



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL FAGOMA INTESTINAL DE RATONES CON
OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO INOCULADOS CON
PARTÍCULAS VIRALES DE NIÑOS NORMOPESO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIOL. MELANY JOSHELINE CERVANTES ECHEVERRIA

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Adrián Ochoa Leyva
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Blanca Itzelt Taboada Ramírez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. José Luis Puente García
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 en el Laboratorio 22 del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Adrián Ochoa Leyva y el comité tutorial formado por la Dra. Blanca Itzelt Taboada Ramírez y el Dr. José Luis Puente García. Se contó con apoyo de los proyectos CONACyT SALUD-2014-C01-234188, Ciencia de Frontera 2019 proyecto Número 263986 y DGAPA-PAPIIT-UNAM (IA203118 y IN215520).

La autora de esta tesis recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de cuenta 518023429 para realizar los estudios de maestría en el Programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatoria

*Mami, todo es por ti y para ti.
Para mi familia, gracias por todo.*

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo al Dr. Adrián Ochoa Leyva quien ha sido mi guía académico en los últimos años. Gracias por la atención, la orientación y los consejos, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme las herramientas para crecer profesionalmente.

A los doctores José Luis Puente y Blanca Taboada por su orientación y hacer de cada seminario una experiencia de mucho aprendizaje.

A los miembros del jurado que tuvieron la disposición de revisar la presente tesis: Dr. Carlos Arias, Dra. Rosa María Gutiérrez, Dr. Xavier Soberón, Dra. Leonor Pérez y Dr. Samuel Canizales, sus aportaciones fueron muy valiosas para el desarrollo de la misma.

A mis amigos del Laboratorio 22, a todos los que transitaron por el y a los que siguen presentes, gracias por todos los momentos compartidos.

Además, agradezco a la M. en C. Shirly Bikel, Lic. Abigail Hernandez, M en C. Fernanda Cornejo Granados y al Biol. Filiberto Sánchez López que colaboraron con su apoyo técnico para la elaboración de esta tesis.

Al M. en T. I. Juan Manuel Hurtado Ramírez, técnico de la Unidad de Cómputo del Instituto de Biotecnología, por su apoyo con la administración del servidor y al Dr. Rodrigo García López por su orientación en el procedimiento bioinformático. A Antonio Bolaños Guillen, Gloria Villa Herrera y Jalil Saab (quien nos dejó hace poco) de la Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos por facilitar los trámites durante la maestría y los de titulación. Por último, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por otorgarme financiamiento para asistir a presentar resultados en el congreso XXXII Congreso Nacional de Bioquímica y el Exploring Human Host-Microbiome Interactions in Health and Disease meeting.

Índice

	Pag.
Abreviaturas.....	7
Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	10
Abstract.....	11
Resumen.....	12
1. Introducción.....	14
1.1 La obesidad y el síndrome metabólico.....	14
1.2 Microbiota Intestinal.....	16
1.3 Microbiota, obesidad y síndrome metabólico.....	18
1.4 Modelos de ratón para el estudio de la microbiota intestinal humana	21
1.5 Fagoma intestinal humano.....	22
1.6 Dinámicas bacteria-fago en el intestino humano.....	24
1.7 Fagos del intestino humano presentes en diferentes condiciones.....	26
2. Antecedentes.....	27
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	31
5. Metodología.....	32
6. Resultados.....	51
7. Discusión de resultados.....	74
8. Conclusiones.....	80
9. Perspectivas.....	81
10. Material suplementario.....	82
11. Bibliografía.....	85

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ARN	Ácido ribonucleico
CAZymes	Enzimas activas de carbohidratos
DAG	Dieta alta en grasa
DT2	Diabetes tipo 2
GLP-2	Péptido-2 similar al glucagón
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal
IL-6	Interleucina-6
IL-15	Interleucina-15
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
IP-10	Proteína inducida por interferón gamma
LCA	Último ancestro en común
LNMA	Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada
LPS	Lipopolisacáridos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PTG	Prueba de tolerancia a la glucosa
SMet	Síndrome metabólico
TMA	Trimetilamina
TMF	Trasplante de microbiota fecal
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TVF	Trasplante de viroma fecal
VLP	Viral-like particle (Partícula viral)

Índice de figuras

	Pag.
Figura 1. Mapa de los porcentajes de obesidad infantil a nivel mundial.....	16
Figura 2. Factores que modifican la microbiota bacteriana y filos dominantes en diferentes etapas de la vida humana.....	18
Figura 3. Modelo de interacción entre la microbiota intestinal y la barrera epitelial y su contribución en enfermedades metabólicas.....	21
Figura 4. Clasificación y morfología de los principales grupo de fagos intestinales.....	23
Figura 5. Principales ciclos de replicación de los fagos.....	24
Figura 6. Diferentes dinámicas de interacción Bacteria-Fago.....	26
Figura 7. Descripción del modelo murino de diabetes tipo 2, sus diferentes dietas y tratamientos.....	29
Figura 8. Resultados de los análisis de Rasmussen et al., 2020.....	30
Figura 9. Grupos de ratones con SMet y sus diferentes tratamientos	36
Figura 10. Línea del tiempo del periodo experimental	37
Figura 11. Diagrama de flujo para el procesamiento bioinformático de las secuencias de VLPs de ratón.....	41
Figura 12. Peso de los ratones desde el inicio de la inducción del SMet hasta el sacrificio	52
Figura 13. Análisis estadístico sobre las AUC de la PTG	53
Figura 14. Micrográficas de VLPs intestinales en microscopio confocal invertido 60X.....	55
Figura 15. Gráfico de componentes principales (PCoA) para el fagoma de ratón.....	61
Figura 16. Gráficos de diversidad alfa del fagoma de ratón.....	62
Figura 17. Abundancia relativa (CPMs) de las familias virales del fagoma de ratón al día Preinoculación, Semana 10 y Semana 17.....	63
Figura 18. Gráfico de agrupamiento jerárquico del LogFC los contigs virales de ratón con abundancia diferencial.....	64
Figura 19. Relación del Log ₂ FC y q-value para los contigs diferenciales a la semana 10 postinoculación.....	65
Figura 20. Relación del Log ₂ FC y q-value para los contigs diferenciales a la semana 10 postinoculación.....	67
Figura 21. Gráfico de componentes principales (PCoA) para el fagoma de niños normopeso <i>vs</i> lecturas virales de ratón.....	70
Figura 22. Gráficos de diversidad α para el fagoma de niños normopeso <i>vs</i> lecturas virales de ratón.....	71

Figura 23. Abundancia relativa (CPMs) de las familias de fagos intestinales de niños normopeso presentes en los ratones con SMet al día Preinoculación, Semana10 y Semana 17.....	72
Figura 24. Gráficos de agrupamiento jerárquico de los contigs virales de ratón con abundancia diferencial	73
Figura S1. Curvas de tolerancia a la glucosa	83
Figura S2. Microscopía de las VLPs intestinales de humano del trabajo de Bikel et al., 2020.....	83
Figura S3. Electroforesis de las 9 librerías de ADN viral.....	84
Figura S4. Número de contigs del fagoma intestinal de ratón con abundancia diferencial	84
Figura S5. Número de contigs del fagoma intestinal de niños normopeso con abundancia diferencial	85

Índice de tablas

	Pag.
Tabla 1. Diferentes estudios de la respuesta de ratones ligados a la microbiota intestinal.....	22
Tabla 2. Composición calórica de las dietas murinas.....	35
Tabla 3. Especificaciones de las mezclas fecales realizadas.....	39
Tabla 4. Parámetros para remover adaptadores con CUTADAPT.....	42
Tabla 5. Parámetros para remover lecturas de baja complejidad con PRINSEQ.....	42
Tabla 6. Parámetros utilizados para remover lecturas de baja calidad con Trimmomatic.....	43
Tabla 7. Parámetros utilizados para identificar lecturas de ratón con SMALT...	44
Tabla 8. Parámetros utilizados para ensamblado y remover contigs duplicados del fagoma de ratón.....	45
Tabla 9. Parámetros utilizados para asignación taxonómica del fagoma de ratón.....	46
Tabla 10. Parámetros utilizados para el mapeo de las muestras de VLPs sobre el fagoma de ratón.....	46
Tabla 11. Relación de las muestras del estudio de Bikel et al. 2020 y las muestras utilizadas para el inóculo de los ratones.....	49
Tabla 12. Resultados de la cuantificación de VLPs intestinales de ratón con FIJI.	55
Tabla 13. Resultados de la cuantificación del ADN viral recuperado de cada mezcla	56
Tabla 14. Número de lecturas crudas para cada librería	56
Tabla 15. Número de lecturas correspondientes a cada filtrado realizado.....	58
Tabla 16. Porcentajes (%) de lecturas correspondientes a cada filtrado realizado.....	58
Tabla 17. Estadísticas importantes de los diferentes ensamblajes metagenómicos virales generados	59
Tabla 18. Número de lecturas alineadas sobre el ensamblaje del fagoma intestinal de ratón.....	60
Tabla 19. Clasificación taxonómica de los 5,498 contigs virales del fagoma de ratón.....	62
Tabla 20. Numero de contigs con cambios significantes en la semana 10 postinoculación y su clasificación taxonómica.....	65
Tabla 21. Número de contigs con cambios significantes en la semana 17 y su clasificación taxonómica.....	66
Tabla 22. Número de lecturas alineadas por muestra a los contigs del fagoma de niños normopeso.....	68
Tabla 23. Número de fagos identificados en el fagoma de niños normopeso y su clasificación taxonómica.....	69

Abstract

Human gut is a complex ecosystem where some compounds allow the growth of diverse microorganisms, the gut microbiota. Advances in next-generation sequencing technologies revealed that gut bacteria are present in different niches in the lumen and on the mucosal surfaces where they perform complex biochemical interactions with the host. Viral communities are an important element of the gut microbiota, particularly bacteriophages or phages have an important role in modulation of bacterial communities and horizontal gene transference. The effect of the variation of the bacterial gut microbiota has been studied in obesity and metabolic syndrome, however, entire populations of intestinal phages under these conditions are less understood.

In this project we evaluated a mice model with obesity and metabolic syndrome, induced by a high-fat diet. Mice were separated into 3 groups, each one with 6 mice and each group of mice received a different oral treatment:

1. Control Group inoculated with SM Buffer.
2. Inoculated Group with denatured viral-like particle from normal weight and metabolically healthy children.
3. Inoculated group with intact viral-like particles from normal weight and metabolically healthy children.

Inoculated group with intact viral-like particles showed an improvement in glucose tolerance at week 17 after the treatment. We decided to monitor the composition of their phageome at three different times: pre-inoculation, week 10 and week 17 post-inoculation, comparing the changes in the presence and abundance of the existing viral contigs on the Pre-inoculation day with the contigs from weeks 10 and 17 post-inoculation. Additionally, we found that the gut phages of mice with metabolic syndrome treated with VLPs from normal weight children showed changes in richness and diversity at weeks 10 and 17. Moreover, particular phages from different families were identified with differential abundance amongst the different times analyzed.

There are few works focused on the study of viral gut dynamics so the contribution in this research will help to complement the knowledge in relation to phage and gut microbiota in humans and mice used as models, as well as the changes in important diseases such as obesity and MetS for Mexican people.

Resumen

El interior del intestino humano es un ecosistema rico donde se encuentran compuestos secretados por el hospedero como glicoproteínas, saliva, jugo gástrico, sales biliares, mucinas, etc. Además, recibe aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta y fibra a través de la ingesta alimenticia diaria. Todos estos factores permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos que lo colonizan de manera permanente o transitoria como bacterias, arqueas, protozoos y virus, a este conjunto de poblaciones se les denomina microbiota intestinal.

Con los avances en las tecnologías de secuenciación masiva se ha revelado que las bacterias intestinales ocupan diferentes nichos ecológicos en el lumen y en las superficies de las mucosas intestinales donde realizan interacciones bioquímicas complejas con el hospedero. Además de las bacterias, las comunidades virales representan una parte importante en la composición de la microbiota intestinal y particularmente los virus procariotas, también conocidos como bacteriófagos o fagos; juegan un papel relevante al ser moduladores de las bacterias y vehículos de la transferencia horizontal de genes. Se ha estudiado la participación de la microbiota intestinal en enfermedades como obesidad y síndrome metabólico donde las comunidades bacterianas normales presentan cambios que pueden tener efectos negativos en la salud. No obstante, poco se ha estudiado acerca de las poblaciones completas de fagos intestinales (fagoma) en estas condiciones.

Para la elaboración de este proyecto de investigación se trabajó con un modelo de ratón de la cepa C57BL/6 con obesidad y síndrome metabólico inducidos por una dieta alta en grasas. Los ratones se dividieron en 3 grupos con 6 ratones cada uno, cada grupo de ratones recibió un tratamiento diferente administrado vía oral:

1. Grupo control inoculado con buffer SM.
2. Grupo inoculado con partículas virales desnaturalizadas de niños normopeso y metabólicamente sanos.
3. Grupo inoculado con partículas virales íntegras de niños normopeso y metabólicamente sanos.

Los ratones del grupo inoculado con partículas virales íntegras presentaron una mejoría en la tolerancia a la glucosa en la semana 17 después de la administración del tratamiento, por lo tanto, se decidió monitorear la composición de su fagoma en tres tiempos diferentes: preinoculación, semana 10 y semana 17 postinoculación, comparando los cambios en presencia y abundancia de los contigs virales existentes el día preinoculación con los contigs de las semanas 10 y 17 postinoculación.

Como resultado se encontró que el fagoma intestinal de ratones con obesidad y síndrome metabólico tratados con partículas virales de niños normopeso presenta cambios en riqueza y diversidad a las semanas 10 y 17 con respecto al día preinoculación. Adicionalmente, se encontraron fagos particulares pertenecientes a distintas familias con abundancias diferenciales entre los diferentes tiempos analizados.

Existen pocos trabajos enfocados en el estudio de la dinámica viral intestinal por lo que creemos que el aporte realizado en esta investigación ayudará a complementar los conocimientos que se tienen con relación al fagoma y la microbiota intestinal en el humano y el ratón usado como modelo, así como sus cambios en enfermedades importantes para poblaciones mexicanas como lo son la obesidad y el SMet.

1. Introducción

1.1 La obesidad y el síndrome metabólico.

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud y se ha catalogado como uno de los principales problemas a nivel nutricional y de salud pública en sociedades desarrolladas y subdesarrolladas (WHO, 2018). El método más utilizado para identificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), una operación matemática que estima la relación entre el peso y la talla de un individuo y se calcula dividiendo el peso entre el cuadrado de la altura, que para un adulto obeso es $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ mientras que en niños se utilizan otros parámetros que además toman en cuenta la edad y el sexo (Nutall, 2015).

Las personas con obesidad presentan predisposición de desarrollar síndrome metabólico (SMet), definido como la presencia de factores de riesgo que incrementan la probabilidad de manifestar complicaciones en la salud como hipertensión, diabetes mellitus (DM), enfermedades cerebro y cardiovasculares, entre otras. Los factores de riesgo involucrados en el desarrollo de SMet son la hiperglicemia, la hipertrigliceridemia, niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad o colesterol HDL, presión arterial elevada y obesidad abdominal. Padecer 3 o más de estos factores son necesarios para el diagnóstico del SMet (Groota *et al.*, 2017, Huang, 2009).

1.1.1 Prevalencia de la obesidad y síndrome metabólico.

En el año 2015, aproximadamente 107.7 millones de niños y 603.7 millones de adultos padecían obesidad alrededor del mundo. Particularmente en México, cerca del 33.2% de los niños de 5 a 11 años, el 36.3 % de los adolescentes de 12 a 19 años y el 71.2 % de los adultos mayores de 20 años presentaron estas condiciones en el año 2018 (Figura 1) (GBD *et al.*, 2015, ENSANUT, 2018).

En el año 2013 en México, Evia-Viscarra *et al.* estimaron que el 62% de los niños y adolescentes de 8 a 16 años con obesidad presentaban además el SMet, mientras que Gallardo-Becerra *et al.*, 2020 encontraron un importante 52.94 % de niños mexicanos con obesidad y SMet en su cohorte de estudio.

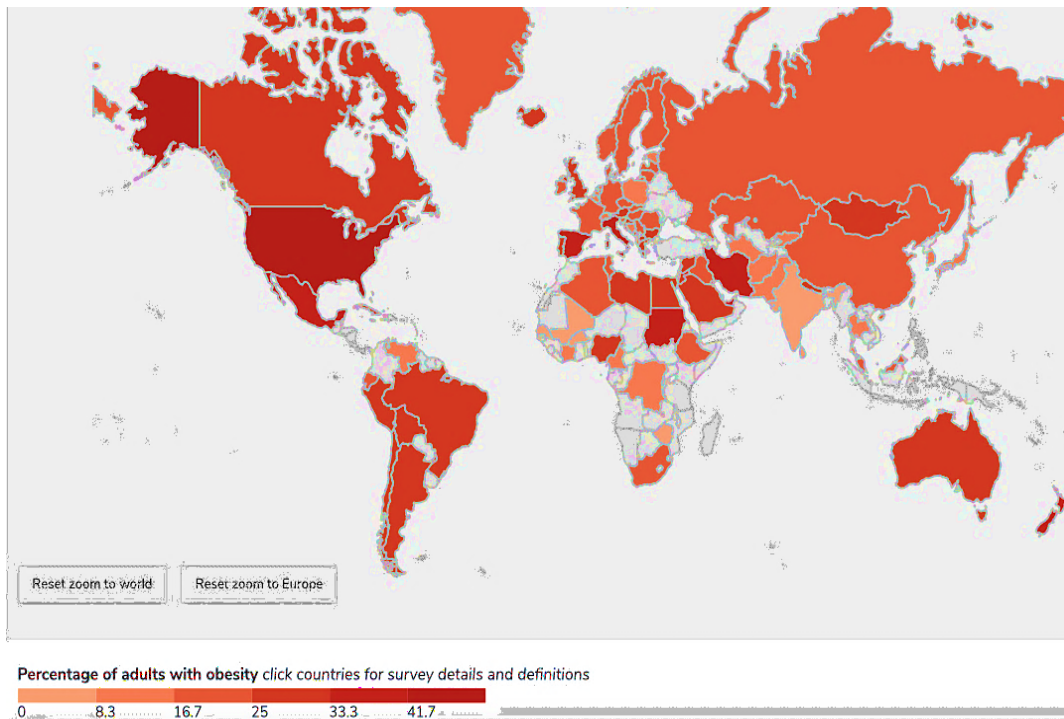


Figura 1. Mapa de los porcentajes de obesidad infantil a nivel mundial (World Obesity Federation, 2019). Los países en color gris no reportan estadísticas acerca del sobrepeso y obesidad de sus poblaciones.

1.1.2 Factores que favorecen el desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico

La principal causa de la obesidad se atribuye a un desequilibrio crónico donde la ingesta energética excede el gasto, sin embargo, se han identificado una variedad de factores socioeconómicos, culturales y biológicos (predisposición genética, el sexo, la edad, etc.) que pueden contribuir al establecimiento de estos padecimientos. Además, recientemente se han estudiado las variaciones en la microbiota intestinal como un factor asociado a la ganancia o pérdida de peso (John *et al.*, 2016).

1.2 Microbiota intestinal.

1.2.1. Estrategias para el estudio de la microbiota intestinal humana.

Los avances en las tecnologías de secuenciación masiva de ácidos nucleicos y la reducción de sus costos han permitido conocer la diversidad de bacterias presentes en el intestino humano sin necesidad de cultivarlas. Así mismo, se han desarrollado estrategias para el estudio de la microbiota intestinal utilizando las ciencias “ómicas”, entre las más importantes se encuentra la metagenómica, que involucra el análisis del ADN genómico total secuenciado (shotgun) y el estudio de las regiones hipervariables contenidas en el gen RNA ribosomal 16S usado como marcador genético y que ha permitido catalogar filogenética y taxonómicamente a los diferentes grupos de bacterias. Por otro lado, herramientas como la metatranscriptómica han permitido la identificación de los transcritos expresados por el microbioma comparando los perfiles de expresión génica entre comunidades microbianas (Bikel *et al.*, 2015). Existen además otros enfoques como la metaproteómica (colección completa de proteínas recuperadas de una muestra) y la metabolómica (totalidad de metabolitos encontrados en un medio) que complementan dichos análisis. La integración de más de uno de estos instrumentos permite comprender parte de los eventos que tienen lugar en las comunidades bacterianas presentes en el ambiente intestinal.

2.1.2. Bacterias presentes en la microbiota intestinal humana.

La microbiota intestinal bacteriana se modifica en cada etapa transitada por el humano. En los primeros años de vida, el modo de parto influye en la colonización microbiana del recién nacido y el intestino se coloniza principalmente por bacterias del filo *Proteobacteria*. Los cambios en la edad, el modo de alimentación, el estilo de vida familiar, la ubicación geográfica, la genética, así como el uso de antibióticos, configuran aún más la microbiota que se vuelve más diversa con el tiempo y en la infancia los filos bacterianos dominantes son *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Zhuang *et al.*, 2019).

En el intestino del adulto se encuentran los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* que llegan a contener hasta el 90 % de las especies bacterianas intestinales (Figura 2), así como algunos filos representados a niveles subdominantes como *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia* (Turnbaugh *et al.*, 2006, Rodríguez *et al.*, 2015).

