el experimento de Rasmussen indican que tal vez aumentando el número de VLPs en repetidas dosis podría observarse un efecto más pronunciado sobre el metabolismo y el peso de los animales obesos con síndrome metabólico. Asimismo, nuestros resultados en relación con *Akkermansia muciniphila* sugieren que en los ensayos de modulación de la microbiota debe tomarse en cuenta la dieta, pues esta puede determinar la actividad benéfica o perjudicial de estos microorganismos sobre el hospedero. Este estudio presenta evidencia del papel que podrían jugar los bacteriófagos en la modulación de la microbiota en enfermedades asociadas a disbiosis, como la obesidad y el síndrome metabólico, y abre las puertas a nuevas investigaciones en el campo.

10. REFERENCIAS

- Arias, L., Goig, G. A., Cardona, P., Torres-Puente, M., Díaz, J., Rosales, Y., Garcia, E., Tapia, G., Comas, I., Vilaplana, C., & Cardona, P. J. (2019). Influence of Gut Microbiota on Progression to Tuberculosis Generated by High Fat Diet-Induced Obesity in C3HeB/FeJ Mice. *Frontiers in Immunology*, *10*(October), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02464>
- Astudillo-García, C., Bell, J. J., Webster, N. S., Glasl, B., Jompa, J., Montoya, J. M., & Taylor, M. W. (2017). Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation. *Environmental Microbiology*, *19*(4), 1450–1462.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13647>
- Azimi, T., Mosadegh, M., Nasiri, M. J., Sabour, S., Karimaei, S., & Nasser, A. (2019). Phage therapy as a renewed therapeutic approach to mycobacterial infections: A comprehensive review. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 2943–2959.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S218638>
- Bai, J., Zhu, Y., & Dong, Y. (2018). Modulation of gut microbiota and gut-generated metabolites by bitter melon results in improvement in the metabolic status in high fat diet-induced obese rats. *Journal of Functional Foods*, *41*(December 2017), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.050>
- Barr, J. J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K. L., Erb, M. L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A. S., Doran, K. S., Salamon, P., Youle, M., & Rohwer, F. (2013). Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(26), 10771–10776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>
- Becerra, G., Cell, M., Becerra, L. G., Granados, F. C., López, R. G., Lara, A. V., Bikel, S., Quinteros, S. C., Contreras, B. E. L., & Vargas, A. M. (2020). Metatranscriptomic analysis to define the Secrebiome , and 16S rRNA profiling of the gut microbiome in obesity and metabolic syndrome of Mexican children. *Microbial Cell Factories*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01319-y>

- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Boling, L., Cuevas, D. A., Grasis, J. A., Kang, H. S., Knowles, B., Levi, K., Maughan, H., Mcnair, K., Rojas, M. I., Sanchez, E., Smurthwaite, C., Rohwer, F., Sanchez, E., Smurthwaite, C., & Rohwer, F. (2020). Dietary prophage inducers and antimicrobials : toward landscaping the human gut microbiome. *Gut Microbes*, 00(00), 1–14. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1701353>
- Carding, S. R., Davis, N., & Hoyles, L. (2017). Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 46(9), 800–815. <https://doi.org/10.1111/apt.14280>
- Castaner, O., Goday, A., Park, Y. M., Lee, S. H., Magkos, F., Shiow, S. A. T. E., & Schröder, H. (2018). The gut microbiome profile in obesity: A systematic review. *International Journal of Endocrinology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4095789>
- Chatterjee, A., & Duerkop, B. A. (2018). Beyond bacteria: Bacteriophage-eukaryotic host interactions reveal emerging paradigms of health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01394>
- Cirstea, M., Radisavljevic, N., & Finlay, B. B. (2018). Good Bug, Bad Bug: Breaking through Microbial Stereotypes. *Cell Host and Microbe*, 23(1), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.008>
- Conlon, M. A., & Bird, A. R. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7(1), 17–44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V., & Dinan, T. G. (2020). The gut microbiome in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 19(2), 179–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4)
- Dabke, K., Hendrick, G., & Devkota, S. (2019). The gut microbiome and metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4050–4057.

<https://doi.org/10.1172/JCI129194>

de Groot, P. F., Frissen, M. N., de Clercq, N. C., & Nieuwdorp, M. (2017). Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes*, *8*(3), 253–267. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1293224>

De Sordi, L., Lourenço, M., & Debarbieux, L. (2019a). “I will survive”: A tale of bacteriophage-bacteria coevolution in the gut. *Gut Microbes*, *10*(1), 92–99. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1474322>

De Sordi, L., Lourenço, M., & Debarbieux, L. (2019b). The Battle Within: Interactions of Bacteriophages and Bacteria in the Gastrointestinal Tract. *Cell Host and Microbe*, *25*(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.018>

Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, *167*(5), 1339–1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>

Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W180–W188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>

Dieterich, W., Schink, M., & Zopf, Y. (2018). Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Medical Sciences*, *6*(4), 116. <https://doi.org/10.3390/medsci6040116>

Duerkopid, B. A. (2018). Bacteriophages shift the focus of the mammalian microbiota. *PLOS Pathogens*, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007310>

Duvallet, C., Gibbons, S. M., Gurry, T., Irizarry, R. A., & Alm, E. J. (2017). Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01973-8>

- Esposito, K., Chiodini, P., Colao, A., Lenzi, A., & Giugliano, D. (2012). Metabolic syndrome and risk of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 35(11), 2402–2411. <https://doi.org/10.2337/dc12-0336>
- Festi, D., Schiumerini, R., Eusebi, L. H., Marasco, G., Taddia, M., Colecchia, A., Festi, D., Schiumerini, R., Eusebi, L. H., Marasco, G., Taddia, M., & Colecchia, A. (2014). *Gut microbiota and metabolic syndrome*. 20(43), 16079–16094. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16079>
- Ganesh, B. P., Klopfleisch, R., Loh, G., & Blaut, M. (2013). *Commensal Akkermansia muciniphila Exacerbates Gut Inflammation in Salmonella Typhimurium-Infected Gnotobiotic Mice*. 8(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074963>
- Ganeshan, S. D., & Hosseinidou, Z. (2019). Phage therapy with a focus on the human microbiota. *Antibiotics*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030131>
- García-López, R., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Sánchez-López, F., Cota-Huizar, A., Sotelo-Mundo, R. R., Guerrero, A., Mendoza-Vargas, A., Gómez-Gil, B., & Ochoa-Leyva, A. (2020). Doing more with less: A comparison of 16S hypervariable regions in search of defining the shrimp microbiota. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010134>
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). *review Current understanding of the human microbiome*. 24(4), 392–400. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
- Greetham, H. L., Gibson, G. R., Giffard, C., Hippe, H., Merkhoffer, B., Steiner, U., Falsen, E., & Collins, M. D. (2004). *Allobaculum stercoricanis gen . nov ., sp . nov ., isolated from canine feces*. 10, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.06.004>
- Gutierrez-Solis, A. S., & Banik, S. D. (2018). *Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico : XX(Xx)*, 1–11. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0157>
- Hannigan, G. D., Duhaime, M. B., Ruffin, M. T., Koumpouras, C. C., & Schloss, P. D. (2018). Diagnostic potential and interactive dynamics of the colorectal cancer