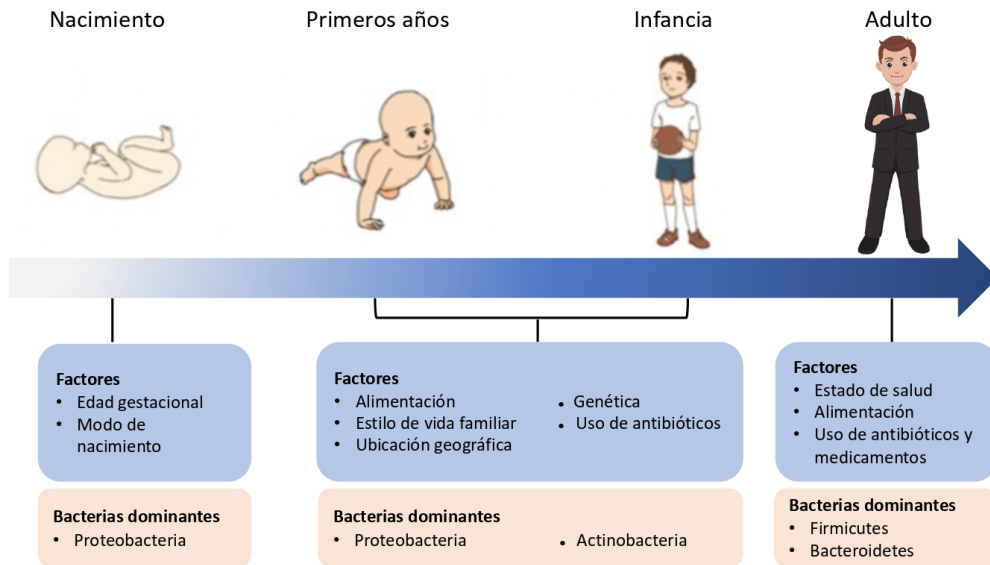


Figura 2. Factores que modifican la microbiota bacteriana y filos dominantes en diferentes etapas de la vida humana (Adaptado de Zhuang *et al.*, 2019 y Rodriguez *et al.*, 2015).

En condiciones normales e individuos sanos, existen interacciones entre la microbiota intestinal y el hospedero que mantienen un equilibrio homeostático y definen la carga bacteriana estable para que la integridad intestinal permanezca saludable y libre de patógenos (eubiosis). Las perturbaciones en este ecosistema complejo pueden generar una disbiosis, definida como una alteración de la homeostasis de la microbiota intestinal debido a cambios en la diversidad, composición funcional, metabolismo y en la distribución local bacteriana que a su vez provocan afectaciones en la salud del hospedero (Toor *et al.*, 2019).

1.3 *Microbiota intestinal, obesidad y síndrome metabólico.*

1.3.1. *Bacterias intestinales asociadas a la obesidad y el síndrome metabólico.*

La disbiosis en la microbiota del intestino se ha asociado con enfermedades como la obesidad, la DM Tipo 2 y la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés) (Davis *et al.*, 2016). Particularmente en obesidad se ha encontrado una relación entre el aumento de peso y cambios en la abundancia relativa de bacterias de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Sanz *et al.*, 2010) y en obesidad infantil se han identificado los géneros *Dorea* y *Bacteroides* enriquecidos en comparación con los grupos control. Esto correlaciona con el incremento en los niveles de marcadores inflamatorios como la interleucina-15 (IL-15), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 8 (IL-8) (Dabke *et al.*, 2019). En niños mexicanos se han identificado bacterias pertenecientes a los filos *Firmicutes* y *Actinobacteria*, específicamente de los géneros *Collinsella* y *Coprococcus* como significativamente más abundantes en niños con SMet comparado con los normopeso e inclusive sus abundancias correlacionan con parámetros clínicos y antropométricos asociados a SMet, entre ellos los niveles bajos de colesterol HDL, niveles elevados de triglicéridos en sangre y la obesidad abdominal (Gallardo-Becerra *et al.*, 2020).

1.3.2. *Interacciones bioquímicas de la microbiota intestinal en la obesidad y el síndrome metabólico.*

Diferentes estudios en personas obesas han revelado que la microbiota intestinal participa con una importante actividad bioquímica al proporcionar enzimas activas de carbohidratos (CAZymes, por sus siglas en inglés) involucradas en la utilización de carbohidratos no digeribles y de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de donde se obtiene un importante suministro de energía para el hospedero a partir de la ingesta diaria (El Kaoutari *et al.*, 2013, Flint *et al.*, 2020). Además, algunos componentes específicos de la microbiota en obesidad también alteran la solubilidad y absorción de lípidos y colesterol al participar en el reciclaje y el metabolismo de los ácidos biliares favoreciendo el almacenamiento de grasa (Soverini *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha estudiado la asociación de la enfermedad del SMet con la microbiota intestinal debido a que cuando compuestos como el acetato, un tipo de AGCC, son producidos en cantidades elevadas por el metabolismo bacteriano pueden desencadenar un aumento en la secreción de grelina e insulina, hormonas encargadas de la regulación del apetito y del metabolismo de glucosa respectivamente (Perry *et al.*, 2016).

Por otro lado, en presencia de una dieta alta en fibra, los metabolitos producidos por la fermentación bacteriana inducen la producción de proteínas como la glucagon-like peptide-2 (GLP-2) involucrada en el mantenimiento de la integridad epitelial del intestino. Las personas con obesidad y SMet generalmente mantienen una dieta alta en calorías y baja en fibra, por lo que los cambios en la abundancia o presencia de bacterias productoras de metabolitos de fermentación puede llegar a afectar la permeabilidad del epitelio intestinal (Dabke *et al.*, 2019). El relajamiento de las uniones entre las células epiteliales puede provocar el paso de componentes de la pared celular bacteriana como los lipopolisacáridos (LPS), péptidoglucanos, trimetilamina (TMA) y otros metabolitos a la circulación sanguínea donde al ser reconocidos por el sistema inmunitario aumentan la producción de marcadores proinflamatorios y propician la aparición de afectaciones metabólicas inducidas por la inflamación (Figura 3) (Tang *et al.*, 2013).

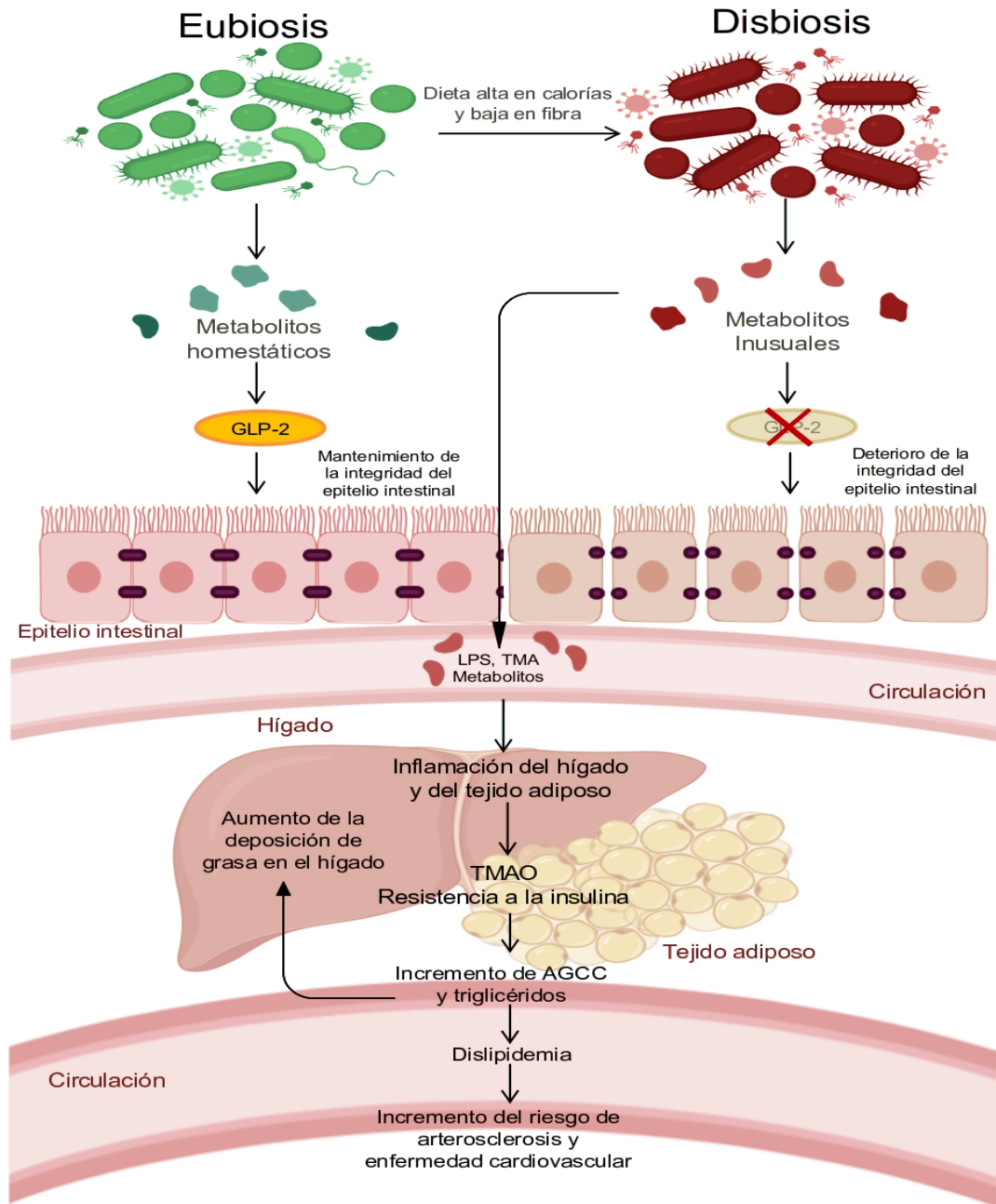


Figura 3. Modelo de interacción entre la microbiota y la barrera epitelial intestinal y su contribución en enfermedades metabólicas. Una dieta alta en calorías y baja en fibra perturba la eubiosis intestinal provocando una disbiosis. Disminuye la concentración de metabolitos que mantienen la integridad de las uniones estrechas de las células del epitelio intestinal mediada por GLP-2 y aumenta la concentración de metabolitos inusuales. La pérdida de integridad ocasiona que el epitelio intestinal sea más permisivo con el paso de moléculas como los LPS o la TMA caracterizadas por contribuir a la inflamación crónica del hígado y el tejido adiposo que se asocia con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y otras condiciones asociadas con el síndrome metabólico (Adaptado de Dabke et al., 2019).

1.4 Modelos de ratón para el estudio de la microbiota intestinal humana.

Utilizar modelos animales para el estudio de la microbiota intestinal humana ha permitido evaluar las comunidades bacterianas de forma estandarizada lo que garantiza resultados más confiables y reproducibles. La experimentación *in vivo* ha ofrecido ventajas clave como la facilidad para el análisis de la fisiología intestinal y su interacción con la microbiota, el control del ambiente donde se desarrolla el animal (exposición o restricción de diferentes sustancias) y su efecto en la modulación de las bacterias intestinales, así como el desarrollo de estudios longitudinales que llegan a tener poca viabilidad en humanos.

Los modelos de ratón son uno de los más utilizados para el estudio de la microbiota humana debido a la facilidad de su control y manipulación. Los humanos y los ratones llegan a mantener similitudes en la composición de su microbiota intestinal a nivel de filos bacterianos. Ambos se encuentran dominados por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*; pero las variaciones a nivel de especie llegan a ser más significativas (Wang *et al.* 2019).

Aún con estas diferencias, los ratones han permitido avances importantes en la comprensión del papel de la microbiota humana en el metabolismo (Tabla 1), aunque al trabajar con temas más específicos, como la regulación inmunológica, no logran ser tan precisos.

Condición	Resultados	Referencia
Ratones libres de gérmenes (germ-free) y ratones convencionales	Aumento de peso de los ratones convencionales en comparación de los germ-free consumiendo la misma dieta.	Backhed <i>et al.</i> , 2004
Ratones gnotobióticos ¹ trasplantados con microbiota fecal de ratones obesos.	Ganancia de peso en los ratones gnotobióticos trasplantados con microbiota de ratones obesos.	Turnbaugh <i>et al.</i> , 2006
Ratones gnotobióticos trasplantados con microbiota fecal humana	Retención de la mayoría de los grupos filogenéticos administrados con una pérdida mínima de diversidad .	Turnbaugh <i>et al.</i> , 2009
Ratones sometidos a antibióticos y a una dieta baja en calorías	Perdida de diversidad bacteriana y aumento de peso en ratones con antibióticos aun con dieta baja en calorías.	Wang <i>et al.</i> , 2018
Ratones obesos trasplantados con microbiota de ratones con dieta y peso normal.	Diminución de peso y mejoramiento de parámetros metabólicos.	Lai <i>et al.</i> , 2018

Tabla 1. Diferentes estudios de la respuesta de ratones ligados a la microbiota intestinal.

¹ Animales con una microbiota conocida obtenidos a partir de animales libres de microorganismos.

1.5 El fagoma intestinal humano.

Además de bacterias, la microbiota intestinal integra una variedad muy amplia de poblaciones virales (viroma intestinal). Éste a su vez se subdivide en dos partes: el viroma eucarionte donde se encuentran los virus que infectan células eucariotas y el fagoma que describe específicamente a las poblaciones de virus de bacterias, conocidos como bacteriófagos o fagos, residentes también del intestino.

En contraste con la amplia descripción que existe de las comunidades bacterianas entéricas, los fagos intestinales han sido poco caracterizados debido a las dificultades experimentales para su aislamiento cuando sus hospederos son desconocidos o no cultivables, la anotación de sus genomas y a las bases de datos poco enriquecidas (Dion *et al.*, 2020), además que no cuentan con un marcador universal como el RNAr 16S usado masivamente en bacterias.

Los fagos predominantes en el intestino humano son fagos del orden *Caudovirales*, donde se pueden identificar fagos de ADN de doble cadena y con cola de las familias *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Ackermanviridae*, así como de fagos de ADN de cadena sencilla y sin cola de las familias *Microviridae* e *Inoviridae* (Figura 4) (Reyes *et al.*, 2015; Dion *et al.*, 2020), estos utilizan la maquinaria de replicación de la bacteria hospedera para asegurar la siguiente generación de fagos.

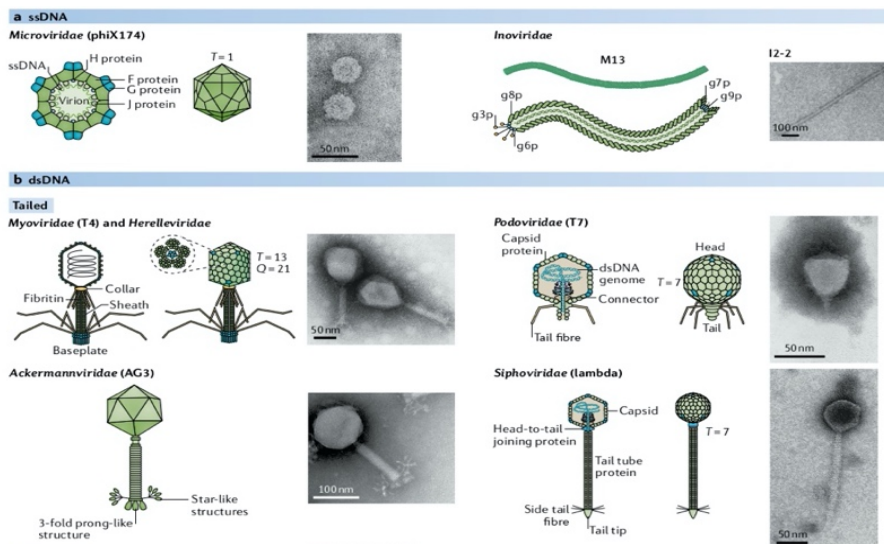


Figura 4. Clasificación y morfología de los principales grupo de fagos intestinales. Esquemas y microscopía electrónica de transmisión (TEM) representando la morfología de los principales tipos de fagos encontrados en el intestino humano. a) Fagos de ADN de cadena sencilla (ssDNA). Familia *Microviridae* representada por el fago icosaédrico y sin cola phiX174 y familia *Inoviridae* representada por el fago filamentoso M13. b) Fagos de ADN de cadena doble (dsDNA). Familia *Myoviridae* representada por el fago con cola T4, familia *Podoviridae* representada por el fago T7 que se caracteriza por poseer una cola muy corta, familia *Ackermanviridae* representada por el fago AG3 y familia *Siphoviridae* representada por el fago lambda. (adaptado de Dion *et al.*, 2020).

Los fagos se reproducen principalmente a través del ciclo lítico y el ciclo lisogénico (Figura 5), los fagos líticos obligatorios (fago T1, fago T4 y fago T7) se replican liberando nueva progenie después de la lisis celular poco después de la infección. Los fagos temperados pueden replicarse a través del ciclo lítico o lisogénico y durante la lisogenia el genoma del fago se integra en el cromosoma bacteriano como profago (fago λ y fago P2) o se mantiene como un plásmido (fago P1) y se replica con el hospedero bacteriano. Los cambios ambientales, los químicos que ocasionan daño al ADN, la activación de la respuesta SOS o las alteraciones en el metabolismo de las bacterias pueden desencadenar la inducción de los profagos, conduciendo a la expresión del genoma del fago y al retorno al ciclo lítico (Mirzaei *et al.*, 2017, Weinbauer *et al.*, 2004).

Los fagos y profagos son fundamentales para la evolución de la patogénesis de las bacterias al constituir una fuente de factores de virulencia (Brussow *et al.*, 2004. Por otro lado, transfieren genes importantes en el metabolismo de polisacáridos y carbohidratos, vitaminas y cofactores que pueden mejorar la supervivencia de sus hospederos y se asocia con la transferencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG, por sus siglas en inglés) (Fancello *et al.*, 2011; Rolain *et al.*, 2011, Modi *et al.*, 2013). Aunque análisis menos permisivos sugieren que la mayoría de estos estudios sobreestiman la frecuencia de ARGs debido a la presencia de DNA bacteriano contaminante (Enault *et al.*, 2017).

Otra característica importante es su participación en la regulación de la abundancia y la diversidad bacteriana a través de la lisis interviniendo en el mantenimiento, la función y la dinámica de los ecosistemas microbianos (Modi *et al.*, 2013).

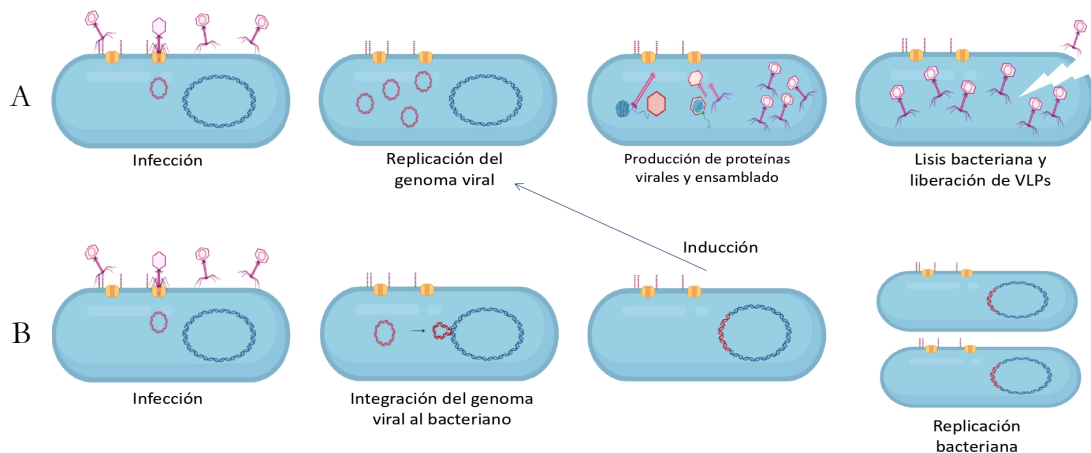


Figura 5. Principales ciclos de replicación de los fagos. Los fagos entran en contacto con su bacteria hospedera en la que introducen su material genético. A). Ciclo lítico: El genoma del fago se replica utilizando la maquinaria de replicación de la bacteria. Se producen proteínas de fago que se ensamblan produciendo VLPs completas. Finalmente, las VLPs son liberadas al medio por la lisis de la bacteria. B). Ciclo lisogénico: El genoma del fago se integra en el cromosoma bacteriano donde se replica como profago con la bacteria. Las perturbaciones ambientales pueden provocar la inducción del profago y el retorno al ciclo lítico.

1.6 Dinámicas bacteria-fago en el intestino humano.

Las bacterias se encuentran en un estado constante de respuesta al medio donde habitan y en una estrecha relación con sus fagos depredadores (Figura 6). En un ambiente con una mínima interacción con fagos, perturbaciones como un cambio ambiental o una mutación favorecen la proliferación de bacterias dominantes eliminando a sus competidoras. La pérdida de diversidad y del fitness² bacteriano provoca a su vez una explotación menos eficiente de los recursos del ecosistema. Este tipo de relación de las bacterias con su ambiente y sin depredadores se postula como “Selección periódica” (Periodic Selection) de acuerdo con Rodríguez-Valera *et al.*, 2009.

Los fagos ayudan a mantener la homeostasis de las poblaciones bacterianas y emplean diferentes dinámicas para interactuar con sus hospederos. La más citada en este tipo de interacciones es “matar al ganador” (kill-the winner), la cual propone que el aumento en una población bacteriana específica (ganadora) es seguido por un aumento en la abundancia de su fago depredador provocando una disminución en la presa bacteriana inicial, esto deja un nicho ecológico disponible para que otros taxones bacterianos competitivos puedan aprovecharlo y el ciclo comience de nuevo (Thingstad *et al.*, 2000). Al final estos cambios son transitorios, se recupera la diversidad y el ecosistema es eficientemente explotado (Rodríguez-Valera *et al.*, 2009). Se plantea que en el intestino de niños de un año de edad se presenta este tipo de interacción porque la microbiota no se encuentra bien establecida lo que provoca cambios en las diversidades y abundancias bacterianas y por lo tanto también en las virales (Lim *et al.*, 2015).