- virome. *MBio*, 9(6), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.02248-18>
- Hegde, S., Lin, Y. M., Golovko, G., Khanipov, K., Cong, Y., Savidge, T., Fofanov, Y., & Shi, X. Z. (2018). Microbiota dysbiosis and its pathophysiological significance in bowel obstruction. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31033-0>
- Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., & Wargo, J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, 25(3), 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7>
- Herrmann, E., Young, W., Rosendale, D., Reichert-Grimm, V., Riedel, C. U., Conrad, R., & Egert, M. (2017). RNA-Based Stable Isotope Probing Suggests *Allobaculum* spp. as Particularly Active Glucose Assimilators in a Complex Murine Microbiota Cultured in Vitro. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1829685>
- Hsu, B. B., Gibson, T. E., Yeliseyev, V., Liu, Q., Lyon, L., Bry, L., Silver, P. A., & Gerber, G. K. (2019). Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. *Cell Host and Microbe*, 25(6), 803-814.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.001>
- Hugenholtz, F., & de Vos, W. M. (2018). Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2693-8>
- Kanter, R., & Caballero, B. (2012). *Global Gender Disparities in Obesity : A Review 1*. 491–498. <https://doi.org/10.3945/an.112.002063.published>
- Kc, C., Li, Y., & Jt, C. (2018). *The Areas Under Curves (AUC) used in diabetes research : Update view*. 4(3), 1–2. <https://doi.org/10.15761/IOD.1000212>
- Keen, E. C., & Dantas, G. (2018). Close Encounters of Three Kinds: Bacteriophages, Commensal Bacteria, and Host Immunity. *Trends in Microbiology*, 26(11), 943–954. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.009>

- Keller, E., Pfäffle, R., Kiess, W., & Körner, A. (2018). *new england journal*. 2018.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803527>
- Kim, P., Gadani, A., Abdul-baki, H., Mitre, R., & Mitre, M. (2018). *Fecal microbiota transplantation in recurrent Clostridium dif fi cile infection : A retrospective single-center chart review*. 4–9. <https://doi.org/10.1002/jgh3.12093>
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, J., De Angelis, M. H., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Müller, T. D., & Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
- Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., Hermes, G., Bouter, K. E., Koopen, A. M., Holst, J. J., Knop, F. K., Blaak, E. E., Zhao, J., Smidt, H., Harms, A. C., Hankemeijer, T., Bergman, J. J. G. H. M., Romijn, H. A., Schaap, F. G., ... Nieuwdorp, M. (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metabolism*, 26(4), 611-619.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.008>
- Laforest-Lapointe, I., & Arrieta, M.-C. (2018). Microbial Eukaryotes: a Missing Link in Gut Microbiome Studies. *MSystems*, 3(2), 1–5.
<https://doi.org/10.1128/msystems.00201-17>
- Lin, D. M., Koskella, B., Ritz, N. L., Lin, D., Carroll-Portillo, A., & Lin, H. C. (2019). Transplanting Fecal Virus-Like Particles Reduces High-Fat Diet-Induced Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00348>
- López-Contreras, B. E., Morán-Ramos, S., Villarruel-Vázquez, R., Macías-Kauffer, L., Villamil-Ramírez, H., León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Sánchez-Muñoz, F., Llanos-Moreno, L. E., Canizalez-Román, A., del Río-Navarro, B., Ibarra-González, I., Vela-

- Amieva, M., Villarreal-Molina, T., Ochoa-Leyva, A., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-Quinteros, S. (2018). Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. *Pediatric Obesity, 13*(6), 381–388. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12262>
- Loy, A., Pfann, C., Steinberger, M., Hanson, B., Herp, S., Brugiroux, S., Gomes, C., Boekschoten, M. V., Schwab, C., Urich, T., Ramer-Tait, A. E., Rattei, T., Stecher, B., & Berry, D. (2017). *schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *MSystems, 2*(1), e00171-16. <https://doi.org/10.1111/j.1751-8369.2007.00022.x>
- Lozupone, C. A. (2013). *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. 489*(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>.Diversity
- Ma, Y., You, X., Mai, G., Tokuyasu, T., & Liu, C. (2018). A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. *Microbiome, 6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0410-y>
- Macchione, I. G., Lopetuso, L. R., Ianiro, G., Napol, M., Gibiino, G., Rizzatt, G., Petito, V., Gasbarrini, A., & Scaldaferrri, F. (2019). Akkermansia muciniphila: Key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 23*(18), 8075–8083. https://doi.org/10.26355/eurrev_201909_19024
- Maffeis, C. (2019). *Treatment of Metabolic Syndrome in. 10*(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00702>
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host and Microbe, 23*(6), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- McCracken, E., Monaghan, M., & Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology, 36*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
- Medina, G., Vera-Lastra, O., Peralta-Amaro, A. L., Jiménez-Arellano, M. P., Saavedra, M.

- A., Cruz-Domínguez, M. P., & Jara, L. J. (2018). Metabolic syndrome, autoimmunity and rheumatic diseases. *Pharmacological Research*, *133*, 277–288.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.009>
- Medina, O. N., Arriaga, R. V., Valverde, L. F., López, C. P. R., Skidmore, O. M., Torres, M. C. G., Camacho, M. E. I., & López, S. G. (2016). Prevalence of metabolic syndrome in overweight and obese schoolchildren. *Ciencias Clínicas*, *16*(1), 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.01.004>
- Morrison, K. E., Jašarević, E., Howard, C. D., & Bale, T. L. (2020). It's the fiber, not the fat: Significant effects of dietary challenge on the gut microbiome. *Microbiome*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-0791-6>
- Mujico, J. R., Baccan, G. C., Gheorghe, A., Díaz, L. E., & Marcos, A. (2013). Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*, *110*(4), 711–720.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512005612>
- Nakatsu, G., Zhou, H., Wu, W. K. K., Wong, S. H., Coker, O. O., Dai, Z., Li, X., Szeto, C. H., Sugimura, N., Lam, T. Y. T., Yu, A. C. S., Wang, X., Chen, Z., Wong, M. C. S., Ng, S. C., Chan, M. T. V., Chan, P. K. S., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2018). Alterations in Enteric Virome Are Associated With Colorectal Cancer and Survival Outcomes. *Gastroenterology*, *155*(2), 529-541.e5.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.018>
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., & Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>
- Nirmalkar, K., Murugesan, S., Villalobos-flores, L. E., Garc, C., & Mar, R. (2018). *Gut Microbiota and Endothelial Dysfunction Markers*.
<https://doi.org/10.3390/nu10122009>
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Catherine, Y., Keller, B. C.,

- Kambal, A., Zhao, G., Stappenbeck, T. S., MCGovern, D. P. B., Keshavarzian, A., Ece, A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., & Virgin, H. W. (2016). *NIH Public Access*. 160(3), 447–460.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>.Disease-specific
- Ott, S. J., Waetzig, G. H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J. A., Cassidy, L., Tholey, A., Fickenscher, H., Seegert, D., Rosenstiel, P., & Schreiber, S. (2017). Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology*, 152(4), 799-811.e7.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010>
- Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*, 166(2), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.003>
- Rasmussen, T. S., Märta, C., Mentzel, J., Kot, W., Castro-, J. L., Zuffa, S., Swann, J. R., Hansen, L. H., Vogensen, F. K., Hansen, A. K., & Nielsen, D. S. (2020). *Faecal virome transplantation decreases symptoms of type 2 diabetes and obesity in a murine model*. 1–9. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320005>
- Reyes, A., Wu, M., McNulty, N. P., Rohwer, F. L., & Gordon, J. I. (2013). Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20236–20241.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1319470110>
- Reyes, Alejandro, Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466(7304), 334–338.
<https://doi.org/10.1038/nature09199>
- Ridaura, V. K., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, L., Griffi, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Michael, J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, J., Martini, M. C., Ursell, L. K., ... Gordon, J. I. (2013). *Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in*