Otro modelo es la “carrera de armamentos” (arms-race) donde las bacterias evolucionan continuamente para evitar la infección por fagos, p. ej a través de los sistemas CRISPR/Cas (Wang *et al.* 2016), mientras los fagos desarrollan nuevas estrategias de infección. En este ciclo de contra-defensa se seleccionan fagos con rangos altos de infectividad y se generan fenotipos resistentes en bacterias a medida que conducen a los miembros mal adaptados a la extinción (Harrison *et al.*, 2013). Este modelo se sugiere para el intestino de adultos sanos donde proliferan y se mantienen las especies mejor adaptadas.

Un modelo postulado recientemente para las poblaciones de fagos es el “a costas del ganador” (piggyback-the-winner) que predice que la lisogenia es dominante cuando las bacterias son abundantes y tienen altas tasas de crecimiento, esta dinámica le garantiza al fago el mantenimiento de su información genética en las siguientes generaciones bacterianas y su permanencia en el ecosistema (Silveira & Rohwer 2016).

² Capacidad de los microorganismos de prosperar en un entorno competitivo.

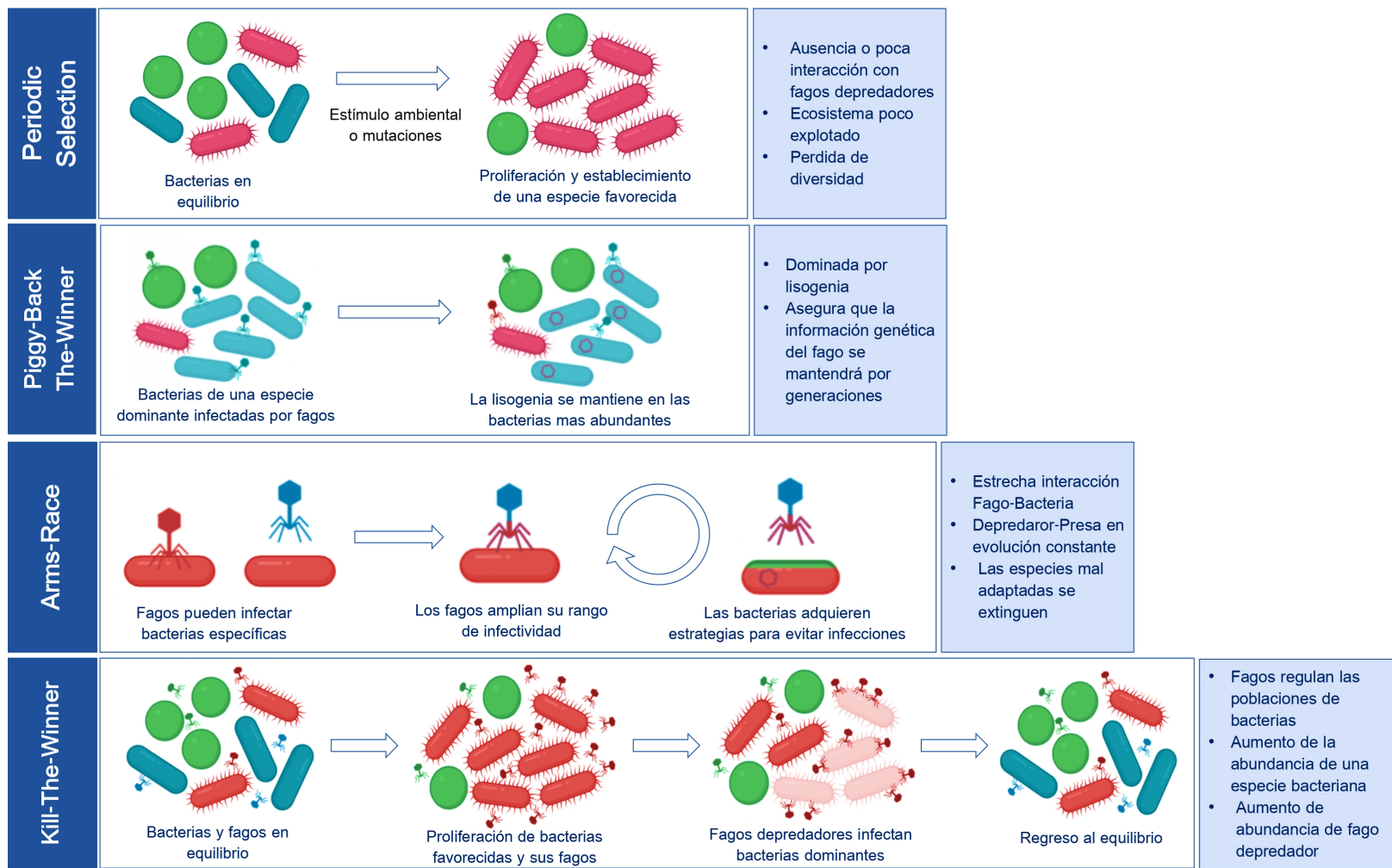


Figura 6. Diferentes dinámicas de interacción Bacteria-Fago. (Rodríguez-Valera et al., 2009, De Paepe et al., 2014).

1.7 Fagos del intestino humano presentes en diferentes condiciones.

Se han realizado múltiples investigaciones con el objetivo de comprender como ocurre la adquisición de fagos en el ambiente intestinal y se ha sugerido que los niños recién nacidos obtienen las primeras comunidades bacterianas de su madre y del ambiente directo, siendo los primeros fagos colonizadores del infante aquellos que se encontraban como profagos en las bacterias de la madre y que pasaron al ciclo lítico tras su establecimiento en el intestino del recién nacido. Posteriormente la alimentación y el ambiente donde se desarrolla el niño genera un enriquecimiento de las poblaciones de fagos (Breitbart *et al.*, 2018).

En los primeros años de vida se incrementan las abundancias de los fagos de la familia *Microviridae* mientras existe una correlación negativa con los fagos del orden *Caudovirales* (Lim *et al.*, 2015). Por otro lado, en adultos sanos se establecen las poblaciones de bacterias que se han adaptado para sobrellevar la infección de fagos, así como de los fagos que cuentan con un rango de infectividad más amplio y los generalistas bacterianos, donde los organismos mal adaptados se eliminan del ecosistema y generando una adaptación local depredador-presa (Harrison *et al.*, 2013).

En humanos con síndrome de Crohn y colitis ulcerativa se han documentado alteraciones del viroma intestinal con una expansión de fagos del orden *Caudovirales* y una disminución de la diversidad bacteriana (Norman *et al.*, 2015), mientras que ratones expuestos a bromuro de piridostigmina, permetrina, trisulfato de neomicina y enrofloxacin; sustancias que provocaron IBD, neuroinflamación y deterioro cognitivo en veteranos de la guerra del golfo pérsico (síndrome de la guerra del golfo), presentaron alteraciones en el viroma intestinal con la reducción de la abundancia relativa de fagos de la familia *Microviridae* e incremento en fagos de las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* en comparación con los controles (Seth *et al.*, 2019).

Estas investigaciones sugieren que el fagoma intestinal de humano y ratón, al igual que la microbiota bacteriana, varía de acuerdo con factores como la edad, condición de salud y el ambiente donde se desarrolla el hospedero.

2. Antecedentes

2.1 Trasplantes de microbiota fecal

El trasplante de microbiota fecal (TMF) es la administración de una solución de materia fecal de un donador sano al tracto intestinal de un receptor enfermo con el objetivo de directamente la composición microbiana del receptor y conferir un beneficio para la salud. El TMF se ha utilizado como un tratamiento efectivo para contrarrestar infecciones recurrentes ocasionadas por *Clostridium difficile* donde los tratamientos convencionales con antibióticos no han logrado mejorar el estado del paciente (Peng *et al.*, 2017) y de la misma forma se ha encontrado mejoría notable en personas con IBD después de recibir un TMF (Brand *et al.*, 2012).

Un inconveniente de la administración de un TMF es que no se tiene control de las poblaciones bacterianas que ingresan en el receptor por lo que se podrían administrar bacterias con potencial patógeno o en el caso de pacientes con inmunosupresión llegan a responder desfavorablemente a este tratamiento (FDA, 2020).

2.2 Trasplantes de Viroma fecal

Aunque todavía no se conoce por completo la gama de fagos intestinales en humanos, desde hace varios años se han realizado trasplantes de fagos como terapia en diferentes enfermedades ocasionadas por bacterias. Recientemente se ha introducido el concepto de trasplante de viroma fecal (TVF) para describir el uso de estos cocteles de fagos para contrarrestar enfermedades infecciosas (Rasmussen *et al.*, 2020).

En el 2016 Nale *et al.* administraron un tratamiento compuesto por fagos de la familia *Myoviridae* y *Siphoviridae* en un modelo de hámster infectado con *C. difficile*, como resultado se observó que el inóculo de fagos resultó ser efectivo para la lisis de *C. difficile* y aumentó la sobrevivencia de los roedores, mientras que los animales que recibieron solo clindamicina murieron dentro de las primeras 60 horas. Adicionalmente, combinaciones de fagos también redujeron significativamente el crecimiento de *C. difficile in vitro*.

En humanos se presentó una mejora notable en pacientes infectados con *C. difficile* al aplicarse un trasplante de filtrado fecal que no incluía bacterias vivas sino componentes de origen bacteriano (p. ej., bacteriocinas) y bacteriófagos (Ott *et al.*, 2018). Este tratamiento que incluye fagos demostró ser efectivo para cambiar las comunidades bacterianas de los

pacientes enfermos al punto de ser comparables en presencia y abundancia con la comunidades bacterianas del donador.

Además, recientemente Rasmussen *et al.*, 2020 estudiaron ratones C57BL/6NTac, modelo para obesidad y diabetes tipo 2; separados en diferentes grupos (Figura 7):

- Ratones con dieta normal.
- Ratones con dieta alta en grasa.
- Ratones con dieta alta en grasa con 2 dosis de trasplante de viroma fecal aislado de ratones normopeso
- Ratones con dieta alta en grasa con 2 dosis de trasplante de viroma fecal aislado de ratones normopeso + ampicilina
- Ratones con dieta alta en grasa con ampicilina.

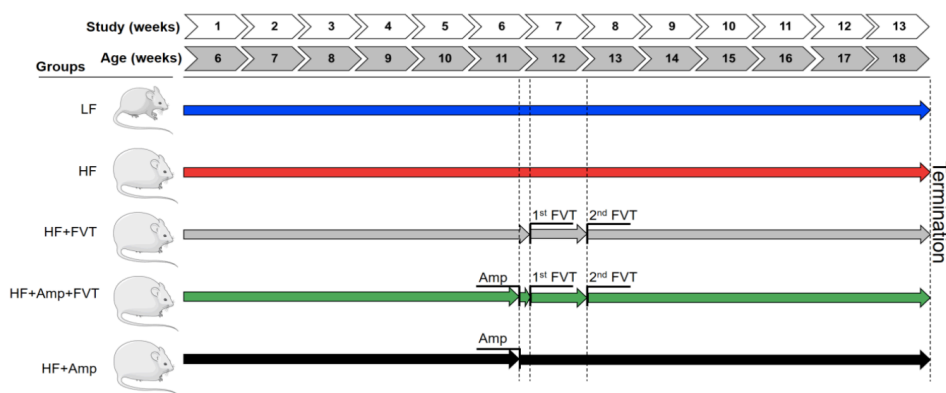


Figura 7. Descripción del modelo murino de diabetes tipo 2, sus diferentes dietas y tratamientos (Rasmussen et al., 2020). Los ratones iniciaron el estudio de 6 semanas de edad y se inocularon a las 6 y 7 semanas iniciado el estudio. LF = Ratones con dieta normal (azul), HF = Ratones con dieta alta en grasa (rojo), HF+FVT = Ratones con dieta alta en grasa tratados con 2 dosis de trasplante de viroma fecal aislado de ratones normopeso (gris), HF+Amp+FVT = Ratones con dieta alta en grasa tratados con 2 dosis de trasplante de viroma fecal aislado de ratones normopeso y ampicilina (verde), HF+Amp = Ratones con dieta alta en grasa tratados con ampicilina (negro).

Al final del tratamiento los ratones que recibieron las 2 dosis de TVF mejoraron significativamente su tolerancia a la glucosa (Figura 8a). Además, la microbiota intestinal bacteriana de este grupo llegó a ser más diversa que la microbiota del grupo con dieta alta en grasa y sin tratamientos, obteniendo valores de diversidad cercanos al del grupo con dieta normal (Figura 8b). En cambio, el fagoma intestinal de los diferentes grupos de ratones se mantuvo estable excepto en los grupos tratados con ampicilina (Figura 8c) posiblemente por la inducción de fagos lisogénicos que se encontraban como profagos (Rasmussen *et al.*, 2020).

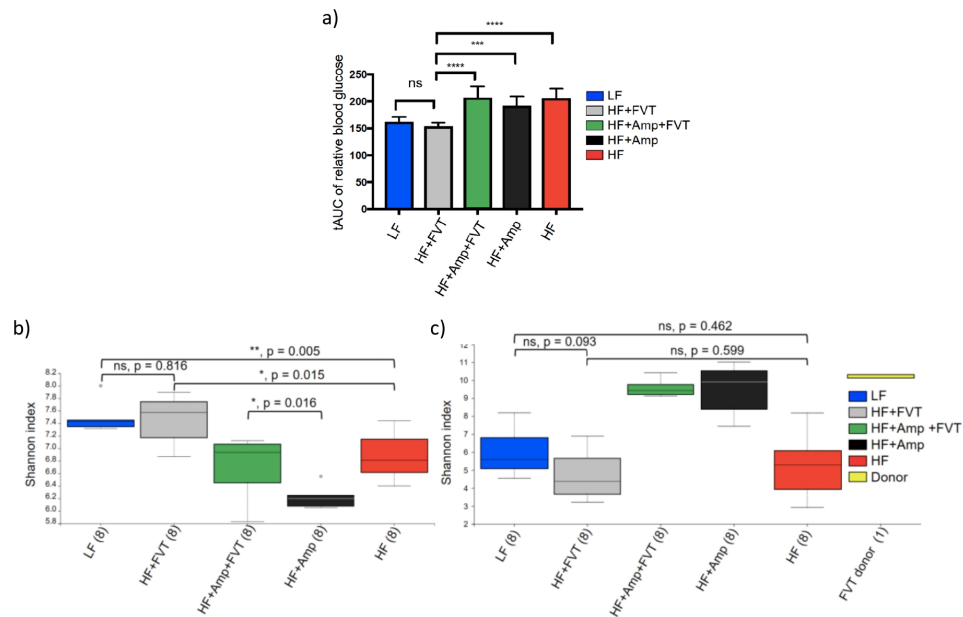


Figura 8. Resultados de los análisis de Rasmussen *et al.*, 2020. a) Área bajo la curva de los niveles de glucosa en sangre de los ratones. Índice de diversidad de Shannon para los diferentes grupos de ratones: b) Diversidad de bacterias intestinales y c) Diversidad de Virus intestinales.

Estas investigaciones sugieren que existe el potencial de utilizar fagos como tratamiento de algunas enfermedades metabólicas e infecciosas. Por otro lado, los efectos de este tipo de inóculos en la homeostasis bacteriana intestinal y por consiguiente en la respuesta del receptor aun no se comprenden por completo.

3.Hipótesis

El trasplante con partículas virales fecales de niños normopeso mejorará la respuesta metabólica de ratones con obesidad y síndrome metabólico modificando la composición y abundancia de su fagoma intestinal.

4. Objetivos

Objetivo General

Evaluar la respuesta de ratones con obesidad y síndrome metabólico después de recibir un tratamiento con partículas virales de niños normopeso, así como su efecto en las poblaciones de fagos intestinales.

Objetivos Específicos

1. Identificar el efecto de los tratamientos a base de fagos sobre los parámetros metabólicos de ratones con obesidad y SMet.
2. Obtener secuencias metagenómicas virales a partir de VLPs fecales de ratones con obesidad y SMet que recibieron un tratamiento con VLPs íntegras de niños normopeso.
3. Generar un ensamblaje metagenómico viral a partir de las secuencias virales obtenidas.
4. Conocer la composición y abundancia del fagoma intestinal de los ratones antes y después del tratamiento con VLPs utilizando herramientas bioinformáticas.
5. Identificar los fagos intestinales de humano que permanecieron en el intestino de los ratones después de recibir el tratamiento.
6. Analizar las diferencias y características de las poblaciones virales utilizando las herramientas estadísticas correspondientes.

6. Metodología

1.6 Generación del inóculo de VLPs.

1.6.1 Selección de muestras

- *Origen de los donadores.*

En un estudio previo en el año de 2014 fue seleccionada una cohorte de 750 niños residentes de la Ciudad de México a los cuales se les realizaron encuestas para obtener un registro de datos relevantes como edad, sexo, método de nacimiento, datos antropométricos como talla, peso, circunferencia de cintura y se realizaron pruebas de niveles de glucosa y de colesterol en sangre para conocer el estado metabólico de los infantes (Moran-Ramos et al. 2020).

La población cumplió con los siguientes criterios de inclusión y exclusión para formar parte del estudio:

Criterios de inclusión

- Niños y niñas en edad escolar (7-10 años).
- Mexicanos mestizos en al menos tres generaciones.
- Residentes de la Ciudad de México.
- Autorización de padres o tutor.
- Consentimiento del niño.

Criterios de exclusión

- Negativa de los padres o tutor a participar en este estudio.
- Pérdida reciente de más del 10% de peso en los últimos 3 meses.
- Diagnóstico de enfermedades infecciosas o gastrointestinales crónicas.
- Asma.
- Cirugía en los últimos 6 meses.
- Uso de antibióticos en los últimos 6 meses.
- Síndromes genéticos o enfermedades sistémicas.

-Colecta y preservación de las muestras utilizadas para generar el inóculo.

Se seleccionaron 11 niños con peso normal que cumplían con un IMC de 15 a 85 al percentil y sin complicaciones metabólicas, se recolectaron sus muestras fecales en contenedores estériles y se aseguró que estuvieran libre de contaminación. Se tomaron varias alícuotas de las heces y se añadió inmediatamente RNA Later® que actúa como inhibidor de ARNasas para preservar y mantener la integridad de los ácidos nucleicos. Para finalizar, se criopreservaron a -70 °C en ultracongelador hasta su manejo en el laboratorio.

1.6.2 Purificación de las VLPs de niños normopeso y generación del inóculo.

-Protocolo de purificación de VLPs a partir de muestras fecales.

Las muestras fecales de los 11 niños normopeso se procesaron de forma individual para aislar VLPs siguiendo un protocolo experimental adaptado de Reyes et al. 2013 que se desarrolló de la siguiente manera: se colocaron aproximadamente 300 mg de la muestra fecal en 40 mL de Buffer SM (Tris-HCl 50 mM, sulfato de magnesio 8 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7.5), seguido de una centrifugación a 4,700 RFC por un periodo de 30 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue filtrado al pasar a través de un filtro MILLEX-GP® Syringe Filter (Membrana de Polietersulfona "PES", 33 mm) con un tamaño de poro de 0.22 µm que impide el paso de bacterias y permite el paso de bacteriófagos y moléculas pequeñas. Luego, el filtrado pasó a través de una columna concentradora AMICON® Ultra 100 kD de 15 mL y se centrifugó por 15 min a 5,000 RFC a una temperatura de 4 °C, lavando generosamente con Buffer SM para remover partículas menores a 100 kDa como proteínas, péptidos y metabolitos, posteriormente se realizó un tratamiento con cloroformo para desintegrar las membranas de las células de ratón o de bacterias que pudieran haber pasado los filtrados, se adicionaron ADNasas para eliminar el ADN no viral contaminante y las VLPs de cada muestra se recuperaron en 200 µL de Buffer SM.

Finalmente, se mezclaron las VLPs procedentes de las 11 muestras en un solo vial para generar el inóculo final que se utilizó como tratamiento en los ratones con obesidad y SMet.

6.2 Modelo experimental de ratón con obesidad y síndrome metabólico.

6.2.1 Manejo de los ratones e inducción de obesidad y síndrome metabólico.

El protocolo experimental descrito a continuación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM).

En colaboración con el grupo de la Dra. Leonor Pérez-Martínez del IBt-UNAM se seleccionaron 18 ratones macho de la cepa C57BL/6 de aproximadamente 4 semanas de edad y fueron alimentados por 4 semanas con una dieta normal o estándar *ad libitum*³ (Tabla 2) mientras se permitió su convivencia con el objetivo de homogeneizar su microbiota intestinal (Figura 10). Posteriormente los murinos fueron alimentados durante 14 semanas con una dieta alta en grasa (DAG) *ad libitum* (Tabla 2) hasta desarrollar características del SMet como obesidad, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

Dieta	Proteína (%kcal)	Carbohidrato (%kcal)	Grasa (%kcal)	Kcal/g	Referencia
Normal	18.6	44.2	6.2	3.2	Teklad Global, 2018
Alta en grasa	20	20	60	5.24	D12492

Tabla 2. Composición calórica de las dietas murinas.

6.2.2 Inoculación de los ratones.

Después de adquirir SMet, los 18 ratones fueron separados en tres grupos experimentales de seis ratones cada uno, se les administraron 100 μ L de NaHCO₃ al 1.33 % vía oral para regular el pH estomacal y mantener la integridad del tratamiento y se inocularon vía oral de la siguiente manera (Figura 9):

- *Grupo Control*: Ratones obesos con SMet inoculados con Buffer SM, vehículo donde se resuspenden las VLPs (n=6).
- *Grupo VLPs Desnaturalizadas*: Ratones obesos con SMet inoculados con VLPs de niños normopeso y metabólicamente sanos desnaturalizadas con calor (n= 6).
- *Grupo VLPs Íntegras*: Ratones obesos con SMet inoculados con VLPs íntegras de niños normopeso y metabólicamente sanos (n= 6).

³ Del latín, “a voluntad” o “a placer”.

Cada uno de los ratones inoculados con VLPs íntegras y desnaturalizadas recibieron 200 μ L de suspensión con aproximadamente 4.4×10^8 VLPs (ver descripción de la generación del inóculo en la página 34).

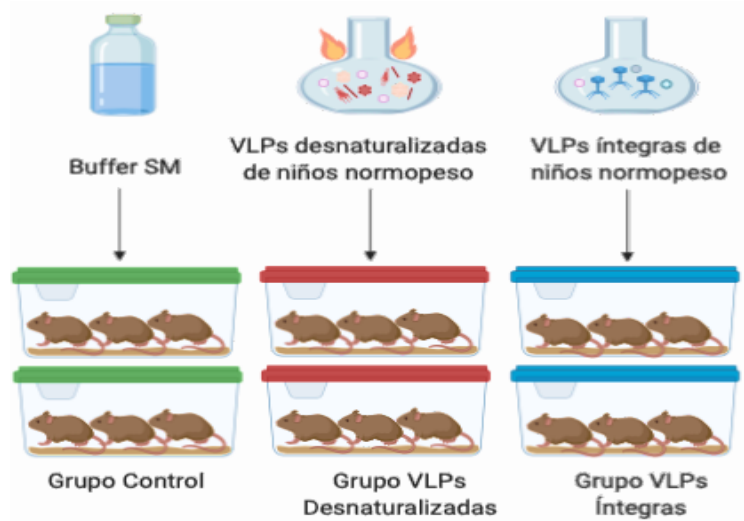


Figura 9. Grupos de ratones con SMet y sus diferentes tratamientos. Un total de 18 ratones con obesidad y SMet fueron separados en 3 grupos de acuerdo con el tratamiento administrado. Cada grupo incluía 6 ratones repartidos en 2 cajas de 3 ratones cada una. El primer grupo se inoculó con Buffer SM como control, el segundo grupo recibió VLPs de niños normopeso desnaturalizadas con calor y el tercer grupo recibió VLPs íntegras de niños normopeso.

6.2.3. Monitoreo de peso, parámetros metabólicos y colecta de muestras fecales de los ratones

Los ratones se mantuvieron con la DAG y se pesaron constantemente después de la inoculación. Además, se monitorearon realizando pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG) que identifica anomalías en la manera en que el cuerpo responde y administra la glucosa.

Durante el ensayo se realizaron en total 3 PTGs en los siguientes tiempos.

- Semana 12 del periodo Preinoculación (Solo a 3 ratones de cada grupo).
- Semana 10 del periodo Postinoculación (A los 6 ratones de cada grupo).
- Semana 17 del periodo Postinoculación (A los 6 ratones de cada grupo).

Detallando este proceso, para la PTG se administró glucosa vía intraperitoneal y se tomó una muestra sanguínea a partir de una incisión en la cola de los roedores. Con ayuda de un glucómetro se midieron los niveles de glucosa en la sangre al transcurrir 0, 15, 30, 60 y 120 minutos obteniendo las curvas de tolerancia a la glucosa (Figura S1). Posteriormente se

calculó el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) y se analizaron los valores obtenidos en el día preinoculación y las semanas 10 y 17 postinoculación.

Por otro lado, se colectaron las muestras fecales de todos los ratones antes y después de la inoculación hasta el final del ensayo y se preservaron en solución con inhibidores de ARNasas a -70°C .

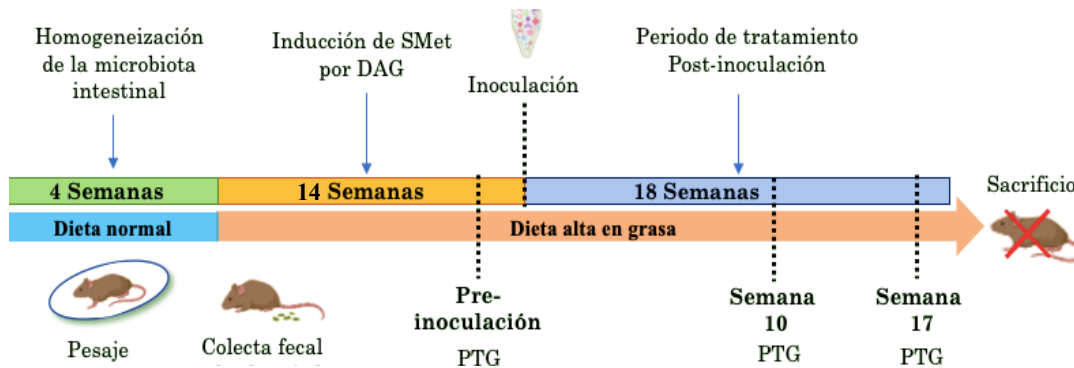


Figura 10. Línea del tiempo del periodo experimental. Los 18 ratones iniciaron con aproximadamente 4 semanas de edad, las primeras 4 semanas se mantuvieron con dieta normal y se permitió su convivencia para homogeneizar la microbiota intestinal. Comenzando la semana 5, se cambió a una dieta alta en grasas que se mantuvo 14 semanas. En la semana 10 se comprobó la adquisición de SMet mediante pruebas de tolerancia a la glucosa. Una vez adquirido el SMet se administraron los tratamientos y se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa a las semanas 10 y 17 postinoculación. Las muestras fecales se colectaron antes de la inoculación, diariamente durante la primer semana postinoculación y semanalmente después de la primer semana postinoculación.

6.3 Metodología para el estudio del fagoma intestinal de ratón.

Se sabe que la administración de un FMT es capaz de modular la microbiota intestinal bacteriana y viral (Broecker et al 2016). Por otra parte, investigaciones donde administran TVFs han encontrado resultados interesantes como la modificación de la abundancia relativa bacteriana en ratones gnotobióticos colonizados con bacterias conocidas, la inducción de profagos integrados (Reyes et al 2013) y cambios en la diversidad bacteriana de ratones obesos (Rasmussen et al 2020).

El fagoma en ratones con su microbiota normal, al igual que en humanos, suelen encontrarse dominado por las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae* e *Inoviridae*. Factores como la dieta o enfermedades como la colitis murina modifican la diversidad del fagoma y abundancia relativa de estas familias (Schulfer et al 2020, Duerkop et al 2018). Por otro lado, no se conoce el efecto de administrar TVFs sobre la composición del fagoma intestinal en ratones con su microbiota original.

Por lo anterior y debido al resultado de la corrección de la intolerancia a la glucosa post tratamiento, se decidió estudiar la influencia de la administración de VLPs sobre la composición del fagoma intestinal de los ratones inoculados con VLPs íntegras.

6.3.1 Procesamiento experimental

6.3.1.1 Selección de las muestras de ratón.

Al contar con una cantidad limitada de muestra fecal de ratón del grupo inoculado con VLPs íntegras, se realizaron mezclas de las muestras fecales tomando un ratón de la caja 1 y otro de la caja 2 con una respuesta similar en la PTG (Tabla 3). De cada ratón se tomaron aproximadamente 50 mg de muestra fecal, obteniendo mezclas con 100 mg aproximados de materia fecal.

Se eligieron 3 días del ensayo para analizar las muestras colectadas :

- Semana 12 Preinoculación (Pre)
- Semana 10 Postinoculación (S10)
- Semana 17 Postinoculación (S17)

Día de colecta	Nombre de la mezcla	Ratones mezclados
Semana 12 Preinoculación	Pre-1	Caja1-Ratón1/Caja2-Ratón3
	Pre-2	Caja1-Ratón2/Caja2-Ratón2
	Pre-3	Caja1-Ratón3/Caja2-Ratón1
Semana 10 Postinoculación	S10-1	Caja1-Ratón1/Caja2-Ratón3
	S10-2	Caja1-Ratón2/Caja2-Ratón2
	S10-3	Caja1-Ratón3/Caja2-Ratón1
Semana 17 Postinoculación	S17-1	Caja1-Ratón1/Caja2-Ratón3
	S17-2	Caja1-Ratón2/Caja2-Ratón2
	S17-3	Caja1-Ratón3/Caja2-Ratón1

Tabla 3. Especificaciones de las mezclas fecales realizadas. Las muestras fecales se mezclaron de acuerdo con el AUC para la PTG obtenido por ratón. Se utilizaron aproximadamente 50 mg de materia fecal por individuo para generar una mezcla con un estimado de 100 mg, lo mínimo necesario para obtener una cantidad adecuada de VLPs de acuerdo con el protocolo de purificación utilizado.

6.3.1.2 Purificación y cuantificación de partículas virales a partir de muestras fecales de ratón.

Cada mezcla fecal realizada se procesó utilizando el protocolo para purificación de VLPs descrito en la sección 1.6.2, finalmente las VLPs de cada mezcla se recuperaron con Buffer SM y glicerol en un volumen final de 300 μ L.

Una vez recuperadas las VLPs se procedió a realizar una microscopia de epifluorescencia para verificar que el aislamiento de VLPs fuera exitoso y para cuantificar las VLPs recuperadas. Se tomaron como referencia los ensayos realizados por Bikel *et al.*, 2020 donde realizaron microscopía de fluorescencia y electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) confirmando que el método de purificación utilizado en el presente trabajo es efectivo para recuperar partículas virales extraídas de muestras fecales (Figura S2).

Para la microscopía se tomaron 10 μ L de las VLPs suspendidas y se tiñeron con 2 μ L de colorante SYBR Green al 10%. A la mezcla se añadieron 10 μ L de Paraformaldehído y se montó en un portaobjetos. Las VLPs se visualizaron utilizando el microscopio confocal invertido Olympus FV1000 multi-fotónico ubicado en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) del Instituto de Biotecnología (IBt-UNAM) (Figura 13). La cuantificación de las VLPs se realizó con el programa FIJI de ImageJ utilizando las micrografías generadas en el LNMA.

Esta verificación se le realizó a una muestra por día del ensayo, un total de 3 muestras visualizadas:

- Semana 12 Preinoculación: Mezcla Pre-1
- Semana 10 Postinoculación: Mezcla S10-2
- Semana 17 Postinoculación: Mezcla S17-3

6.3.1.3 Extracción y cuantificación del ADN de las VLPs de ratón y secuenciación masiva.

Se tomaron de 50 μ L de cada una de las 9 muestras de VLPs recuperadas y se realizó la extracción del ADN Viral con el kit de extracción por columna QiAmp MinElute Virus Spin de Qiagen® (protocolo del fabricante) permitiendo el desensamblaje de la cápside viral por acción de proteasas, así como la liberación y elución del ADN viral. Posteriormente se cuantificó el ADN viral obtenido con el fluorómetro QUBIT 9V.

Se armaron las librerías de secuenciación utilizando 1.5 ng del ADN viral recuperado de cada muestra con el kit Nextera-XT ADN Sample Preparation Kit-Illumina y se secuenció el ADN viral utilizando la plataforma Illumina NextSeq ubicada en INMEGEN a 300 ciclos de secuencias emparejadas (2 x 150 pb).

6.3.2. Procesamiento bioinformático de las secuencias de VLPs de ratón

Las 9 librerías crudas se procesaron para identificar las lecturas pertenecientes a fagos y con base en ellas estudiar el fagoma intestinal de los ratones pre y post tratamiento. Se siguió un protocolo bioinformático que involucra la eliminación de lecturas de mala calidad generadas en la secuenciación, eliminación de lecturas de organismos no virales, la generación de un ensamble metagenómico, la identificación de contigs de fagos, el cálculo de la diversidad α y β y la determinación de fagos con cambios importantes en los diferentes tiempos. Por otro lado, se integró la búsqueda de fagos intestinales de niños normopeso que pudieron haber permanecido en los ratones después de recibir el tratamiento a partir de un ensamble metagenómico viral de referencia (Figura 11).

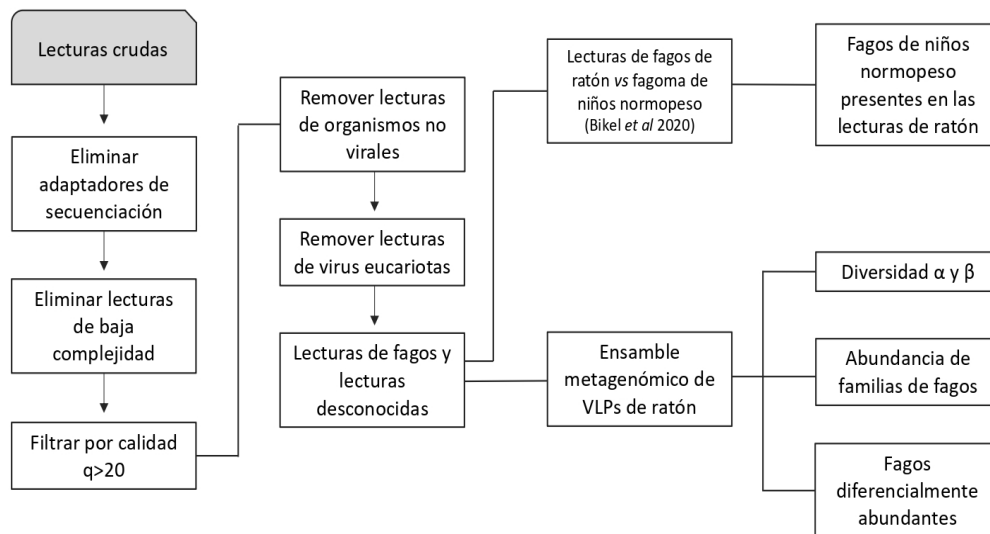


Figura 11. Diagrama de flujo para el procesamiento bioinformático de las secuencias de VLPs de ratón. La primera parte del ejercicio consistió en la limpieza de las lecturas crudas donde se cortaron los adaptadores colocados para la secuenciación, se eliminaron lecturas de baja complejidad como los homopolímeros o secuencias repetidas y se realizó un filtrado seleccionando las lecturas con una calidad mínima $q>20$. La segunda parte involucró la eliminación de lecturas de organismos no virales e identificación de posibles lecturas de fagos. La tercera parte se basó en el ensamblado de las lecturas limpias, así como una asignación de taxonomía de los genomas o fragmentos de genomas de posible fagos. La última parte identificó riqueza y diversidad, abundancia de familias de fagos presentes y fagos diferencialmente abundantes.

6.3.2.1 Limpieza del fagoma intestinal de ratón

- Eliminación de adaptadores de secuenciación masiva.

Como primer paso para la limpieza de las lecturas se removieron los adaptadores de secuenciación masiva (CTGTCTCTTATACACATCT) con el programa CUTADAPT Versión 2.10 (Martin, 2011). Este programa busca en todas las lecturas y encuentra la secuencia de nucleótidos que pertenece a los adaptadores y los remueve de una forma tolerante a errores realizando un corte (*trimming*). Los comandos y parámetros utilizados se especifican en la Tabla 4.

CUTADAPT		
Instrucción	Comando	Parámetro
Radio máximo de error	-e	0.3
Sobrelape mínimo	-O	17

Tabla 4. Parámetros utilizados para remover adaptadores con CUTADAPT.

- Eliminación de lecturas de baja complejidad.

Las lecturas sin adaptadores se procesaron con el programa PRINSEQ Versión 0.20.4 (Schmieder & Edwards, 2011) para eliminar lecturas detectadas como termodinámicamente inestables o con una complejidad baja (p. ej. homopolímeros, secuencias repetidas, las colas de poli-A/T, las Ns, etc) y lecturas duplicadas que se pudieron haber generado durante la secuenciación.. Los parámetros utilizados se especifican en la Tabla 5.

PRINSEQ		
Instrucción	Comando	Parámetro
Método para filtrar baja complejidad	-lc_method	entropy
Umbral de filtrado	-lc_threshold	60
Remover duplicados	-derep	235
Porcentaje mínimo de n's	-ns_max_p	5

Tabla 5. Parámetros utilizados para remover lecturas de baja complejidad con PRINSEQ.

- Filtrado de las lecturas por calidad y longitud.

Con ayuda del programa Trimmomatic Versión 0.32 (Bolger *et al.* 2014) y usando una ventana de 5 bases se eliminaron las lecturas detectadas con una calidad menor a 20 de acuerdo con el código ASCII asignado para cada nucleótido . Por otro lado, se removieron lecturas con una longitud menor a 50 bases con el mismo programa. Los parámetros utilizados se especifican en la Tabla 6.

TRIMMOMATIC		
Instrucción	Comando	Parámetro
Calidad mínima y ventana	SLIDINGWINDOW	:20:5
Longitud mínima	MINLEN	50

Tabla 6. Parámetros utilizados para remover lecturas de baja calidad con Trimmomatic. Calidad mínima aceptada Q>20 (probabilidad de 1 en 100 de identificar un nucleótido secuenciado incorrectamente).

6.3.2.2 Obtención de lecturas de fagos.

Aun con la efectividad del protocolo para purificación de VLPs, al momento de extraer el ADN de las VLPs fecales también se acarrea ADN de otros organismos no virales (p. ej. ratón, humano, bacterias y arqueas). Durante el proceso de recuperación de lecturas de fagos es esencial eliminar las lecturas secuenciadas a partir del ADN de estos organismos contaminantes.

- Remover lecturas de ratón.

Al utilizar murinos como modelo fue necesario eliminar las lecturas generadas a partir del ADN de ratón. Primero, se descargó el genoma de ratón (*Mus musculus*, cepa C57BL/6) de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en formato fasta. Posteriormente, se realizó un indexado del genoma para convertirlo a un formato aceptado por el programa SMALT Versión 0.7.4 y se mapearon las lecturas de las 9 librerías secuenciadas generando un archivo en formato SAM. Finalmente, se recuperaron las lecturas limpias de ratón con el programa SAMTOOLS Versión 2.1 (Li *et al.* 2009). Los parámetros utilizados se especifican en la Tabla 7.

SMALT		
Instrucción	Comando	Parámetro
Mínimo de nucleótidos cubiertos por los k -meros	-c	60

Tabla 7. Parámetros utilizados para identificar lecturas de ratón con SMALT. El término k -mero se refiere las subsecuencias con una longitud k calculadas a partir de las lecturas.

- *Remover lecturas de humano, bacterias, arqueas.*

Debido a la existencia de regiones homologas entre los genomas de los fagos y sus bacterias hospederas, al remover lecturas de bacterias se pueden eliminar también las lecturas de sus fagos depredadores. Por lo anterior, antes de remover lecturas bacterianas, las 9 librerías secuenciadas se alinearon contra la base de datos viral RefSeq del NCBI utilizando el programa SMALT *Version 0.7.4* (Tabla 7). Aquellas lecturas positivas a virus se extrajeron y reservaron mientras que las no mapeadas se procesaron en KRAKEN2 (Wood *et al.*, 2019) para eliminarles lecturas de bacterias, arqueas y humano. Por último, las lecturas limpias de estos organismos contaminantes y las positivas a virus de la RefSeq se concatenaron y se guardaron como posibles lecturas virales.

6.3.2.3 Ensamble metagenómico del fagoma de ratón con SMet.

-*Generación del ensamble*

Con el objetivo de conocer los genomas de fagos presentes en el intestino de los ratones antes y después de la inoculación se elaboraron ensambles *de novo* con los programas IDBA_UD *Versión 1.1.3* (Peng *et al.*, 2012) y SPAdes *Versión 3.12.0* (Banckevich *et al.*, 2012) a partir de un total de 28,346,554 lecturas limpias pertenecientes a las 9 muestras de VLPs secuenciadas, posteriormente se generó un metaensamble con el programa Metassembler (Hernandez Wences & Schatz, 2015).

Del metaensamble armado se eliminaron contigs < 2000 bases de longitud y contigs redundantes con el programa CD-HIT (Fu *et al.*, 2012) y con el programa QUAST *Versión 5.0.2* (Gurevich *et al.*, 2013) se obtuvieron las estadísticas importantes para la valoración del ensamble final como N50, N75, L50, L75, contig mas largo y número de "Ns". A partir de aquí, este ensamble será referido como el fagoma intestinal de ratón. Los parámetros utilizados se especifican en la Tabla 8.

IDBA_UD		
Instrucción	Comando	Parámetro
k-meros	-k	min 35, max 115
SPAdes		
Instrucción	Comando	Parámetro
k-meros	-k	min 35, max 115
Reductor del número de desajustes	--careful	
CD-HIT		
Instrucción	Comando	Parámetro
Porcentaje de identidad	-c	0.9 (90 % de identidad)
Porcentaje de cobertura de la secuencia más corta	-aS	0.9 (90 % cobertura)
Tamaño de la palabra	-n	5

Tabla 8. Parámetros utilizados para los ensamblados y remover contigs duplicados del fagoma de ratón.

- Asignación taxonómica del fagoma de ratón con síndrome metabólico.

El fagoma intestinal de ratón armado anteriormente se procesó con el programa BLASTx para asignar taxonomía viral, este programa traduce la secuencia de nucleótidos en sus posibles marcos de lectura y compara estas secuencias traducidas contra una base de datos de proteínas, en este caso se usó la RefSeq de proteínas virales del NCBI. Los resultados de este proceso se analizaron utilizando el algoritmo del último ancestro en común (LCA, por sus siglas en inglés) con el programa MEGAN Versión 5.11.3 (Huson *et al.*, 2007) lo que permitió conocer las principales familias de fagos presentes en el fagoma armado. Los parámetros utilizados se especifican en la Tabla 9.