Mice. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>

Robertson, B. R., O'Rourke, J. L., Neilan, B. A., Vandamme, P., On, S. L. W., Fox, J. G., & Lee, A. (2005). *Mucispirillum schaedleri* gen. nov., sp. nov., a spiral-shaped bacterium colonizing the mucus layer of the gastrointestinal tract of laboratory rodents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(3), 1199–1204. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63472-0>

Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blottière, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., Hwalla, N., Hursting, S. D., Leitzmann, M., Margetts, B., & Nishida, C. (2017). Energy balance and obesity : what are the main drivers ? *Cancer Causes & Control*, *0*(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10552-017-0869-z>

Sausset, R., Petit, M. A., & Paepe, M. De. (2020). New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunology*, December 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5>

Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Martens, E. C., Eaton, K. A., Chen, G. Y., Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N. A., Mitchell, J., Baxter, N. T., Zhao, L., Schloss, P. D., Martens, E. C., Eaton, K. A., & Chen, G. Y. (2017). NLRP6 Protects Il10^À / À Mice from Colitis by Limiting Colonization of Akkermansia muciniphila Article NLRP6 Protects Il10^À / À Mice from Colitis by Limiting Colonization of Akkermansia muciniphila. *CellReports*, *19*(4), 733–745. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.080>

Shkoporov, A. N., & Hill, C. (2019). Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. *Cell Host and Microbe*, *25*(2), 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017>

Sudun, Liu, S., Xiao, C., Peng, C., Liang, L., He, X., Zhao, S., & Zhang, G. (2019). Probiotic strains improve high-fat diet-induced hypercholesterolemia through modulating gut microbiota in ways different from atorvastatin. *Food and Function*, *10*(9), 6098–6109. <https://doi.org/10.1039/c9fo00444k>

- Szelachowska, M. Ł., Dąbrowska, B. W., Matysiak, E. J., & Wojciechowska, R. (2017). *Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications*. 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0196-7>
- Tak, Y. J., & Lee, S. Y. (2020). Anti-Obesity Drugs: Long-Term Efficacy and Safety: An Updated Review. *The World Journal of Men's Health*, 38. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200010>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, 11(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Vrieze, A., Nood, E. L. S. V. A. N., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., & Stroes, E. S. (2012). Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin. *YGAST*, 143(4), 913–916.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>
- Wang, J., Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Wen, L., & Duffy, A. (2017). Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *The Journal of Nutrition*, 147(7), 1468S–1475S. <https://doi.org/10.3945/jn.116.240754>
- Yadav, M., Verma, M. K., & Chauhan, N. S. (2018). A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*, 200(2), 203–217. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x>
- Yu, E. W., Id, L. G., Stastka, P., Id, M. C. C., Mahabamunuge, J., Torres, M., Id, S., Id, C. B. F.,

Id, A. B., Id, M. R. H., & Hohmann, E. L. (2020). *Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity : The pilot trial*. 1–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003051>

Zhang, Z., Mocanu, V., Cai, C., Dang, J., Slater, L., Deehan, E. C., Walter, J., & Madsen, K. L. (2019). Impact of fecal microbiota transplantation on obesity and metabolic syndrome- a systematic review. *Nutrients*, *11*(10).

<https://doi.org/10.3390/nu11102291>

Zhao, G., Vatanen, T., Droit, L., Park, A., Kostic, A. D., Poon, T. W., Vlamakis, H., Siljander, H., Härkönen, T., Hämäläinen, A. M., Peet, A., Tillmann, V., Ilonen, J., Wang, D., Knip, M., Xavier, R. J., & Virgin, H. W. (2017). Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(30), E6166–E6175.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1706359114>

Zuo, T., Wong, S. H., Lam, K., Lui, R., Cheung, K., Tang, W., Ching, J. Y. L., Chan, P. K. S., Chan, M. C. W., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Yu, J., Sung, J. J. Y., & Ng, S. C. (2018). Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is associated with treatment outcome. *Gut*, *67*(4), 634–643.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313952>

11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Muestras fecales secuenciadas de ratones inoculados con partículas virales (VLPs) o Buffer control, y parámetros metabólicos determinados. El día 0 corresponde al momento previo al trasplante. ND= no se determinó; AUC= Área bajo la curva.

Grupo	Tiempo post-trasplante	ID	Peso (gr)	AUC (mg.min/dL) Tolerancia a la glucosa	AUC (mg.min/dL) Resistencia a la Insulina
VLPs	Día 0	V0-R1	42.2	63150	ND
VLPs	Día 0	V0-R3	50.2	59617.5	ND
VLPs	Día 0	V0-R4	48.9	ND	20962.5
VLPs	Día 0	V0-R6	48	ND	18157.5
VLPs	Día 1	V1-R1	ND	ND	ND
VLPs	Día 1	V1-R3	ND	ND	ND
VLPs	Día 1	V1-R4	ND	ND	ND
VLPs	Día 1	V1-R6	ND	ND	ND
VLPs	Semana 1	V7-R1	42.5	ND	ND
VLPs	Semana 1	V7-R3	49.8	ND	ND
VLPs	Semana 1	V7-R4	48	ND	ND
VLPs	Semana 1	V7-R6	46	ND	ND
VLPs	Semana 10	V11-R1	49.3	53257.5	21075
VLPs	Semana 10	V11-R3	56	49200	23632.5
VLPs	Semana 10	V11-R4	54.3	39697.5	23655
VLPs	Semana 10	V11-R6	54.2	56145	21772.5
VLPs	Semana 17	V18-R1	46.8	40455	16297.5
VLPs	Semana 17	V18-R3	59.1	40965	20985
VLPs	Semana 17	V18-R4	52.2	46440	20407.5
VLPs	Semana 17	V18-R6	53.9	67125	22215
Control	Día 0	C0-R1	49.8	56362.5	ND
Control	Día 0	C0-R3	44.9	52207.5	ND
Control	Día 0	C0-R4	45.7	ND	18412.5
Control	Día 0	C0-R5	45.9	ND	22297.5
Control	Día 1	C1-R1	ND	ND	ND
Control	Día 1	C1-R3	ND	ND	ND
Control	Día 1	C1-R4	ND	ND	ND
Control	Día 1	C1-R5	ND	ND	ND
Control	Semana 1	C7-R1	49.5	ND	ND
Control	Semana 1	C7-R3	40.2	ND	ND
Control	Semana 1	C7-R4	43.9	ND	ND
Control	Semana 1	C7-R5	46.1	ND	ND
Control	Semana 10	C11-R1	56.9	40290	20160
Control	Semana 10	C11-R3	49.4	56385	22747.5
Control	Semana 10	C11-R4	50.7	66727.5	22140
Control	Semana 10	C11-R5	51.4	58102.5	21360
Control	Semana 17	C18-R1	55.5	38760	16005
Control	Semana 17	C18-R3	47	64537.5	19042.5
Control	Semana 17	C18-R4	51.3	56602.5	14857.5
Control	Semana 17	C18-R5	51.9	51742.5	19170

Tabla S2. Resumen del procesamiento bioinformático: Lecturas antes y después de la unión de secuencias pareadas (R1 y R2), filtro por calidad ($q>20$) y por tamaño (>350 nt), y asignadas por QIIME v1.9.

ID	Lecturas crudas (n)	Join-paired ends (n, %)	Filtro de calidad (n, %)	Lecturas > 350 nt (n, %)	Asignadas por Qiime (n, %)
C0-R1	737279	695807 (94.4)	695102 (99.8)*	51587 (59.3)	21,991 (42.6)
C0-R3	81836	77368 (95.5)	77313 (99.9)	46742 (60.5)	20,783 (44.5)
C0-R4	75856	71026 (93.6)	70966 (99.9)	39202 (55.2)	18,350 (46.8)
C0-R5	102621	97287 (94.8)	97179 (99.9)	58642 (60.3)	24,897 (42.5)
C1-R1	65491	62274 (95.1)	62224 (99.9)	37620 (60.5)	15,376 (40.9)
C1-R3	65736	62245 (94.7)	62183 (99.9)	37712 (60.6)	16,344 (43.3)
C1-R4	66904	62919 (94.0)	62850 (99.9)	37810 (60.2)	16,764 (44.3)
C1-R5	77233	72995 (94.5)	72919 (99.9)	44431 (60.9)	18,982 (42.7)
C7-R1	65288	62134 (95.2)	62064 (99.8)	38472 (62.0)	19,272 (50.1)
C7-R3	70792	66773 (94.3)	66689 (99.8)	39664 (59.5)	17,159 (43.3)
C7-R4	77595	73177 (94.3)	73099 (99.9)	44098 (60.3)	21,364 (48.4)
C7-R5	64650	61234 (94.7)	61181 (99.9)	35846 (58.6)	16,295 (45.5)
C11-R1	106470	101143 (95.0)	101044 (99.9)	60298 (59.7)	26,848 (44.5)
C11-R3	90355	86108 (95.3)	86031 (99.9)	53797 (62.5)	25,553 (47.5)
C11-R4	98333	93949 (95.5)	93874 (99.9)	57279 (61.0)	25,911 (45.2)
C11-R5	100007	95981 (96.0)	95903 (99.9)	60617 (63.2)	27,258 (44.9)
C18-R1	99885	95959 (96.1)	95872 (99.9)	61560 (64.2)	26,537 (43.1)
C18-R3	87247	83367 (95.5)	83271 (99.9)	52546 (63.1)	22,107 (42.1)
C18-R4	97434	92608 (95.0)	92502 (99.9)	58087 (62.7)	28,213 (48.6)
C18-R5	80257	76311 (95.1)	76248 (99.9)	47252 (61.9)	19,280 (40.8)
V0-R1	87776	83981 (95.7)	83898 (99.9)	52179 (62.2)	18,927 (36.3)
V0-R3	93075	89193 (95.8)	89115 (99.9)	54260 (60.9)	23,688 (43.7)
V0-R4	93615	89193 (95.3)	89110 (99.9)	53554 (60.1)	21,929 (40.9)
V0-R6	89253	85357 (95.6)	85279 (99.9)	52861 (62.0)	22,926 (43.4)
V1-R1	118199	113056 (95.6)	112941 (99.9)	69484 (61.5)	32,849 (47.3)
V1-R3	95428	90441 (94.7)	90350 (99.9)	55384 (61.3)	23,488 (42.4)
V1-R4	88184	83574 (94.7)	83495 (99.9)	51397 (61.6)	24,092 (46.9)
V1-R6	97882	92532 (94.5)	92465 (99.9)	53254 (57.6)	26,322 (49.4)
V7-R1	74180	70822 (95.5)	70749 (99.9)	42706 (60.4)	18,614 (43.6)
V7-R3	84431	80156 (94.0)	80076 (99.9)	49451 (61.8)	22,847 (46.2)
V7-R4	92623	88216 (95.2)	88122 (99.9)	55622 (63.1)	24,941 (44.8)
V7-R6	101613	97413 (95.9)	97325 (99.9)	62370 (64.1)	28,861 (46.3)
V11-R1	100073	95392 (95.3)	95318 (99.9)	59491 (62.4)	26,429 (44.4)
V11-R3	108672	104077 (95.8)	103981 (99.9)	63504 (61.1)	26,898 (42.4)
V11-R4	89436	84836 (94.8)	84741 (99.9)	51432 (60.7)	22,264 (43.3)
V11-R6	88067	84211 (95.6)	84122 (99.9)	53453 (63.5)	24,009 (44.9)
V18-R1	58811	54642 (92.9)	54581 (99.9)	31761 (58.2)	15,376 (48.4)
V18-R3	79169	75103 (94.9)	75037 (99.9)	47398 (63.2)	21,968 (46.3)
V18-R4	71798	68059 (94.8)	67996 (99.9)	41139 (60.5)	17,773 (43.2)
V18-R6	82156	78761 (95.9)	78684 (99.9)	50841 (64.6)	23,095 (45.4)
Promedio	102642.7	97492 (95.0±0.7)	97397.5 (99.9±0.01)	50370.1 (61.7±1.9)	22414.5 (44.5±2.7)

Figura S1. Curva de rarefacción de especies. El eje X representa el número de secuencias y el eje Y el número de especies obtenidas en cada rarefacción.