BLASTx		
Instrucción	Comando	Parámetro
Valor e	-evalue	1e-3
MEGAN		
Instrucción	Comando	Parámetro
Umbral mínimo de aciertos	-Min Score	40
Porcentaje máximo de aciertos bajo el disjointScore	-Top percent	10
Identificador de lecturas de baja complejidad	- Min Complexity	0.44
Tipo de lecturas procesadas	-LCA algorithm	longReads
Porcentaje de cobertura	-Percent to cover	80

Tabla 9. Parámetros utilizados para asignación taxonómica del fagoma de ratón.

- *Alineamiento de las lecturas de ratón contra el ensamble y filtrado de los contigs.*

Se realizó el alineamiento de cada una de las 9 librerías de VLPs contra el ensamble del fagoma de ratón utilizando el programa SMALT *Versión 0.7.4* para verificar la representatividad de los genomas armados en las muestras de VLPs secuenciadas. Posteriormente, se contó el número de lecturas mapeadas sobre cada contig y se eliminaron aquellos contigs que no pudieron ser cubiertos por las lecturas en más de un 75% de su longitud y con un 90% de identidad . Los parámetros utilizados se especifican en la Tabla 10.

SMALT		
Instrucción	Comando	Parámetro
Mínimo de nucleótidos cubiertos por los k -meros	-c	70
Identidad	-y	0.9

Tabla 10. Parámetros utilizados para el mapeo de las muestras de VLPs sobre el fagoma de ratón. Los comandos indican que al menos 70 bases de una lectura deben ser cubiertas por el diccionario de k -meros generado (-c) y el alineamiento debe tener un 90 % de identidad (-y).

6.3.2.4 *Análisis de la abundancia del fagoma intestinal de ratón.*

Los procedimientos anteriores lograron identificar genomas de fagos o posibles fagos intestinales presentes en los ratones antes y después de recibir el tratamiento con VLPs de niños normopeso; ahora, para conocer los cambios ocurridos en la composición del fagoma en las semanas 10 y 17 postinoculación con respecto al día preinoculación se realizaron distintos análisis bioinformáticos y estadísticos enfocados en encontrar variaciones importantes tanto a nivel de poblaciones como de fagos individuales.

-Abundancia relativa de los fagos intestinales de ratón con SMet.

Con conteo del número de lecturas alineadas por contig se calcularon los *Counts per million* (CPMs) para cada genoma y en cada una de las muestras obteniendo así las abundancias relativas de las diferentes familias virales identificadas. Se realizó la búsqueda de familias con cambios significativos en su abundancia a las semanas 10 y 17 postinoculación con respecto al día preinoculación mediante un análisis discriminante lineal (LDA, por sus siglas en inglés) con el programa LEfSe.

- Pruebas de diversidad α y β del fagoma de ratón.

A partir de la matriz de CPMs construida se realizó una prueba de disimilitud de Bray-Curtis con el programa QIIME Versión 1.9.1 y de esta manera cuantificar las diferencias en la composición de las comunidades de fagos presentes en los ratones antes y después de la aplicación del tratamiento. Posteriormente, se elaboró un análisis de similitudes (ANOSIM) como prueba estadística entre los grupos.

Se calcularon los índices de diversidad α Chao1 y Shannon con el objetivo de monitorear el efecto del tratamiento sobre la riqueza y diversidad biológica de los fagos intestinales identificados. Éste análisis se realizó con el programa R Versión 1.2.5033 con 10,000 iteraciones y además se incluyó una prueba estadística T para conocer la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tiempos estudiados.

-Análisis de fagos diferenciales en el fagoma de ratón.

Se identificaron los contigs con presencia en las 9 muestras para conocer cuales de los fagos que ya estaban presentes antes del tratamiento tuvieron cambios importantes postinoculación. Sobre estos contigs se realizó un análisis de abundancia diferencial con el programa TRINITY que utiliza el paquete de DESeq2 en R [Versión 4.0.1] y de esta manera identificar cambios diferenciales en abundancia a las semanas 10 y 17 comparando con el día preinoculación. Se tomaron como fagos diferenciales aquellos contigs con un valor de cambio en abundancia o Fold change (FC) de 4, se realizó una transformación logarítmica en base 2 del FC (Log_2FC) por lo que el valor aceptado como diferencial fue un Log_2FC de 2. Además se tomó en cuenta un valor $q < 0.05$ transformado a $-\log_{10}$ resultando en un valor aceptado como significativo de 1.3.

6.3.3 Fagoma intestinal normopeso de referencia.

Un análisis importante es la identificación de los fagos introducidos en los ratones como tratamiento, esto para conocer la existencia de fagos intestinales asociados a un estado de salud en humanos que pudieron permanecer en el intestino de los ratones después de ser administrados así como la presencia de fagos intestinales de ratón que son compartidos con los humanos.

Debido a que no se contaba con la secuenciación de las VLPs de niños normopeso administradas en los ratones, se utilizó un fagoma intestinal de referencia perteneciente a niños normopeso, fenotipo que coincide con el de los niños donadores del inóculo para nuestros ratones; conformado por 29,760 contigs mayores a 2,000 bases clasificados como posibles fagos procedentes de un trabajo previo de nuestro laboratorio (Bikel *et al.*, 2020). A partir de aquí este grupo de contigs será referido como el fagoma intestinal de niños normopeso.

Un dato importante es que 3 de los niños de Bikel *et al.*, 2020 coincidían con 3 de las muestras inoculadas en nuestros ratones con SMet (Tabla 11).

Muestras inoculadas	Muestras de Bikel <i>et al.</i> 2020
193	193
314	314
161	161
155	146
158	147
127	164
022	165
066	169
124	010
029	015
295	

Tabla 11. Relación de las muestras del estudio de Bikel *et al.* 2020 y las muestras utilizadas para el inóculo de los ratones. Todas las muestras corresponden a niños normopeso y sin complicaciones metabólicas. Se observan en gris las muestras utilizadas para formar el inóculo de los ratones y que son compartidas con el estudio de Bikel *et al.*, 2020.

- *Asignación taxonómica del fagoma intestinal de niños normopeso.*

El fagoma intestinal de niños normopeso de Bikel *et al.*, 2020 se asignó taxonómicamente con objetivo de conocer las diferentes familias de fagos presentes en este grupo de genomas. Al igual que con el fagoma intestinal de ratón, se usó el programa BLASTx utilizando con la base de datos RefSeq de proteínas virales del NCBI, el resultado de este proceso se analizó con el programa MEGAN Versión 5.11.3 utilizando el algoritmo de LCA, los parámetros utilizados se encuentran descritos en la Tabla 9.

- *Abundancia relativa de los contigs del fagoma de niños normopeso en los ratones con SMet.*

Con el objetivo de buscar la presencia de los fagos administrados en los ratones, con el programa SMALT Versión 0.7.4 se mapearon las 9 librerías de VLPs de ratón pertenecientes a los tres tiempos estudiados (preinoculación, semana 10 y 17 postinoculación) sobre el fagoma intestinal de niños normopeso de referencia. Se contaron las lecturas mapeadas a cada contig y se eliminaron los contigs que no fueron cubiertos en más del 75 % de su longitud y con un 90 % de identidad por las lecturas de VLPs de ratón. Se calcularon los CPMs obteniendo una matriz de datos, las abundancias relativas por familia viral y con el programa LEfSe se buscaron cambios en las abundancias de las familias virales identificadas. Parámetros descritos en la Tabla 10.

Pruebas de diversidad α y β del fagoma de niños normopeso.

A partir de la matriz de datos de CPMs obtenida en el mapeo anterior, se realizó una prueba de disimilitud de Bray-Curtis utilizando el programa QIIME Versión 1.9.1 y se elaboró un análisis de similitudes (ANOSIM) para encontrar diferencias en las comunidades de fagos de niños normopeso presentes en las librerías de VLPs de ratón para los diferentes tiempos de estudio (preinoculación, semanas 10 y 17 postinoculación).

Se calcularon los índices de diversidad α con el programa R Versión 1.2.5033 incluyendo los índices de riqueza de Chao1 y de diversidad de Shannon a 10,000 iteraciones para conocer si existen diferencias significativas antes y después de recibir el tratamiento con VLPs en la riqueza y diversidad de los fagos de niños normopeso identificados en las muestras de ratón.

- Análisis de fagos diferenciales en el fagoma de niños normopeso.

Por otra parte, se realizó un análisis de abundancia diferencial con el programa de TRINITY que utiliza el paquete de DESeq2 en R para identificar fagos de niños normopeso con cambios diferenciales en su abundancia en las muestras de ratón las semanas 10 y 17 post tratamiento con respecto al día preinoculación. Al igual que con los fagos de ratón, se tomaron como diferenciales los contigs con un valor de cambio en abundancia o Fold change (FC) de 4, se realizó una transformación logarítmica en base 2 del FC (Log_2FC) por lo que el valor aceptado como diferencial fue un Log_2FC de 2. Además se tomó en cuenta un valor $q < 0.05$ transformado a $-\log_{10}$ resultando en un valor aceptado como significativo de 1.3.

7.Resultados

7.1 . Efecto de los tratamientos en los ratones.

7.1.1 El tratamiento con VLPs no influyó en la ganancia de peso.

Al inicio del periodo de inducción del SMet los ratones pesaban en promedio 23 g y una vez que desarrollaron SMet registraron un peso promedio de 48 g aproximadamente.

Posterior a la inoculación, la primer semana se presentó un descenso en el peso, posiblemente como efecto del estrés ocasionado durante la administración del tratamiento. Después de la segunda semana postinoculación, los ratones registraron un aumento de peso como consecuencia de la dieta alta en grasa que se mantuvo hasta el final del ensayo.

Como se puede apreciar en la Figura 12, el grupo inoculado con VLPs íntegras mantuvo un mayor aumento de peso desde antes de la inoculación en comparación a los otros dos grupos por lo que este resultado no es efecto de las administración de VLPs.

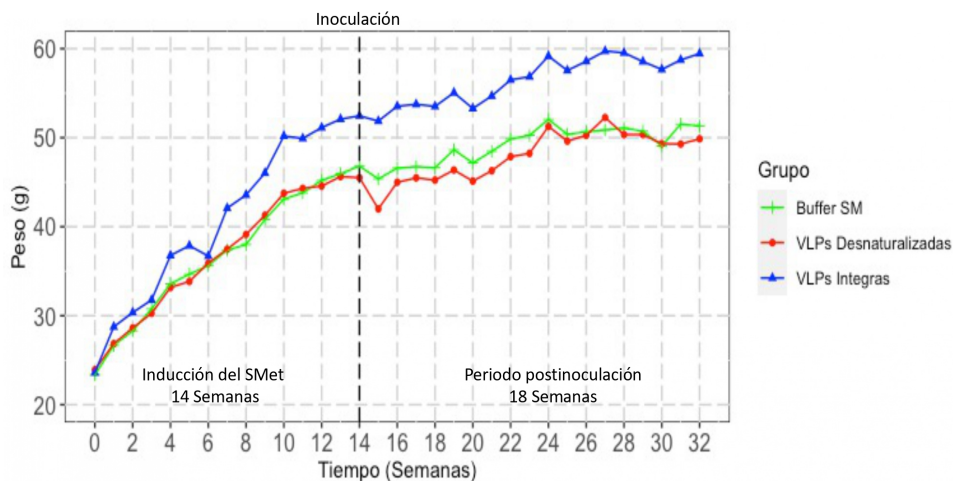


Figura 12. Peso de los ratones desde el inicio de la inducción del SMet hasta el sacrificio. Se realizaron análisis estadísticos para evaluar la existencia de variaciones importantes en los gramos ganados y perdidos de los ratones durante el periodo postinoculación, pero no se presentaron diferencias estadísticamente significativas. No se midió la cantidad de ingesta de alimento. Alimento y agua *ad libitum*.

7.1.2 Los ratones tratados con VLPs íntegras corrigieron la intolerancia a la glucosa.

7.1.2.1 Prueba de tolerancia a la glucosa

La estadística sobre los valores de AUC indicó diferencias estadísticamente significativas en la PTG del grupo inoculado con VLPs íntegras de niños normopeso a las semanas 10 y 17 después del tratamiento (Figura 13). Este resultado indica la existencia de una mejor asimilación de la glucosa en los ratones con SMet inoculados con VLPs en comparación con el grupo inoculado con Buffer SM y el grupo inoculado con VLPs Desnaturalizadas, en este último grupo también se presenta una mejor asimilación de la glucosa comparado con el grupo tratado con Buffer SM pero los resultados no llegan a ser significativos.

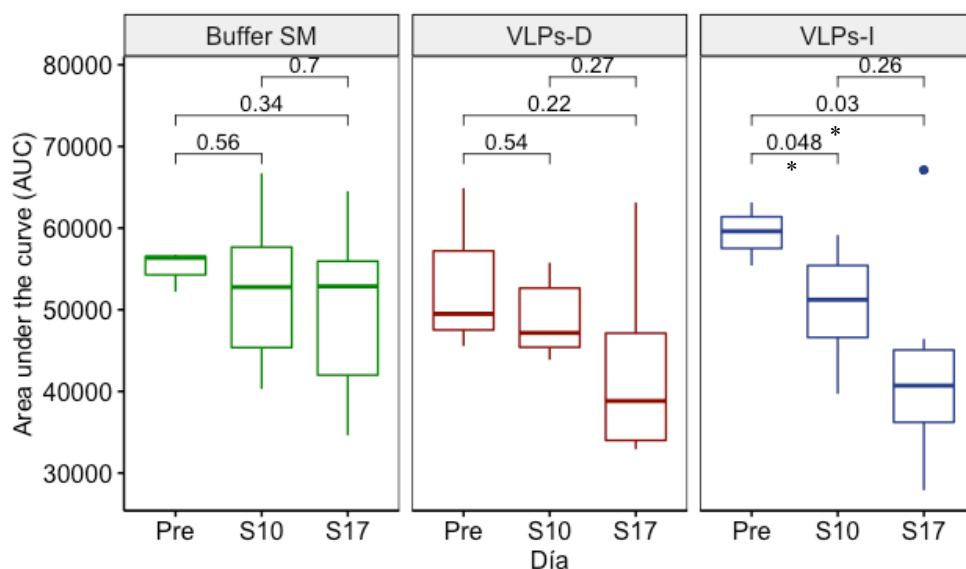


Figura 13. Análisis estadístico sobre las AUC de la PTG. Diferencias significativas en la AUC del grupo inoculado con VLPs íntegras (VLPs-I) a la semanas 10 (S10) y 17 (S17) postinoculación, con una mayor significancia en la S17 en comparación al tiempo preinoculación (Pre). * $p < 0.05$. Prueba T-student. • = Valores atípicos (outlier).

7.2 Resultados del tratamiento con VLPs íntegras sobre el fagoma intestinal de los ratones.

Las respuestas metabólicas de los ratones inoculados con VLPs de niños normopeso generaron algunas interrogantes como ¿Cuáles son los efectos del tratamiento sobre el fagoma intestinal de los ratones? ¿Los fagos administrados se establecieron en el intestino de los ratones a través del tiempo? Para responder estas preguntas se decidió estudiar la composición del fagoma intestinal de los ratones tratados con VLPs íntegras en 3 diferentes tiempos: el día preinoculación, la semana 10 y la semana 17 postinoculación, tiempos en los que se registró la corrección de la intolerancia a la glucosa.

7.2.1 El tratamiento no influyó en las cantidades de VLPs recuperadas.

Al aislar VLPs comúnmente se utilizan técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) con el objetivo de verificar un aislamiento exitoso, describir características morfológicas que pueden ser utilizadas para la identificación de los virus y para contabilizar el número aproximado de VLPs purificadas. Por otro lado, existen alternativas más accesibles que la TEM, si el objetivo es solo el de cuantificación de VLPs, como la citometría de flujo o la microscopía de epifluorescencia, esta última permite visualizar el ADN viral mediante la detección de fluorescencia.

En un estudio previo de nuestro laboratorio, Bikel *et al.* 2020 utilizaron TEM y microscopía de epifluorescencia para cuantificar VLPs a partir de muestras fecales de humano recuperadas con el protocolo de filtración descrito en la sección 1.6.2 (Figura S2), sus resultados indicaron que el protocolo utilizado en este trabajo es adecuado para aislar VLPs. Por lo tanto, se decidió realizar microscopía de epifluorescencia a partir de las VLPs extraídas de las muestras fecales de ratón y las micrografías confirmaron la presencia de partículas fluorescentes de diferentes tamaños incluyendo los correspondientes para VLPs (Figura 14)

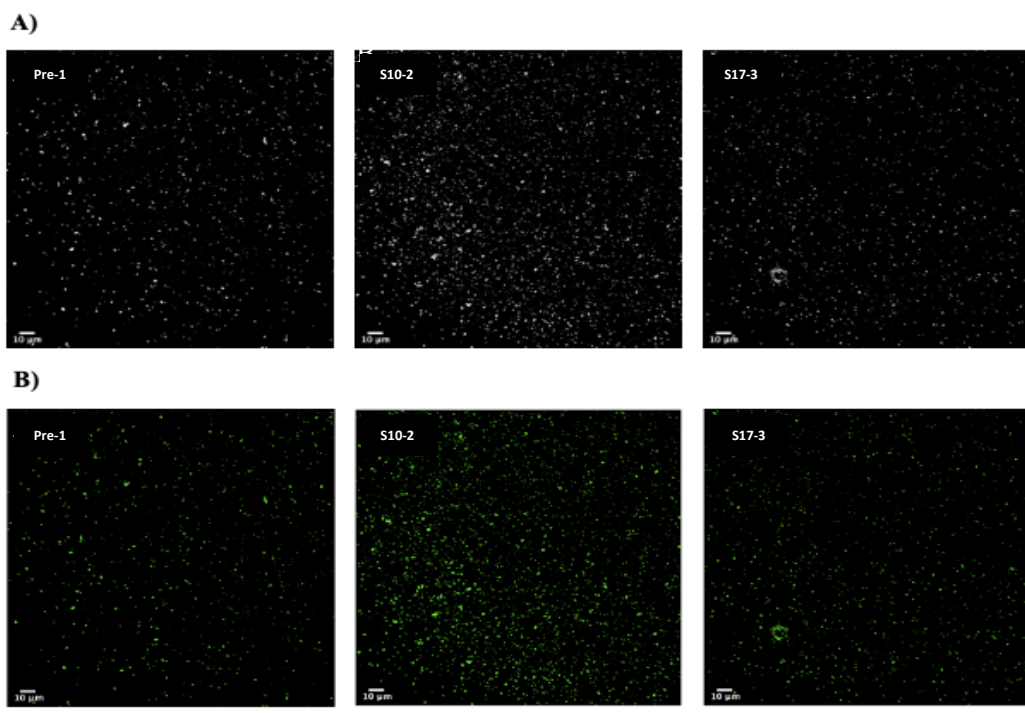


Figura 14. Micrografías de VLPs intestinales de ratón en microscopio confocal invertido 60X. Una micrografía por día a analizar (Muestra Pre-1 del día Preinoculación, Muestra S10-2 de la semana 10 postinoculación y Muestra S17-3 de la semana 17 postinoculación). A) Micrografías en blanco y negro. B) Micrografías con fluorescencia en verde. Tamaño por micrografía de 211.97 μm x 211.97 μm .

Posteriormente se realizó una cuantificación con programa FIJI de ImageJ (Rueder *et al.* 2017) y en su mayoría se pudieron observar partículas fluorescentes con tamaños de área < 0.05 μm^2 , que es el aproximado para una posible VLP, además de partículas más grandes de un rango de tamaño de 0.05 a 5 μm^2 (Tabla 12). Aplicando una prueba estadística T no se encontraron diferencias significativas en el número de VLPs recuperadas en cada tiempo pero se pudo observar una cantidad menor de VLPs recuperadas en la mezcla de la semana 17 postinoculación.

Día de colecta	Mezcla	VLPs < 0.05 μm^2 (10 μl)	VLPs < 0.05 μm^2 (300 μl)	Partículas > 0.05 μm^2 (10 μl)	Partículas > 0.05 μm^2 (300 μl)
Preinoculación	Pre-1	1.6471x10 ⁷	4.9414x10 ⁸	1.600x10 ⁶	4.8022x10 ⁷
Semana 10 Postinoculación	S10-2	2.4285x10 ⁷	6.7457x10 ⁸	1.6508x10 ⁶	4.9552x10 ⁷
Semana 17 Postinoculación	S17-3	3.1809x10 ⁷	9.5429x10 ⁸	6.2388x10 ⁵	1.8716x10 ⁷

Tabla 12. Resultados de la cuantificación de VLPs intestinales de ratón con FIJI. Con el programa Fiji se contaron las partículas fluorescentes y de acuerdo con los rangos de tamaño pudieron clasificarse como posibles VLPs (< 0.05 μm^2) o partículas más grandes (0.05 a 5 μm^2). Se calcularon las cantidades aproximadas de VLPs y partículas grandes para 10 μl (volumen usado para microscopía) y 300 μl (volumen total recuperado en la purificación).

Se obtuvieron diferentes concentraciones de ADN viral a partir de 50 μL de la resuspensión de VLPs extraídas de cada una de las muestras. En la Tabla 13 se pueden observar los ng/ μL y ng totales de ADN viral purificado para cada muestra. Las cantidades de ADN recuperadas fueron suficientes para generar las librerías de secuenciación masiva (Figura S3).