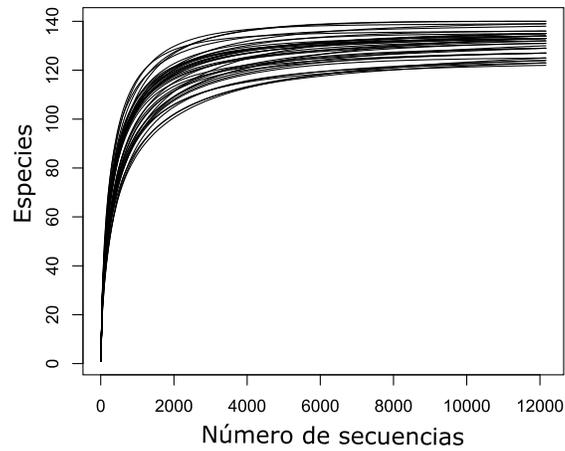
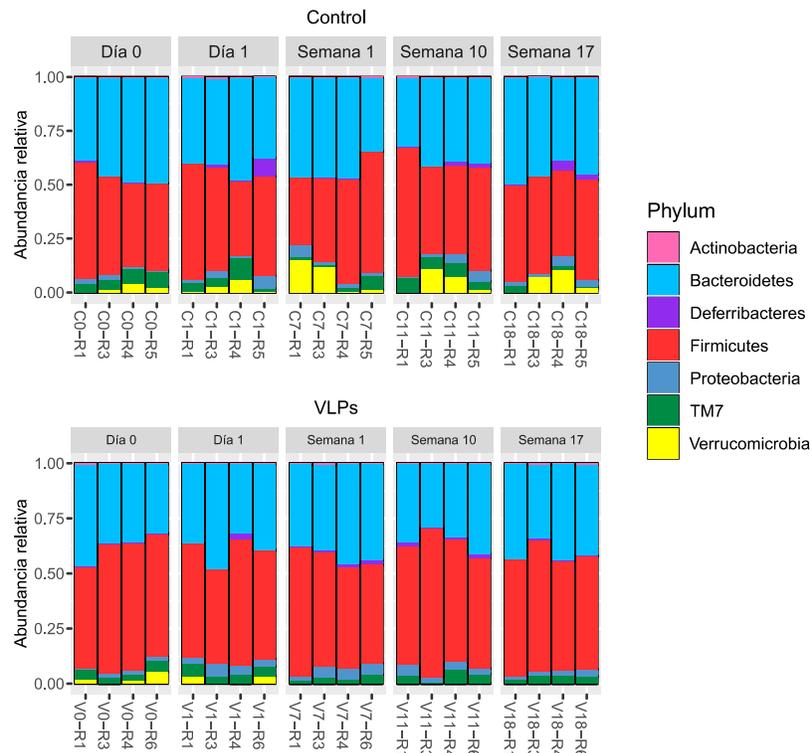
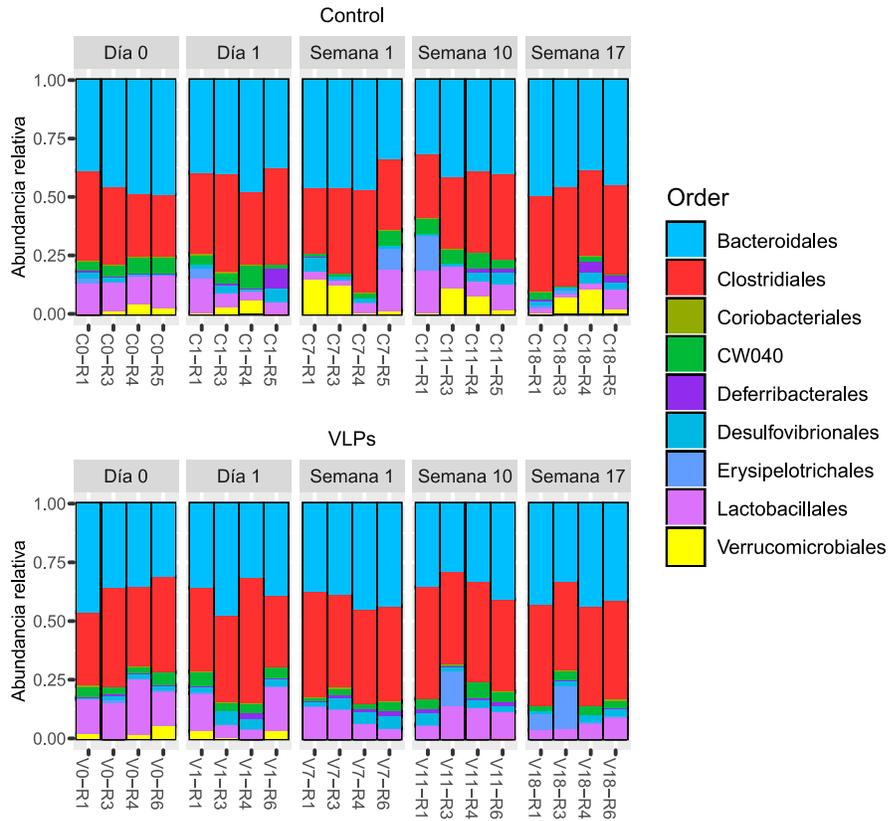
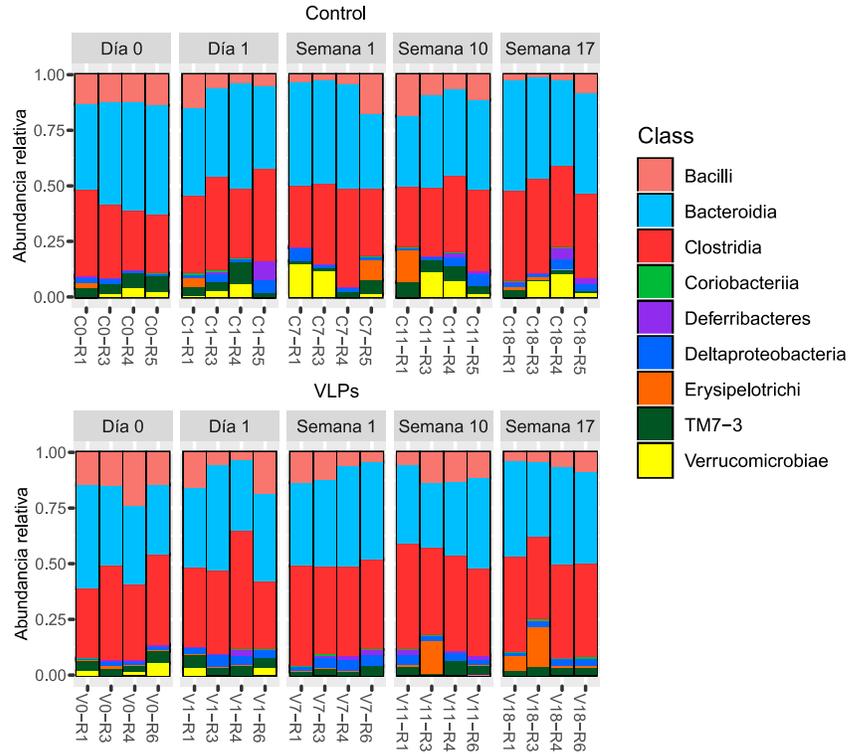
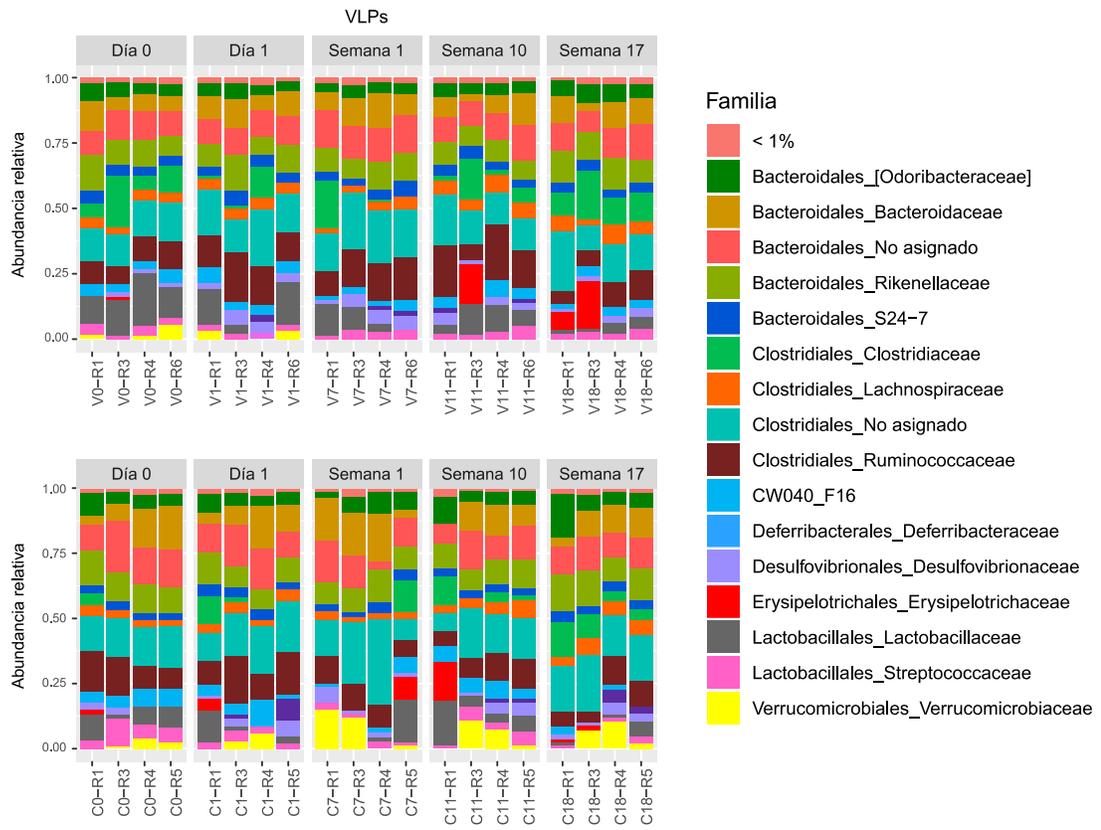
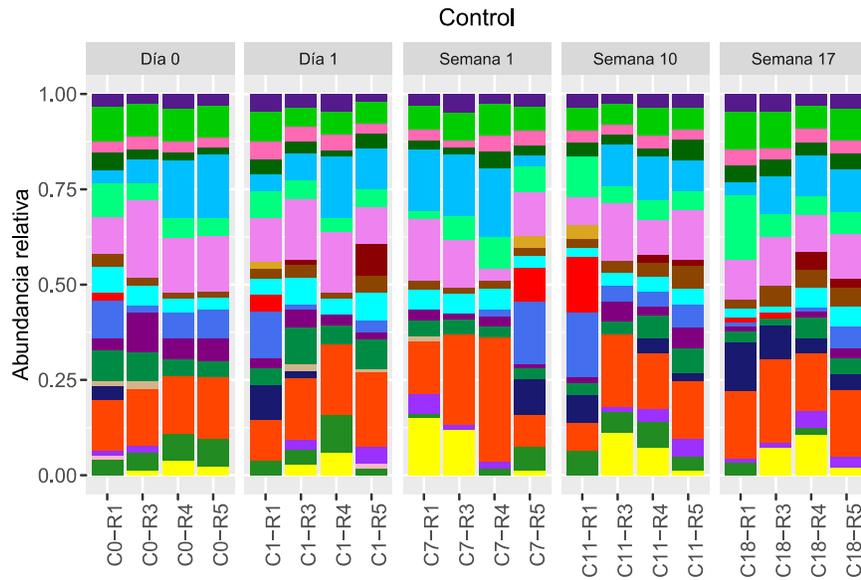
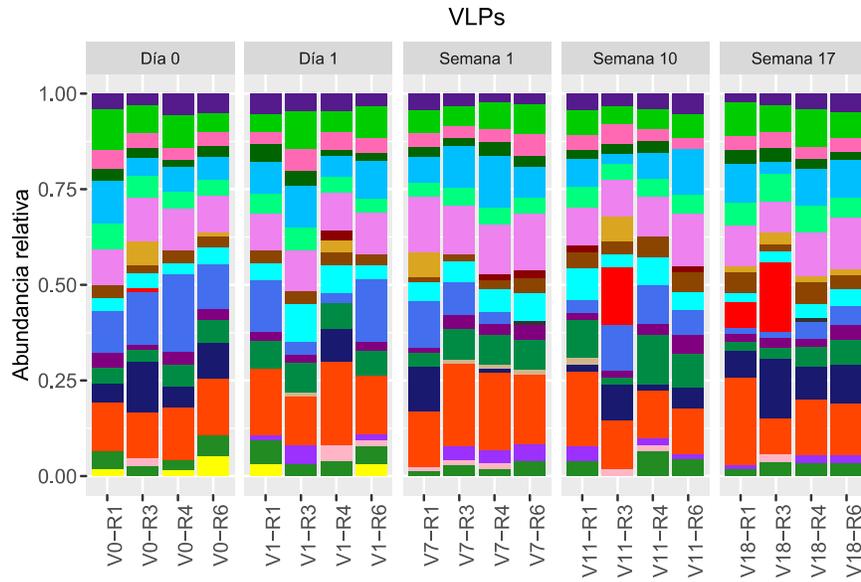


Figura S2. Perfil taxonómico bacteriano a nivel de filo, clase, orden, familia y género. Abundancia de cada ratón antes (día 0) y después del trasplante de VLPs.









Género

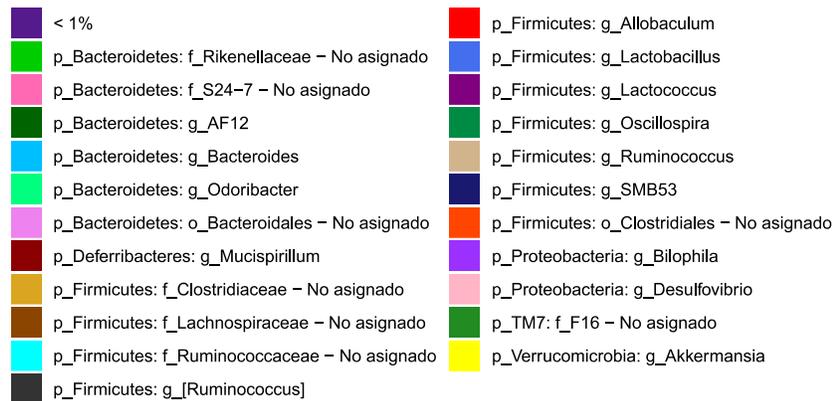


Figura S3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando las distancias UNIFRAC *Unweighted* (arriba) y *Weighted* (abajo) de las muestras fecales de ratones trasplantados con VLPs (n=20) o buffer (Control, n=20).