Día de colecta	Mezcla	Viral ADN (ng/ μL)	Volumen de elución (μL)	Ng totales
Preinoculación	Pre-1	0.7273	50	36.36
	Pre-2	2.9933	50	149.66
	Pre-3	5.86	50	293
Semana 10 PostInoculación	S10-1	4.4	50	220
	S10-2	1.2306	50	61.53
	S10-3	1.35	50	67.5
Semana 17 Postinoculación	S17-1	0.8333	50	41.66
	S17-2	1.4286	50	71.43
	S17-3	1.2213	50	61.06

Tabla 13. Resultados de la cuantificación del ADN viral recuperado de cada mezcla. ADN viral recuperado con un método de extracción por columna y cuantificado con el fluorómetro QUBIT.

A partir del ADN viral extraído se generaron 9 librerías con diferentes números de lecturas (Tabla 14). Se secuenciaron un total de 28,346,554 lecturas pares (Forward y Reverse) con una longitud de entre 35 y 150 bases.

Día ensayo	Librería	Lecturas totales (F y R)
Preinoculación	Pre-1	8,943,192
	Pre-2	8,028,098
	Pre-3	5,998,616
Semana 10 Postinoculación	S10-1	4,752,796
	S10-2	7,633,608
	S10-3	9,746,892
Semana 17 Postinoculación	S17-1	5,729,656
	S17-2	5,474,262
	S17-3	4,146,648

Tabla 14. Número de lecturas crudas para cada librería. El número de lecturas totales incluye tanto a las lecturas secuenciadas en dirección 5'-3' Forward (F) como las secuenciadas en dirección 5'-3' Reverse (R).

7.2.2 Resultado de la limpieza de las lecturas.

Cuando el objetivo es trabajar con un grupo particular de microorganismos, en nuestro caso bacteriófagos, es necesario establecer filtros que permitan por una parte obtener lecturas con una buena calidad y por otra la eliminación de lecturas de organismos que no pertenecen a nuestro grupo de interés, garantizando de esta manera la realización de análisis confiables y conclusiones más acertadas.

Los primeros filtros de limpieza identificaron que entre el 16.52 y el 20.79 % de las lecturas contenidas en las 9 librerías presentaban adaptadores, eran de baja complejidad, menores a 50 bases o con una calidad baja ($Q < 20$) por lo que fueron eliminadas del estudio. También se encontró que las 3 librerías de la semana 10 post tratamiento contenían > 50 % de lecturas de ratón lo que representa porcentajes elevados en comparación con las muestras del día preinoculación y de la semana 17 postinoculación (Tablas 15 y 16). No se conoce de forma precisa el motivo del aumento de lecturas de ratón en la semana 10 pero posiblemente existía un mayor número de células de ratón suspendidas en las heces al momento de realizar la purificación de VLPs.

En la eliminación de lecturas pertenecientes a bacterias, arqueas y humano se encontró que, en las librerías con buena calidad, entre el 5.54 y 14.53 % de las lecturas eran de bacterias, mientras que se encontraron porcentajes muy pequeños de lecturas de arqueas y humano (Tablas 15 y 16).

Los análisis anteriores permitieron la obtención de entre un 24.22 y un 80 % de posibles lecturas virales en las diferentes librerías con buena calidad (Tablas 15 y 16), este rango fue tan variado debido a que, como se menciona anteriormente, parte del ADN secuenciado pertenecía a ratón y este ocupó una fracción importante de las librerías generadas.

Día ensayo	Librería	Lecturas crudas	Lecturas con buena calidad	Ratón	Bacteria	Arquea	Humano	Virales
Preinoculación	Pre-1	8,943,192	7,336,228	1,140,944	911,612	2,260	10,338	5,271,074
	Pre-2	8,028,098	6,609,062	483,146	923,666	1,938	11,972	5,188,340
	Pre-3	5,998,616	4,877,202	331,288	626,356	1,338	12,500	3,905,720
Semana 10 Postinoculación	S10-1	4,752,796	3,866,220	2,269,184	215,460	508	4,180	1,376,888
	S10-2	7,633,608	6,139,626	3,737,424	339,970	874	13,616	2,047,742
	S10-3	9,746,892	7,720,254	5,341,222	500,390	710	8,452	1,869,480
Semana 17 Postinoculación	S17-1	5,729,656	4,122,412	485,590	544,714	870	10,166	3,081,072
	S17-2	5,474,262	4,569,464	250,740	663,982	1,414	7,860	3,645,468
	S17-3	4,146,648	3,387,194	1,052,554	370,058	792	3,020	1,960,770

Tabla 15. Número de lecturas correspondientes a cada filtrado realizado.

Día ensayo	Librería	% Lecturas con buena calidad	% Ratón	% Bacteria	% Arquea	% Humano	% Virales
Preinoculación	Pre-1	100	15.55	12.43	0.03	0.14	71.85
	Pre-2	100	7.31	13.98	0.03	0.18	78.50
	Pre-3	100	6.79	12.84	0.03	0.26	80.08
Semana 10 Postinoculación	S10-1	100	58.69	5.57	0.01	0.11	35.61
	S10-2	100	60.87	5.54	0.01	0.22	33.35
	S10-3	100	69.18	6.48	0.01	0.11	24.22
Semana 17 Postinoculación	S17-1	100	11.78	13.21	0.02	0.25	74.74
	S17-2	100	5.49	14.53	0.03	0.17	79.78
	S17-3	100	31.07	10.93	0.02	0.09	57.89

Tabla 16. Porcentajes (%) de lecturas correspondientes a cada filtrado realizado.

7.2.3 El fagoma intestinal de ratón a través del tiempo.

- Resultados de la generación del ensamble metagenómico

Con las lecturas limpias se generaron dos ensambles metagenómicos utilizando los programas IDBA_UD y SPAdes, posteriormente se usó el programa METASSEMBLER para unir los dos ensambles en un metaensamble integrado por 144,344 contigs de diferentes longitudes. Del metaensamble se identificaron 6166 contigs no redundantes y con una longitud mayor a 2000 bases que fueron clasificados taxonómicamente con BLASTx. Se encontraron 479 contigs pertenecientes a virus eucariotas que fueron removidos del ensamble, recordando que el objetivo del proyecto es estudiar a los bacteriofagos y dejando 5,687 contigs disponibles para continuar con los análisis.

Las lecturas limpias de las 9 librerías se alinearon contra los 5,687 contigs mencionados anteriormente y se aplicó un filtro de cobertura donde el contig debía ser cubierto por las lecturas en más del >75% de su longitud para ser considerado, 189 contigs no cumplieron este filtro y fueron removidos.

Finalmente, 5,498 contigs aprobaron los filtros anteriores y se utilizaron para estudiar a los fagos intestinales de ratón, éste conjunto de contigs será referido como el fagoma intestinal de ratón. Las estadísticas de los ensambles y el metaensamble se muestran en la Tabla 17.

Ensamblados	Contigs totales	Contigs > 2 kb	Contig más largo	N50	N75	L50	L75	N
SPAdes	265,013	6,154	91,814	1,236	710	13,496	36,351	499
IDBA_UD	164,032	5,814	64,695	1,229	711	12,848	33,969	11
METASSEMBLER	144,344	6,167	91,814	1,276	726	12,760	34,490	529
Fagoma intestinal de ratón >2 kb	5,498	5,498	91,814	5,776	3,149	1,293	3,108	525

Tabla 17. Estadísticas importantes de los diferentes ensambles metagenómicos virales generados.

Los parámetros muestran el estado de los ensambles. N50 = Longitud del contig más corto al 50% del tamaño total del ensamble, N75 = Longitud del contig más corto al 75% del tamaño total del ensamble, L50 = Número de contigs que corresponden al 50% del tamaño total del ensamble, L75 = Número de contigs que corresponden al 75% del tamaño total del ensamble y N = Número de nucleótidos que no pudieron ser identificados como A, C, T o G.

Las lecturas se remapearon ahora sobre los 5,498 contigs del fagoma intestinal de ratón y se encontró que entre el 27 y el 55 % de las lecturas resultaron alineadas contra los contigs (Tabla 18), las librerías con mayores porcentajes de lecturas alineadas fueron las del día preinoculación.

Tiempo	Librería	Lecturas totales	Lecturas alineadas	% Alineado
Preinoculación	Pre-1	5,271,074	2,063,323	39.14
	Pre-2	5,188,340	2,843,075	54.8
	Pre-3	3,905,720	2,130,916	54.56
Semana 10 Postinoculación	S10-1	1,376,888	376,068	27.31
	S10-2	2,047,742	674,459	32.94
	S10-3	1,869,480	516,954	27.65
Semana 17 Postinoculación	S17-1	3,081,072	1,175,959	38.17
	S17-2	3,645,468	1,225,791	33.63
	S17-3	1,960,770	618,910	31.56

Tabla 18. Número de lecturas alineadas sobre el ensamble del fagoma intestinal de ratón.

- La diversidad α y β del fagoma intestinal de ratón varía a través del tiempo.

Las pruebas de diversidad β son necesarias para comprender la heterogeneidad de un ecosistema, en metagenómica se emplean para conocer qué tan diferente es la composición microbiana de las poblaciones a estudiar y se enfocan principalmente en los perfiles taxonómicos y de abundancia de las muestras analizadas.

Como medida de diversidad β se utilizó una prueba de disimilitud de Bray-Curtis para cuantificar las diferencias en la composición de las muestras de VLPs de ratón. La prueba reveló que las muestras de VLPs se agrupan por tiempo (Preinoculación, semana 10 postinoculación y semana 17 postinoculación) (Figura 15a,b). Por otra parte el ANOSIM global que compara a la vez a los tres diferentes tiempos se mostró significativo (Figura 15c) indicando que existen diferencias en la composición de los grupos. No obstante el ANOSIM que compara a los grupos de manera individual (Figura 15c) mostró que las diferencias entre tiempos no son estadísticamente significativas posiblemente por la influencia de la dispersión intra-grupo de las muestras.

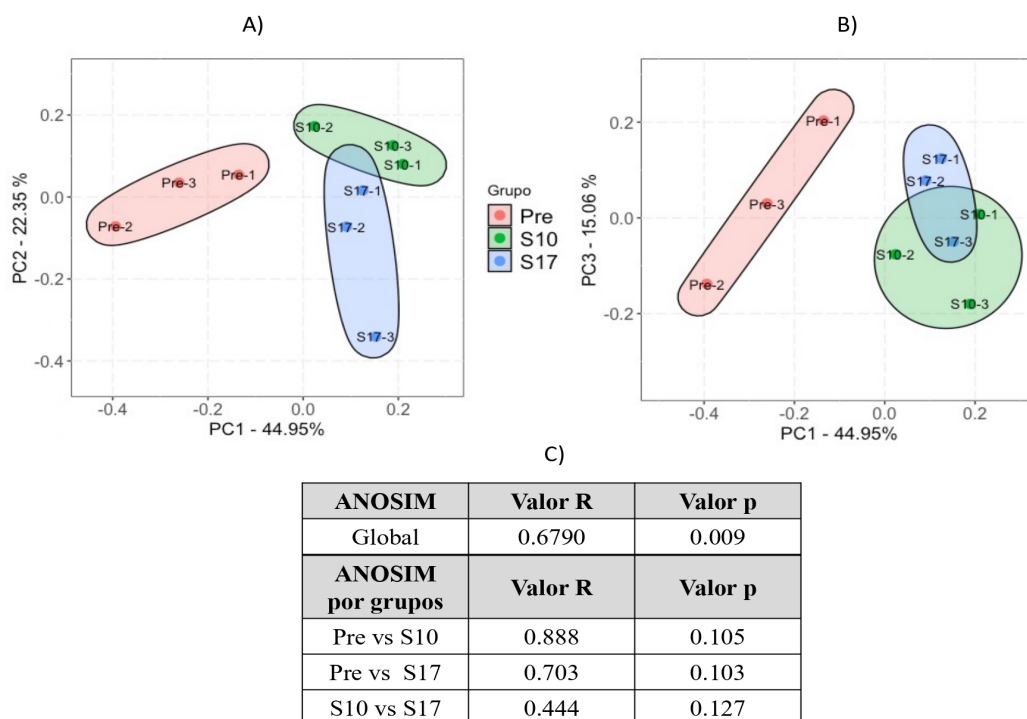


Figura 15. Gráfico de componentes principales (PCA) para el fagoma de ratón. A) PC1 y PC2, B) PC1 y PC3, C) Resultados ANOSIM global y ANOSIM por grupos o pareado. Al graficar los resultados de la prueba de disimilitud de Bray-Curtis se observa la distribución de las muestras para los diferentes tiempos estudiados. Las elipses fueron añadidas manualmente como ayuda visual. $p < 0.05$

Por otro lado, los índices de diversidad α permiten comprender la riqueza biológica de una población mediante la estimación de indicadores como el número de especies esperadas (Índice de Chao1) o la diversidad específica (Índice de Shannon). Utilizando estos parámetros se observó que, de acuerdo con el índice de Chao1, algunas muestras presentaron una tendencia a perder riqueza en la semana 10 postinoculación la cual parece recuperarse en la semana 17 (Figura 16A). En cuanto a la diversidad, el índice de Shannon reflejó un aumento en la semana 10 postinoculación que se mantuvo en la semana 17 (Figura 16B). Estas variaciones, si bien no son estadísticamente significativas, pueden deberse a fagos individuales que presentaron cambios importantes como consecuencia de la mejoría en la salud metabólica de los ratones o del factor tiempo.

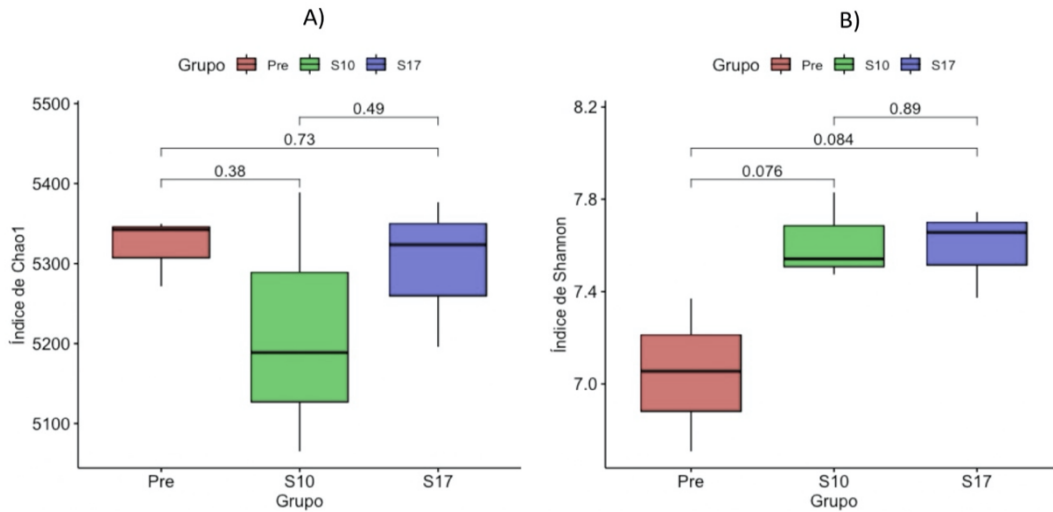


Figura 16. Gráficos de diversidad α del fagoma de ratón. A) Índice de Chao1 representando la riqueza de especies. B) Índice de Shannon representando la diversidad biológica. Resultados sin significancia estadística * $p > 0.05$

- La abundancia relativa de las familias de fagos intestinales se mantiene estable a través del tiempo.

La clasificación taxonómica sobre los 5,498 contigs del fagoma intestinal de ratón identificó 2,222 contigs (40.42%) que pudieron clasificarse como fagos, de los cuales; 1,624 se reconocieron en 5 familias de bacteriófagos del orden *Caudovirales*: *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Herelleviridae* e *Inoviridae*. Además, existieron 598 contigs virales que no pudieron ser clasificados en las familias anteriores o que su clasificación no fue discriminada por el análisis de LCA y fueron nombrados como Otros.

Por otro lado, se identificaron 3,276 contigs desconocidos (59.58%) que pueden provenir de genomas de fagos que no están reportados en la base de datos viral o fagos que no se han caracterizado. El número de contigs identificados para cada uno de estos grupos se encuentran en la Tabla 19.

Familia viral	Nº de contigs
Desconocido	3,276
Siphoviridae	924
Otros	598
Myoviridae	586
Podoviridae	61
Herelleviridae	46
Inoviridae	7

Tabla 19. Clasificación taxonómica de los 5,498 contigs virales del fagoma de ratón

Las familias de fagos *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae* identificadas anteriormente son también las más comunes en los estudios de fagoma humano y de ratón mientras que las familias *Herelleviridae* e *Inoviridae* se han reportado como muy poco abundantes o no suelen reportarse.

Como resultado importante se encontró que no existen cambios estadísticamente significativos a través del tiempo en las abundancias relativas de las familias de fagos identificadas. Particularmente en este análisis no se incluyeron los fagos identificados como desconocidos y sólo se graficaron las abundancias de 2,222 fagos con asignación taxonómica conocida (Figura 17).

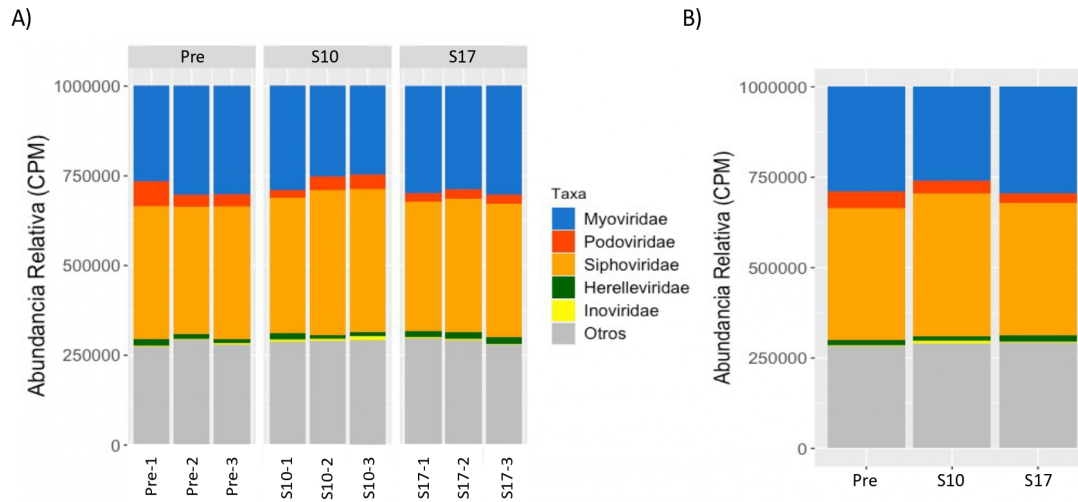


Figura 17. Abundancia relativa (CPMs) de las familias virales presentes en el fagoma intestinal de ratón al día Preinoculación, Semana 10 y Semana 17. A) Abundancia relativa por muestra. B) Abundancia relativa promedio por grupo. El Análisis Lineal Discriminante (LDA) no arrojó familias con cambios significativos en su abundancia.

-Existen contigs de fagos intestinales de ratón con cambios diferenciales en abundancia a través del tiempo.

Se identificaron 4,610 contigs presentes en el intestino de los ratones tanto antes como después de la aplicación del inóculo y se estudiaron los cambios en su abundancia a través del tiempo. Esto con el objetivo de conocer si se afectó la abundancia de los fagos de la microbiota nativa de los ratones con SMet después del tratamiento con VLPs.

El análisis de abundancia diferencial indicó que 1,203 contigs presentaron cambios diferenciales en su abundancia a las semanas 10 y 17 postinoculación con respecto al día preinoculación. La Figura S4 contiene la información de los contigs diferenciales únicos y compartidos para cada tiempo.

Se realizó un agrupamiento jerárquico de los contigs de acuerdo con el Log_2FC y valor q calculado para cada uno de ellos (Figura 18) y se identificaron las diferentes familias virales a las que estos pertenecen (Tablas 20 y 21).

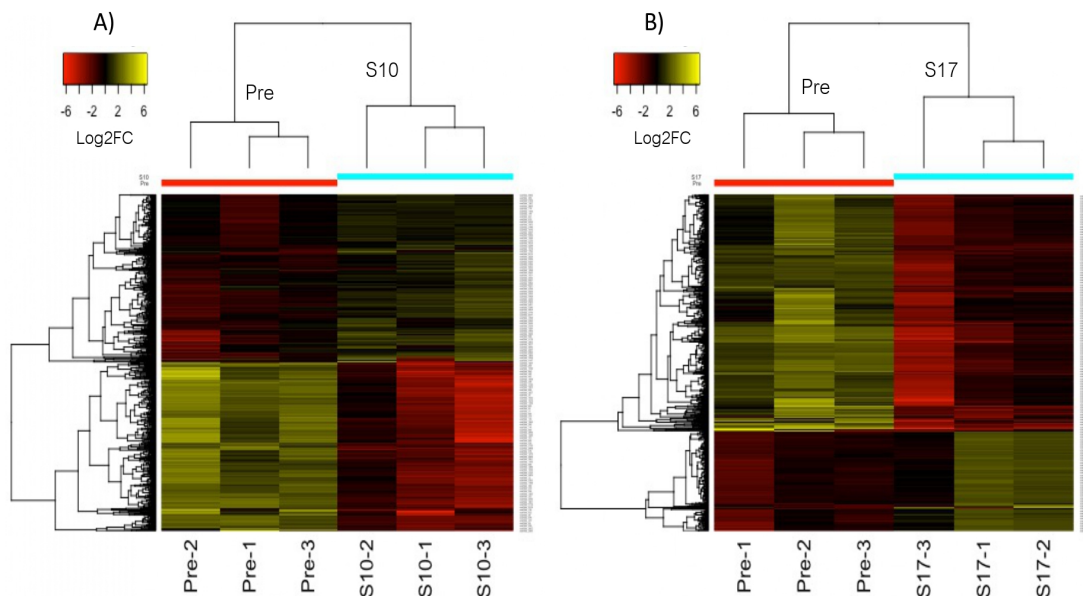


Figura 18. Gráficos de agrupamiento jerárquico de los contigs virales de ratón con abundancia diferencial. A) 885 contigs diferenciales a las semana 10 postinoculación. B) 797 contigs diferenciales a las semana 17 postinoculación. Los contigs con un aumento diferencial en su abundancia ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 2$, $q\text{-value} \leq 0.05$) se presentan en color amarillo y los contigs con disminución diferencial en su abundancia en color rojo ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -2$, $q\text{-value} < 0.05$).

Describiendo lo anterior, se encontraron 885 contigs virales con cambio diferencial en su abundancia en la semana 10 postinoculación con respecto al día preinoculación, de los cuales 441 aumentaron en abundancia (Enriquecidos, $\text{Log}_2\text{FC} > 2$, $q\text{-value} < 0.05$) y 444 disminuyeron (Disminuidos, $\text{Log}_2\text{FC} < -2$, $q\text{-value} < 0.05$). En la Tabla 20 se puede observar la clasificación taxonómica de cada uno de estos contigs.

Taxa	Pre vs S10	
	Enriquecidos	Disminuidos
Desconocidos	293	257
Siphoviridae	64	67
Myoviridae	42	63
Otros	37	52
Herelleviridae	2	5
Podoviridae	2	0
Inovirinae	1	0

Tabla 20. Número de contigs con cambios significantes en la semana 10 postinoculación y su clasificación taxonómica.

En la siguiente gráfica se puede observar el Log_2FC para los contigs de la semana 10 con respecto al día preinoculación separado por familia viral, cada punto representa a un contig o genoma de fago. Se muestran en amarillo aquellos que presentaron un aumento en abundancia y en rojo los que presentaron una disminución.

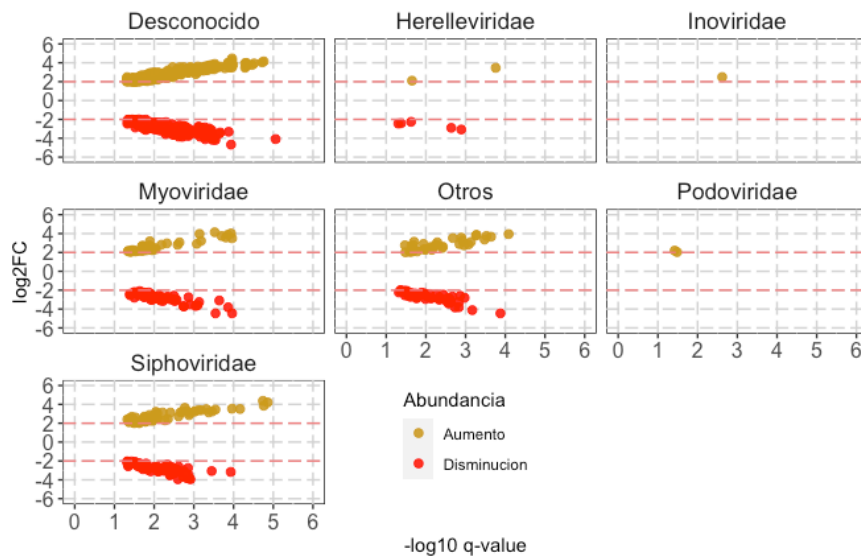


Figura 19. Relación del Log_2FC y $q\text{-value}$ para los contigs diferenciales a la semana 10 postinoculación. Agrupamiento por familia viral. La línea punteada roja indica un $\text{Log}_2\text{FC} > 2$ o < -2 . Se ajustó el valor q tomando como significativo un $-\log_{10} q\text{-value} > 1.3$. En color amarillo se presentan los contigs con aumento diferencial en abundancia y en color rojo los contigs con disminución diferencial en su abundancia.

La mayoría de los fagos con cambios significativos son desconocidos, seguidos por fagos de las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae*. Un resultado interesante fue que sólo dos fagos de la familia *Podoviridae* tuvieron cambios, esto indica que el inóculo administrado no perturbó a la mayoría de los fagos de esta familia en la semana 10 aun cuando suelen ser muy abundantes en el intestino. Por otro lado, en la familia *Inoviridae* solamente un fago tuvo cambio en su abundancia.

Por otra parte, fueron identificados 797 contigs virales con cambio diferencial en su abundancia en la semana 17 postinoculación con respecto al día preinoculación. La mayoría de los fagos disminuyeron en su abundancia, notándose 560 fagos con disminución (Disminuidos, $\text{Log}_2\text{FC} < -2$, $q\text{-value} < 0.05$) y 237 con aumento diferencial (Enriquecidos, $\text{Log}_2\text{FC} > 2$, $q\text{-value} < 0.05$). En la Tabla 21 se puede observar la clasificación taxonómica de cada uno de estos contigs.

Taxa	Pre vs S17	
	Enriquecidos	Disminuidos
Desconocidos	157	284
Siphoviridae	27	111
Otros	26	79
Myoviridae	26	78
Herelleviridae	1	4
Podoviridae	0	4

Tabla 21. Número de contigs con cambios significantes en la semana 17 y su clasificación taxonómica.

En la siguiente figura se puede observar el Log_2FC para los contigs de la semana 17 con respecto al día preinoculación separado por familia viral. La mayoría de estos contigs con cambios en abundancia son desconocidos, seguidos también por fagos de la familia *Siphoviridae* y *Myoviridae*.

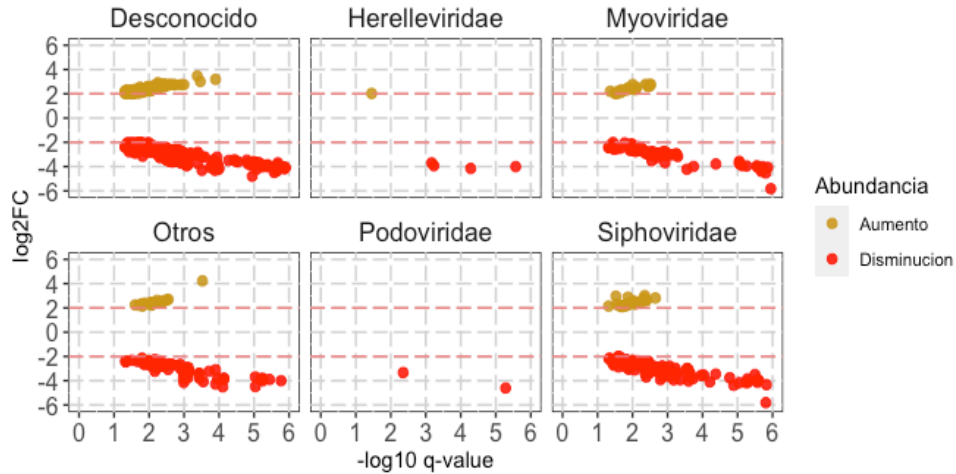


Figura 20. Relación del Log_2FC y q -value para los contigs diferenciales a la semana 17 postinoculación. Agrupamiento por familia viral. La línea punteada roja indica un $\text{Log}_2\text{FC} > 2$ o < -2 . Se ajustó el valor q tomando como significativo un $-\log_{10}q\text{-value} > 1.3$. En color amarillo se presentan los contigs con aumento diferencial en abundancia y en color rojo los contigs con disminución diferencial en su abundancia.

De manera general se puede observar que, a pesar de la cantidad inicial de 5,498 contigs diferentes identificados en el intestino de los ratones, solo el 23 % de estos tuvieron cambios significativos en las semanas 10 y 17. Al no contar con la secuenciación de las VLPs del grupo de ratones control (inoculados con Buffer SM) no se puede afirmar si estos efectos pudieron ser ocasionados por el tratamiento con VLPs o del tiempo. El resto de los fagos se mantuvieron estables en su abundancia y no fueron perturbados al menos en etapas tardías postrasplante. Además, se puede observar que en la semana 17 se presenta con mayor frecuencia una disminución diferencial en la abundancia de algunos fagos, estos efectos podrían derivar de cambios en la microbiota intestinal bacteriana que afectaron la abundancia del fagoma y a la vez la respuesta a la glucosa de los ratones.

7.3 Valoración del fagoma intestinal de niños normopeso utilizado como referencia.

Debido a que no se disponía de la secuenciación masiva de las VLPs trasplantadas se realizó la búsqueda de fagos de humano asociados a un estado normopeso presentes en el intestino de los ratones utilizando 29,760 contigs de fagos intestinales de niños sanos del trabajo de Bikel *et al.*, 2020. El objetivo al utilizar estos contigs como referencia es conocer la presencia de fagos de humano que pudieron establecerse o permanecer en intestino de los ratones después de ser administrados.

7.3.1 Los fagos asociados a humano normopeso no permanecen en el intestino de los ratones en etapas tardías postinoculación.

Al mapear las librerías de VLPs de ratón sobre los 29,760 contigs de Bikel *et al.*, 2020 se encontró que 3,056 contigs tuvieron al menos una lectura alineada. Sin embargo, al eliminar los contigs con poca cobertura solamente 63 contigs cumplieron el filtro. Finalmente, se contó el número de lecturas alineadas para cada muestra de VLPs de ratón sobre los 63 contigs mencionados anteriormente (Tabla 22).

Grupo	Librería	Lecturas limpias	Lecturas alineadas	No. de contigs positivos	% Alineado
Preinoculación	Pre-1	5,271,074	18,954	62	0.3596
	Pre-2	5,188,340	32,858	63	0.6333
	Pre-3	3,905,720	18,695	62	0.4787
S10 Postinoculación	S10-1	1,376,888	3,525	62	0.2560
	S10-2	2,047,742	4,164	61	0.2033
	S10-3	1,869,480	3,440	63	0.1840
S17 Postinoculación	S17-1	3,081,072	11,395	63	0.3698
	S17-2	3,645,468	10,650	63	0.2921
	S17-3	1,960,770	3,790	63	0.1933

Tabla 22. Número de lecturas de VLPs de ratón alineadas por muestra a los contigs del fagoma de niños normopeso.

Como se puede observar en la Tabla 22, los 63 contigs fueron encontrados presentes tanto en el periodo preinoculación como en las semanas 10 y 17 postinoculación. En principio, se esperaba encontrar estos fagos de humano solamente en las semana 10 y 17 pensando que se establecieron en el intestino de los ratones después de recibir el tratamiento con las VLPs, pero los resultados sugieren que los 63 contigs pueden pertenecer a fagos

intestinales que habitan tanto en el humano como en el ratón o a fagos intestinales de humano similares en secuencia a los de ratón.

La clasificación taxonómica indicó que de los 63 contigs solamente el 19 % pudo ser clasificado en alguna de las familias de fagos más comunes para intestino humano (Tabla 23).

Familia viral	No de contigs
Desconocidos	49
Siphoviridae	5
Podoviridae	5
Myoviridae	5
Otros	2

Tabla 23. Número de contigs de fagos identificados en el fagoma de niños normopeso y su clasificación taxonómica.

7.3.2 Los fagos de humano normopeso presentes en los ratones cambian a través del tiempo.

-Diversidad α y β de los contigs de humano normopeso presentes en los ratones.

La prueba de disimilitud de Bray-Curtis revela que las muestras de VLPs de ratón mapeadas a los 63 contigs de humano normopeso presentan una separación de acuerdo a los tiempos (Preinoculación, semana 10 y semana 17 postinoculación) (Figura 21) y esto se confirma al calcular el ANOSIM global donde las diferencias entre tiempos son estadísticamente significativas. Sin embargo, al calcular los ANOSIM que comparan los grupos individualmente las diferencias entre las muestras dentro de los grupos provocan un aumento en la dispersión que genera la pérdida de significancia (Figura 21). Estos resultados indican que los fagos de humano similares a los de ratones no tuvieron cambios importantes en su composición en los diferentes tiempos, hecho que sí pasó con el fagoma del ratón.

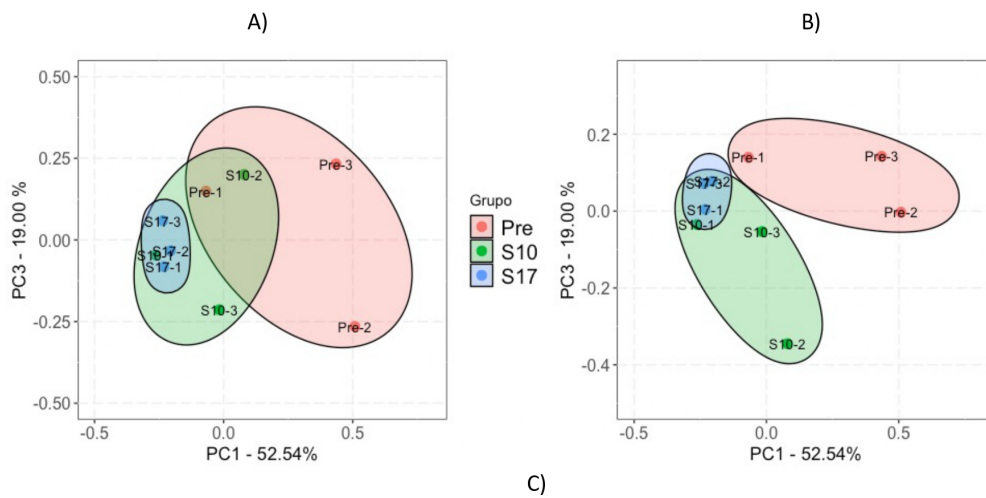


Figura 21. Gráfico de componentes principales (PCA) para el fagoma de niños normopeso vs lecturas virales de ratón. A) PC1 y PC2, B) PC1 y PC3, C) Resultados ANOSIM global y ANOSIM por grupos o pareado. Al graficar los resultados de la prueba de disimilitud de Bray-Curtis se observa la distribución de las muestras para los diferentes tiempos estudiados. Las elipses fueron añadidas manualmente como ayuda visual. *= $p < 0.05$.

El índice de Chao1 indicó un aumento significativo en la riqueza en algunas muestras de la semana 17 postinoculación con respecto al día preinoculación, mientras en el índice de diversidad de Shannon se presentó un ligero aumento no significativo en la diversidad en las semanas 10 y 17 con respecto al día preinoculación (Figura 22), indicando el enriquecimiento de las abundancias de algunos fagos presentes.

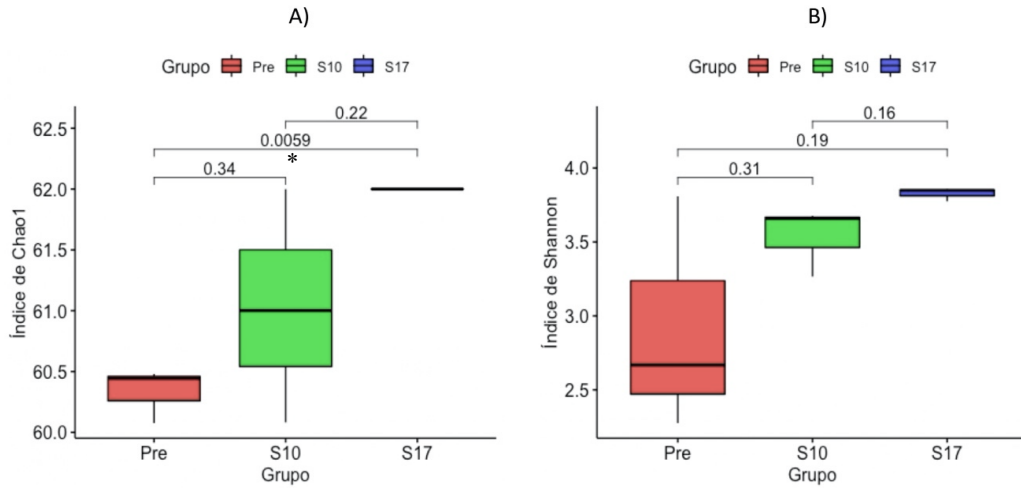


Figura 22. Gráficos de diversidad α para el fagoma de niños normopeso vs lecturas virales de ratón A) Índice de Chao1 representando la riqueza de especies. B) Índice de Shannon representando la diversidad biológica. Resultados sin significancia estadística * $p < 0.05$

-Abundancia relativa de las familias de fagos intestinales de niños normopeso en ratones con SMet.

Se calcularon las abundancias relativas por familia viral de los 63 contigs. Se excluyeron de este análisis a los contigs desconocidos y se incluyeron sólo los 14 fagos asignados en alguna familia viral. Como se puede observar en la Figura 23, los fagos más abundantes pertenecen a las familias *Podoviridae* que presenta una clara disminución en abundancia a las semanas 10 y 17. Por otro lado, se observa un aumento en la abundancia de los fagos de la familia *Siphoviridae*, pero las diferencias a través del tiempo no son significativas.

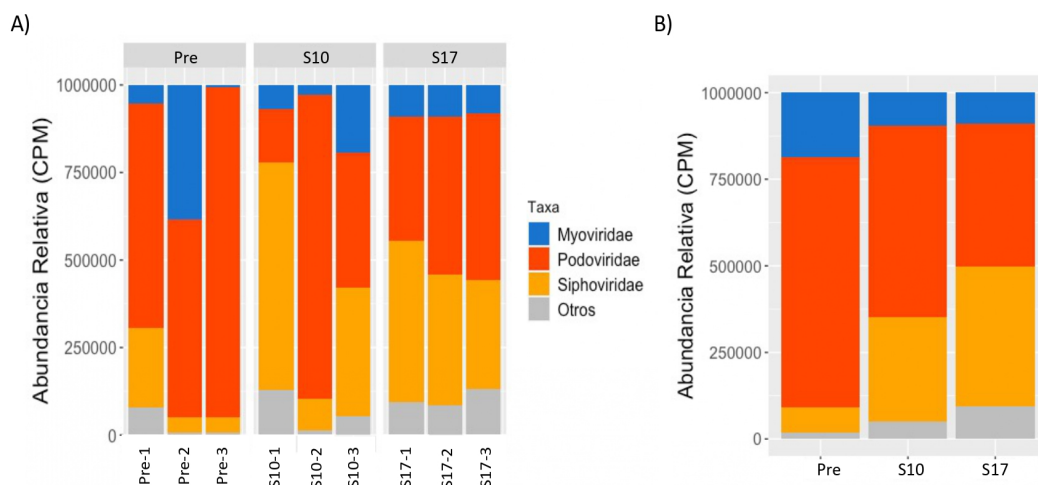


Figura 23. Abundancia relativa (CPMs) de las familias de fagos intestinales de niños normopeso presentes en los ratones con SMet al día preinoculación, Semana 10 y Semana 17. A) Abundancia relativa por muestra. B) Abundancia relativa promedio por grupo. El Análisis Lineal Discriminante (LDA) no arrojó familias con cambios significativos en su abundancia.

-Fagos intestinales de humano con cambios de abundancia diferencial en los ratones

A partir de los 63 contigs anteriores se lograron identificar 9 contigs con cambios diferenciales en su abundancia a las semanas 10 y 17 postinoculación. La Figura S5 contiene la información de los contigs diferenciales únicos y compartidos para cada tiempo.

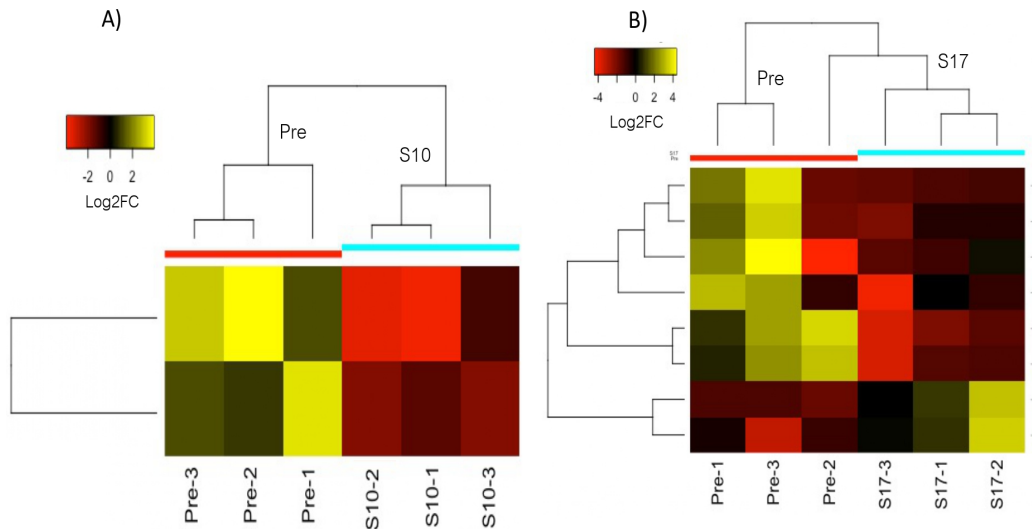


Figura 24. Gráficos de agrupamiento jerárquico de los contigs virales de ratón con abundancia diferencial. A) 2 contigs diferenciales a las semana 10 postinoculación. B) 8 contigs diferenciales a las semana 17 postinoculación. Los contigs con un aumento diferencial en su abundancia ($\text{Log}_2\text{FC} > 2$, $q\text{-value} < 0.05$) se presentan en color amarillo y los contigs con disminución diferencial en su abundancia en color rojo ($\text{Log}_2\text{FC} < -2$, $q\text{-value} < 0.05$).