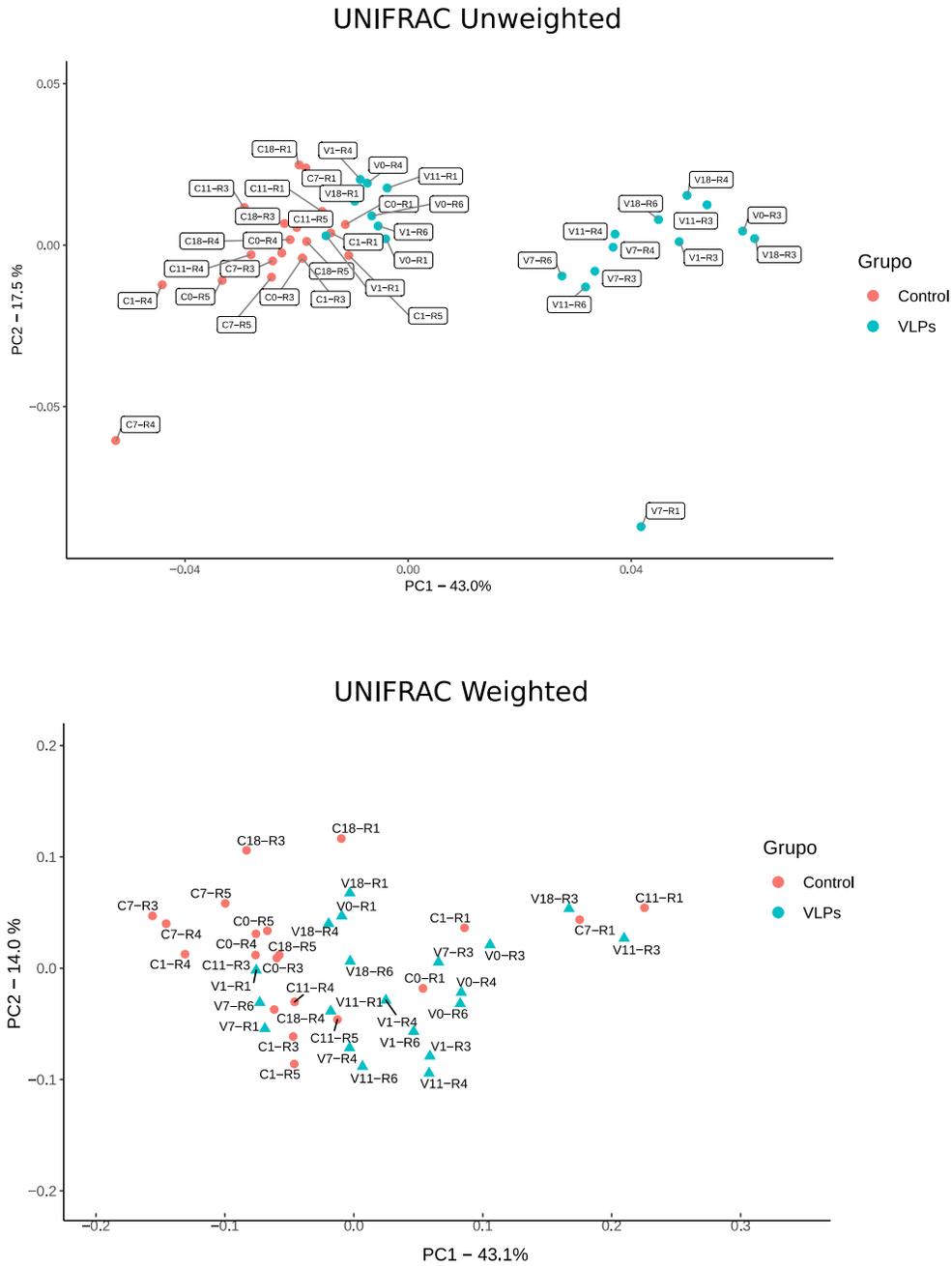


Figura S4. Bacterias diferenciales en el grupo de VLPs con respecto al Control en las semanas 1, 10 y 17 post-trasplante, empleando el método DESeq2. Se muestran únicamente los taxones con $p < 0.05$ y punto de corte de $\text{Log}_2\text{fold change}$ (Log_2FC) de 1.5. Los valores positivos de Log_2FC significan sobreabundancia en el grupo de VLPs con respecto al Control, mientras que los negativos indican menor abundancia. (p: filo, c: clase, o: orden, f: familia, g: género, s: especie).

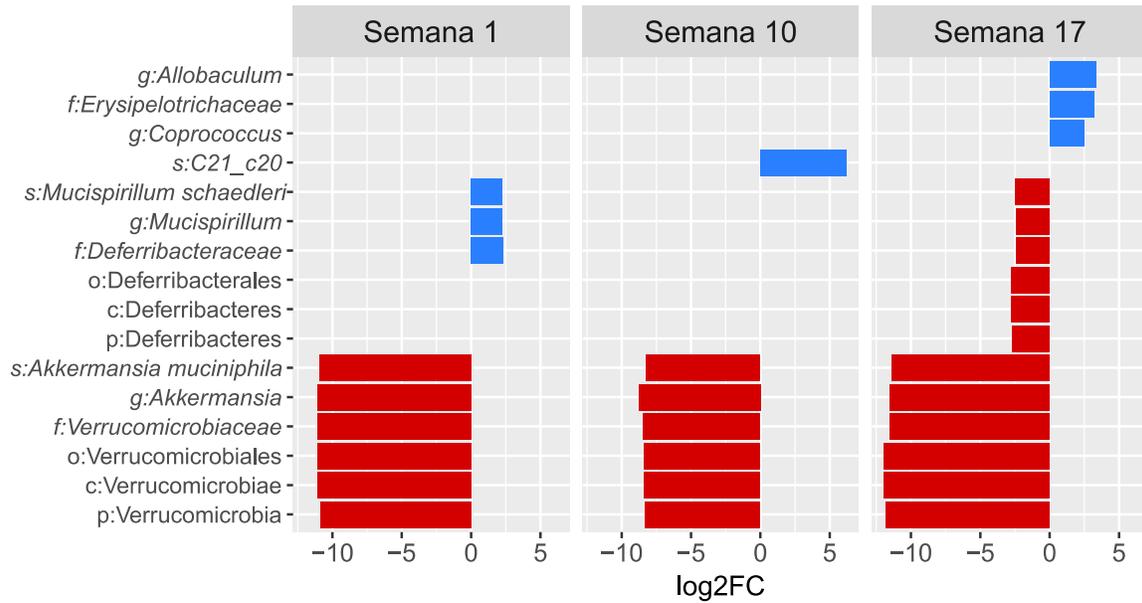
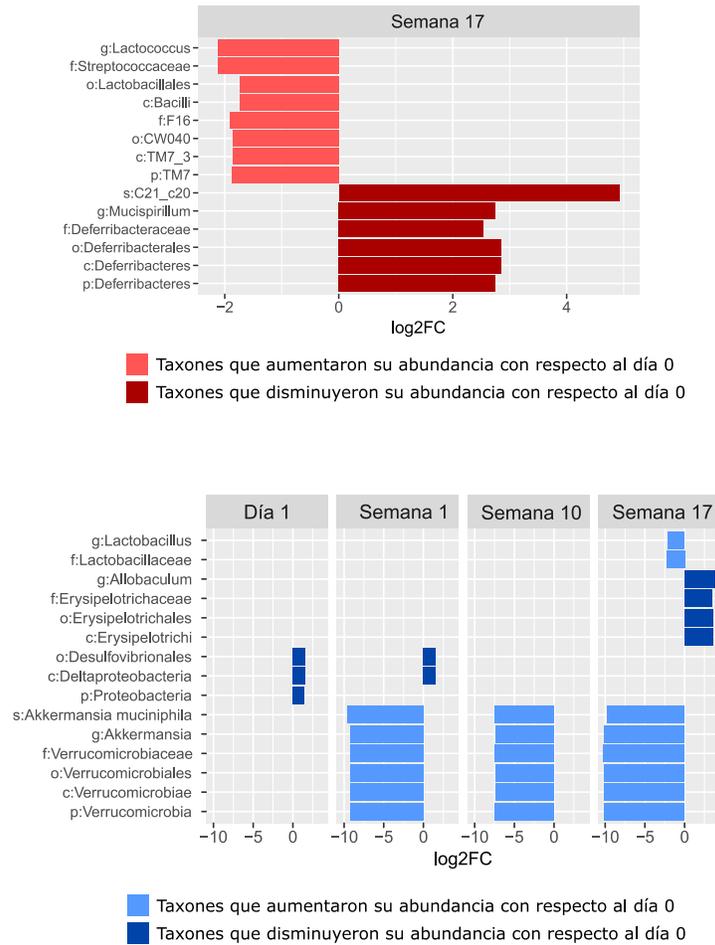


Figura S5. Cambios diferenciales longitudinales. Bacterias diferenciales en los grupos Control (color rojo) y VLPs (color azul) en cada punto post-tratamiento con respecto al día 0, empleando el método DESeq2. Se muestran únicamente los taxones con FDR<0.05 y punto de corte de *Log2fold change* (*Log2FC*) de 1.5. Los valores positivos de *Log2FC* significan sobreabundancia con respecto al día 0, mientras que los negativos indican menor abundancia. (p: filo, c: clase, o: orden, f: familia, g: género, s: especie).



a) Día 1 post-trasplante. Al transcurrir 24 horas a partir de la inoculación, se observó un ligero, pero significativo aumento en la abundancia relativa del filo Proteobacteria en el grupo de VLPs, dentro del cual se ve incrementado la clase Deltaproteobacteria y el orden Desulfovibrionales. En el Control no se observan cambios significativos con respecto al día 0.

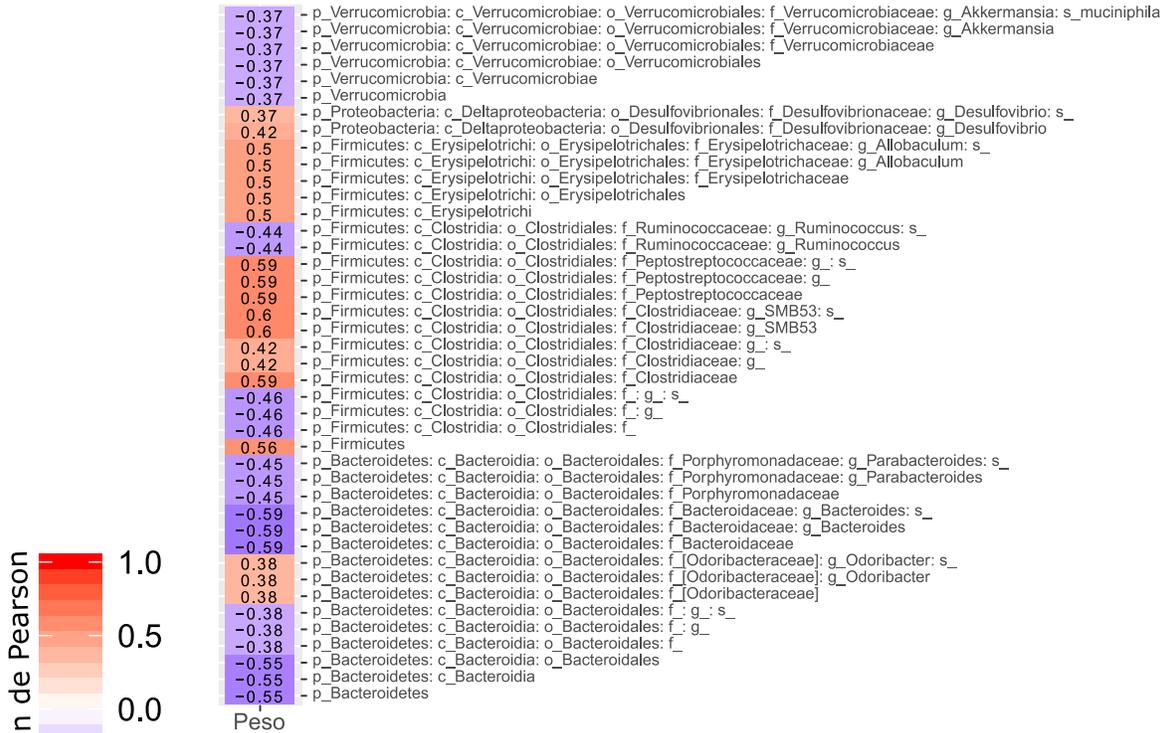
b) Semana 1 post-trasplante. Del día 0 a la semana 1, se observó una drástica reducción en *Akkermansia muciniphila* en el grupo de VLPs. Como en el día 1, el orden Desulfovibrionales permaneció aumentado en el grupo de VLPs en la semana 1, con respecto al día 0.

c) Semana 10 post-trasplante. *Akkermansia muciniphila* se mantuvo disminuida en el grupo de VLPs con respecto al día 0. En el grupo Control no se observan cambios significativos con respecto al día 0.

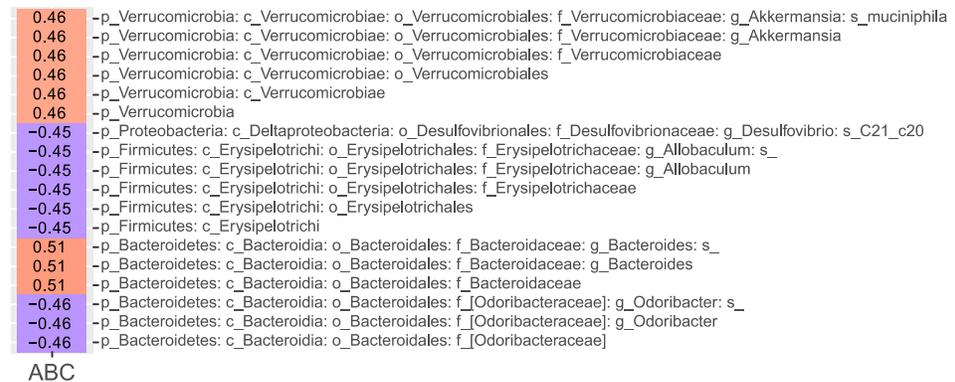
d) Semana 17 post-trasplante. La disminución de *Akkermansia muciniphila* se ve aún más marcada en la semana 17 en el grupo de VLPs. Esta bacteria se vuelve indetectable en 3 de 4 ratones. Asimismo, en este grupo se observa una disminución en *Lactobacillus*, y por el contrario, se encuentran incrementadas bacterias del género *Allobaculum*, la cual pertenece a la familia *Erysipelotrichaceae* de los Firmicutes y la significancia se da principalmente por 2 de 4 ratones que incrementan la abundancia de 1.2 y 0.2 % a 18 y 6.2%, respectivamente. Por otro lado, en el grupo Control se observan reducciones en *Lactococcus*, en el orden *Lactobacillales* y en la familia *Streptococcaceae*, mientras que *Mucispirillum schaedleri* aumenta, con respecto al día 0.

Figura S6. Correlaciones entre la abundancia relativa de las taxas bacterianas con los parámetros metabólicos. Se presenta el coeficiente de correlación de Pearson de todas las taxas asignadas con abundancia mayor al 0.1% *versus* el peso, y valores de área bajo la curva de las pruebas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Se muestran únicamente aquellas con correlación significativa ($p < 0.05$). (ABC= valor del Área bajo la curva, p: filo, c: clase, o: orden, f: familia, g: género, s: especie).

A. Correlación de abundancia relativa vs. Peso



B. Correlación de abundancia relativa vs. intolerancia a la glucosa



C. Correlación de abundancia relativa vs. resistencia a la insulina

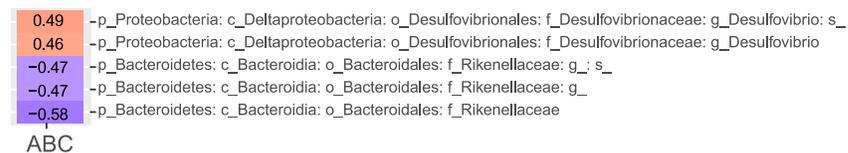


Figura S7. Diagrama de Venn de presencia/ausencia de bacterias en los diferentes niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género) encontrados en el inóculo de VLPs fecales y como estos se encontraron en los ratones inoculados con dichas VLPs o buffer (control), en el día 0 (antes del tratamiento) y en los días 1, semana 1, 10 y 17 post-trasplante, tomando en cuenta aquellos con abundancia mayor al 0.1%.