Como se puede observar en las gráficas de agrupamiento jerárquico solamente 2 fagos intestinales de niños normopeso cambiaron en la semana 10 postinoculación al presentar una disminución en su abundancia. En la semana 17 postinoculación 8 fagos cambiaron con respecto al día preinoculación de los cuales 2 aumentaron en su abundancia y 6 disminuyeron, particularmente uno de estos contigs (Contig_27053) disminuyó en abundancia a la semana 10 y aumentó a la 17.

Como dato interesante se buscó la abundancia de los 63 contigs en los individuos normopeso y obesos del estudio de Bikel *et al.*, 2020 y no se encontraron como enriquecidos o disminuidos, concluyendo que la abundancia de estos 63 fagos no es dependiente de los fenotipos normopeso u obeso en humanos.

Al encontrarse la presencia de los 63 contigs de fagos de humano en el intestino de los ratones tanto en el día preinoculación (antes de la administración de VLPs) como en etapas postinoculación se plantea que las lecturas alineadas pertenecen a fagos intestinales de ratón con homología o compartidos con fagos intestinales de humano. Los resultados también señalan que los fagos de niños normopeso no permanecieron en el intestino de los ratones, al menos en las semanas 10 y 17 postinoculación pero que se perturbaron las abundancias de los fagos intestinales. Además, los fagomas de ratón con SMet y de niños normopeso tienen una composición muy diferente; esto puede deberse a que provienen de dos organismos tan distintos como el ratón y humano y que, además, se encuentran en condiciones de salud diferentes por lo que es difícil realizar comparaciones directas entre ellos.

8. Discusión

Los fagos intestinales son importantes en el mantenimiento de la homeostasis en el hospedero debido a su capacidad de regular las poblaciones bacterianas y de conferir ventajas evolutivas. Hasta ahora, existen algunos estudios importantes que describen parte de la fracción viral que compone a la microbiota intestinal humana y de ratón, así como los mecanismos de interacción entre los fagos y las bacterias (Dion *et al.*, 2020; Rodriguez-Valera *et al.*, 2009). Estas investigaciones han ayudado a conocer las diferentes familias virales habitantes del intestino y las fluctuaciones en sus abundancias en condiciones de enfermedad, pero el conocimiento completo del estado de las comunidades virales y específicamente de los fagos dentro del intestino humano y de ratón sigue siendo poco claro.

Por otra parte, se ha planteado el potencial del TMF como tratamiento a distintos padecimientos, incluyendo el SMet. No obstante, se presenta el riesgo de administrar bacterias patógenas o multidrogoresistentes con severas consecuencias principalmente en pacientes inmunosuprimidos (FDA, 2019). Asimismo, recientemente se estudia el uso de terapia a base de fagos para combatir enfermedades infecciosas pero su uso como moduladores de la microbiota intestinal en enfermedades metabólicas comienza a explorarse.

Tomando en cuenta lo anterior, este trabajo describe los cambios en la composición total de fagos (fagoma) presentes en el intestino de ratones con SMet inducido por una dieta alta en grasa que recibieron un tratamiento a base de VLPs íntegras procedentes de niños normopeso y metabólicamente sanos que, de acuerdo con los resultados de los tratamientos, presentaron una mejoría significativa en la asimilación de la glucosa a las semanas 10 y 17 postinoculación. Además, se integra la búsqueda de fagos de humano que pudieron permanecer y establecerse en el intestino de los ratones después de la administración del tratamiento.

- Aislamiento de VLPs intestinales, generación de librerías y ensamblajes.

En los estudios de viroma intestinal el proceso de aislar VLPs a partir de muestras fecales ha tenido modificaciones a través de los años. Inicialmente se utilizaban metodologías como la purificación por Cloruro de Cesio donde se recuperaba un gradiente de centrifugación correspondiente para las VLPs (Kleiner *et al.*, 2015). Recientemente se han introducido protocolos a base de filtrados con el propósito de eliminar bacterias, seguidos

de tratamientos con ADNAsas y una recuperación final de las VLPs con columnas concentradoras que permite la obtención de cantidades mayores de VLPs y sin sesgos ocasionados por la selección de gradientes.

Usando un proceso a base de filtrados para el aislamiento de VLPs en este estudio no se observaron diferencias significativas en el número de VLPs recuperadas ni en las cantidades de ADN viral obtenidas entre los tiempos preinoculación, semana 10 y semana 17 postinoculación, lo que permitió generar las librerías de secuenciación exitosamente.

Por otra parte, al analizar las muestras secuenciadas se encontró que se presentaron porcentajes altos de lecturas pertenecientes a ADN de ratón (entre el 47 y 54%) en la semana 10 postinoculación, este resultado no se encontró influenciado por la manipulación de las muestras debido a que las extracciones se realizaron de forma individual, posiblemente estas muestras fecales contenían mayor número de células de ratón suspendidas. Se sabe que la proliferación de algunas bacterias Gramnegativas favorecen el aumento del recambio de las células del epitelio intestinal vía producción de AGCC (Park *et al.*, 2016) por lo que no se conoce si se trata de un efecto del trasplante de fagos sobre la microbiota bacteriana de los ratones o de otro acontecimiento.

Finalmente, entre el 24 y 80 % de las lecturas limpias en las diferentes muestras se identificaron como posibles lecturas virales y se utilizaron para continuar con los análisis correspondientes.

- *Fagoma intestinal de ratón con SMet.*

Con los avances en las tecnologías de secuenciación masiva de ácidos nucleicos también se han tenido que esclarecer las vías más apropiadas para realizar los análisis de las secuencias metagenómicas obtenidas. Al estudiar lecturas de fagos, las metodologías mejor aceptadas para identificar a los organismos presentes se basan en realizar ensamblajes metagenómicos que involucran el alineamiento de los fragmentos de ADN secuenciados con el fin de reconstruir la secuencias originales (contigs) o identificar genomas de fagos completos.

De acuerdo con nuestros análisis la mejor vía para conocer el contenido viral intestinal de los ratones con SMet fue el realizar un meta-ensamble a partir de dos ensamblajes generados previamente con las 9 librerías de secuencias de VLPs, armando de esta forma el fagoma intestinal de ratón con SMet que contiene un total 5,498 contigs que integran a genomas o fragmentos de genomas > 2 kb de longitud identificados como no eucariotas, no quiméricos, con posible origen viral y que cumplen los parámetros de cobertura e identidad establecidos.

Estudiando estos datos a nivel de comunidades virales y diversidad β se encontraron cambios en la composicionalidad del fagoma intestinal de los ratones inoculados con VLPs de niños normopeso entre los diferentes tiempos con variaciones importantes tanto inter como intra-grupo.

Además, se observó que la riqueza viral presentó una tendencia a disminuir en la semana 10 postinoculación en comparación del día preinoculación, esta riqueza parece recuperarse en la semana 17 postinoculación mostrando que al final del ensayo, que también es el tiempo de mayor mejoría metabólica; se favoreció la recuperación de ciertos fagos en algunas muestras de la semana 17. La diversidad de los grupos presentó un ligero aumento en las semanas 10 que se mantuvo en la semana 17 postinoculación indicando un aumento en la abundancia de algunos fagos particulares en los periodos finales del ensayo. La abundancia de los fagos suele correlacionar con la abundancia de sus bacterias hospederas por lo que el conocer el comportamiento de la microbiota intestinal bacteriana ayudaría a comprender de manera más precisa los fundamentos de los cambios en el fagoma de los ratones.

Analizando otros estudios de viroma intestinal de ratones se ha observado que los cambios más importantes en cuanto a abundancia y riqueza se presentan en las primeras semanas postinoculación (Reyes *et al.*, 2013), en nuestro estudio no se logra observar este efecto debido a que no se cuenta con información del contenido de fagos en tiempos más cercanos a la administración del tratamiento.

Aproximadamente el 60 % de los contigs virales no lograron ser clasificados en alguna familia viral, resultados que concuerdan con otros estudios de viroma intestinal humano (Minot *et al.*, 2011). Esta sección corresponde a la llamada “materia oscura” microbiana donde se encuentran aquellas secuencias o genomas que no corresponden ninguno de los organismos ya reportados en las bases de datos. Afortunadamente, con la creciente información para las bases de datos virales y la actualización de los procesos bioinformáticos para el estudio del metagenoma viral desconocido se han logrado identificar nuevos fagos intestinales importantes como crAssphage en humanos (Dutilh *et al.*, 2014).

Del 40 % de fagos restantes identificados en el fagoma de ratón algunos pudieron ser clasificados en alguna familia viral conocida. Con mayor presencia se encontraron a los fagos de la familia *Siphoviridae* componiendo un 16 % de los contigs totales, seguidos por la familia *Myoviridae* con un 10 %, además se identificaron fagos de la familia *Podoviridae* con un 1%, éstas tres familias de fagos son las comúnmente encontradas en los estudios de viroma y fagoma intestinal en ratón y humano, aunque *Podoviridae* suele tener mayor presencia en otros fagomas de ratón reportados que las encontradas en este ensayo

(Duerkop *et al.*, 2018). No obstante, la poca presencia en el número de fagos de esta familia podría ser efecto del modelo murino sometido a la enfermedad de SMet.

Por otro lado, se encontraron con muy baja presencia las familias *Herelleviridae*, conocida por incluir fagos que infectan a bacterias del filo *Firmicutes*; y la familia *Inoviridae* que incluye fagos filamentosos que se encuentran asociados con bacterias patógenas de humano como *Escherichia coli* y destacan por no provocar la lisis de su bacteria hospedera, estos fagos se han encontrado como poco abundantes o no se reportan en otros estudios de viroma de ratón.

Al analizar las abundancias relativas de las diferentes familias de fagos presentes no se encontraron cambios significativos a través del tiempo, pero sí se observó que algunos fagos particulares presentaron variaciones en su abundancia. La mayoría de estos fagos sufrieron una disminución en su abundancia a las semanas 10 y 17 al compararse con el día preinoculación y son importantes porque al encontrarse presentes antes del tratamiento corresponden a fagos nativos del ratón con SMet que pudieron verse directamente influenciados en su abundancia por el tratamiento con VLPs o por el tiempo. De forma interesante, en ratones con colitis y en humanos con IBD y colitis ulcerativa se ha observado que la mayoría de los fagos intestinales suelen ser menos abundantes en el estado de salud que en los ratones enfermos (Norman *et al.*, 2015) por lo que se plantea que el mejoramiento de la salud de los ratones con SMet en las semanas 10 y 17 producto de la inoculación con VLPs de niños sanos ayudó a favorecer estas disminuciones en la abundancia de algunos fagos intestinales importantes.

- *Fagoma intestinal de niños normopeso de referencia.*

Como consecuencia de inocular VLPs procedentes de niños normopeso en la microbiota intestinal de los ratones con SMet es necesario analizar si los fagos de humano introducidos permanecen en el intestino del ratón a través del tiempo.

Utilizando los 29,760 contigs de fagos de niños normopeso del estudio de Bikel *et al.*, 2020 en las muestras de ratón, solamente 3,056 contigs tuvieron lecturas positivas pero únicamente 63 contigs cumplieron los parámetros de cobertura mostrando que probablemente los fagos de niños normopeso administrados no permanecieron en el intestino de los ratones al menos en etapas tardías postinoculación. Por otro lado, se debe considerar que los contigs de Bikel *et al.*, 2020 no provienen de las mismas muestras las inoculadas a los ratones así que los contigs de fagos humanos explorados pueden no corresponder del todo a los que se administraron en el tratamiento.

Viendo lo anterior, al analizar el comportamiento de estos 63 fagos en los 3 diferentes tiempos; preinoculación y semanas 10 y 17 postinoculación, se encontró que la diversidad β no presenta una diferenciación significativa en la composición de las muestras para las semanas estudiadas. Sin embargo, la riqueza y la diversidad mostraron un ligero incremento en las semanas 10 y 17 postinoculación.

Analizando las abundancias relativas a nivel de las familias virales donde se incluían estos fagos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas pero se encontraron fagos individuales con cambios diferenciales en su abundancia a las semanas 10 y 17.

Al tratarse de un fagoma que fue introducido se esperaba que los 63 fagos de niños normopeso sólo estuvieran presentes en los días postinoculación, pero estos fagos se encontraron también en el día preinoculación sugiriendo que existen fagos de humano con similitud a fagos de ratón compartidos entre ambos organismos.

-El modelo de ratón con SMet y su respuesta al tratamiento de VLPs.

Aún cuando se presentan diferencias anatómicas y fisiológicas en el ambiente intestinal entre ratones y humanos, se han utilizado modelos de ratón para investigación biomédica en los estudios de microbiota intestinal debido a que son relativamente fácil de manipular y que los géneros bacterianos dominantes en ambos organismos llegan a ser similares, aunque a nivel de especie las diferencias entre microbiota suelen ser más significantes (Nguyen *et al.*, 2015). A nivel de fagos intestinales no existe hasta el momento un estudio claro que compare la composicionalidad del fagoma intestinal de humano con el de ratón. Sin duda, el trasplante de fagos cuenta con un gran potencial para ser utilizado como tratamiento en diferentes enfermedades y las pocas investigaciones que comienzan a utilizar este enfoque han encontrado resultados muy interesantes, p. ej. el contrarrestar la infección ocasionada por la bacteria *C. difficile* (Ott *et al.*, 2017), la de reducción del sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado o SIBO (Lin *et al.*, 2019) o el mejoramiento del peso y tolerancia a la glucosa de ratones con diabetes tipo 2 a partir de tratamiento de fagos (Rasmussen *et al.*, 2020). Notablemente algo que tienen en común los dos últimos estudios es que el inóculo de fagos proviene de ratones donadores para ser administrados en ratones receptores.

Ahora bien, en nuestro análisis se observó que los fagos intestinales pertenecientes a un organismo tan diferente como el humano no permanecen a través del tiempo en el intestino de ratones al ser inoculados. Posiblemente los fagos introducidos se eliminaron del ratón al no encontrar a sus bacterias hospederas donde reproducirse y de aquí surge

una perspectiva de trabajar con ratones receptores que reciban tratamientos de ratones donadores y lograr un ambiente de estudio más controlado.

El fagoma de humano analizado fue muy poco informativo para el proyecto, pero el fagoma nativo del ratón con SMet sí sufrió cambios importantes producto de la alteración del ambiente intestinal post-tratamiento.

Adentrándose en esto, resultados como el realizado por Rasmussen *et al.*, 2020 se observan que la diversidad de fagos intestinales de ratones enfermos con diabetes que recibieron tratamiento a base de fagos de ratones sanos no presenta variaciones significativas al compararse con ratones con dieta normal y dieta alta en grasa, sí bien en los análisis de nuestro proyecto se observan solo ligeros cambios en diversidad y riqueza través del tiempo, estas comparaciones parecen indicar que el fagoma nativo de los modelos de ratón para enfermedades metabólicas no presentan cambios rigurosos en su diversidad cuando se administra un TVF en comparación de las bacterias intestinales que llegan a presentar cambios más significativos, inclusive a tiempos no cercanos a la inoculación. Revisando lo anterior se puede hipotetizar que los efectos de estos tratamientos a base de VLPs se observan de manera más significativa en las comunidades bacterianas que a su vez afectan las poblaciones de fagos presentes en el intestino.

Finalmente, para generar conclusiones precisas acerca del uso de TVF como tratamiento hace falta integrar nuevas investigaciones que atiendan problemáticas de salud, como las enfermedades metabólicas, utilizando estas alternativas a base de fagos que no representan el riesgo de administrar organismos patógenos o multidrogoresistentes en comparación al TMF. De la misma forma el obtener resultados más finos y confiables depende del mejoramiento y desarrollo de herramientas bioinformáticas que garanticen un estudio adecuado del universo de lecturas diferentes que se obtienen a partir del aislamiento de VLPs intestinales.

9. Conclusiones

- El trasplante de fagos provenientes de organismos metabólicamente sanos constituye una opción terapéutica para restablecer la tolerancia a la glucosa en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasa.
- El inóculo de VLPs de humano no influyó significativamente en el número de VLPs fecales recuperadas en las semanas postinoculación con respecto al día pretratamiento.
- Se presentaron tendencias de disminución en la riqueza del fagoma intestinal, sugiriendo una pérdida de especies de fagos y de aumento en la diversidad tras la inoculación, así como del enriquecimiento en la abundancia de algunas especies particulares en las semanas 10 y 17 postinoculación con respecto al día preinoculación.
- Las principales familias de fagos intestinales conocidas no variaron significativamente en su abundancia a través del tiempo pero existen 1,308 fagos individuales con un cambio diferencial en su abundancia a las semanas 10 y 17 postinoculación.
- El fagoma normopeso inoculado no se estableció en el intestino del ratón pero provocó modificaciones en las respuestas metabólicas de los ratones.
- El fagoma intestinal de los ratones con obesidad y SMet es muy distinto en composición al fagoma de niños normopeso en estado de salud por lo que es difícil realizar comparaciones directas.

10. Perspectivas

- Estudiar el fagoma intestinal de los ratones del grupo control para identificar los resultados obtenidos como efecto del tratamiento y no de factores como el tiempo.
- Analizar la microbiota intestinal bacteriana de los ratones para conocer la participación de las bacterias en los resultados metabólicos obtenidos y en la modulación del fagoma intestinal.
- Generar un análisis para identificar las diferentes funciones metabólicas enriquecidas correspondientes a los fagos encontrados y relacionarlo con los cambios metabólicos y de la microbiota en los ratones.
- Analizar el fagoma intestinal en etapas más tempranas después de aplicados los tratamientos para conocer los cambios inmediatos derivados del inóculo.
- Utilizar procedimientos bioinformáticos para estudiar las secuencias desconocidas y realizar la identificación de nuevos fagos o nuevas familias virales.

11. Material suplementario

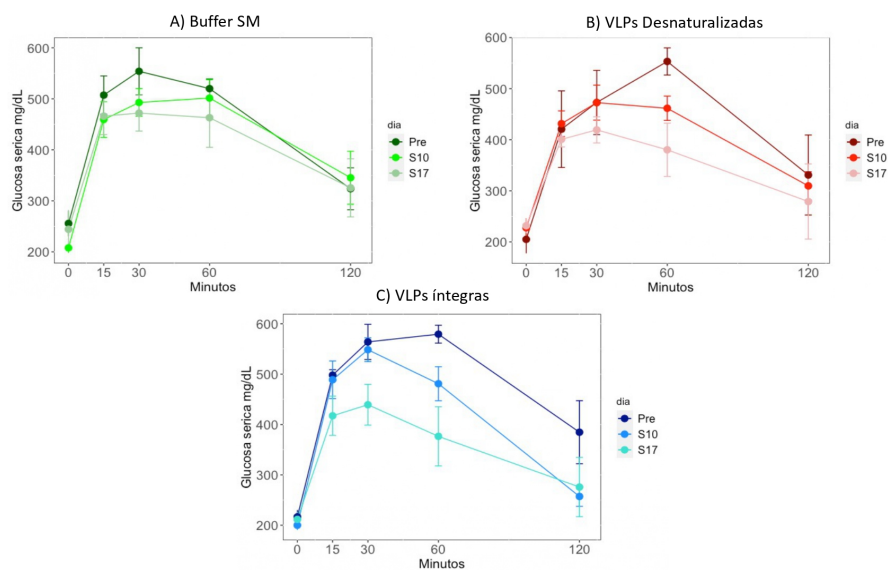


Figura S1. Curvas de tolerancia a la glucosa. Niveles de glucosa sérica de los ratones cuantificados a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de una administración oral de glucosa. Curvas para los grupos estudiados: A) Ratones control inoculados con Buffer SM, B) Ratones inoculados con VLPs desnaturalizadas de niños normopeso y C) Ratones inoculados con VLPs íntegras de niños normopeso. Tiempos estudiados: Preinoculación, Semana 10 postinoculación y Semana 17 postinoculación.

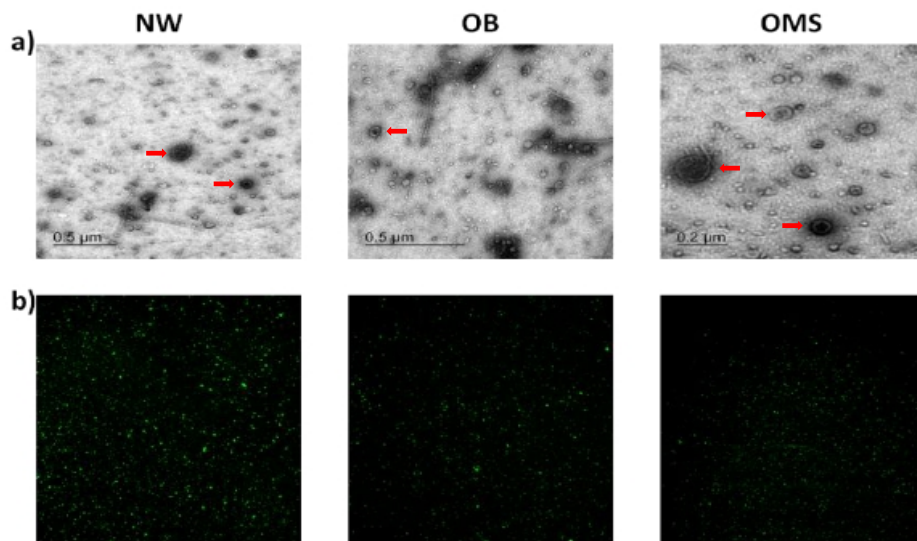


Figura S2 Microscopía de las VLPs intestinales de humano del trabajo de Bikel et al., 2020. a) Microscopía electrónica de transmisión de VLPs fecales. b) Microscopía de epifluorescencia de VLPs fecales. NW = VLPs de humanos normopeso, OB = VLPs de humanos obesos, OMS = VLPs de humanos obesos con síndrome metabólico. Las flechas rojas señalan algunas de las partículas virales identificadas.

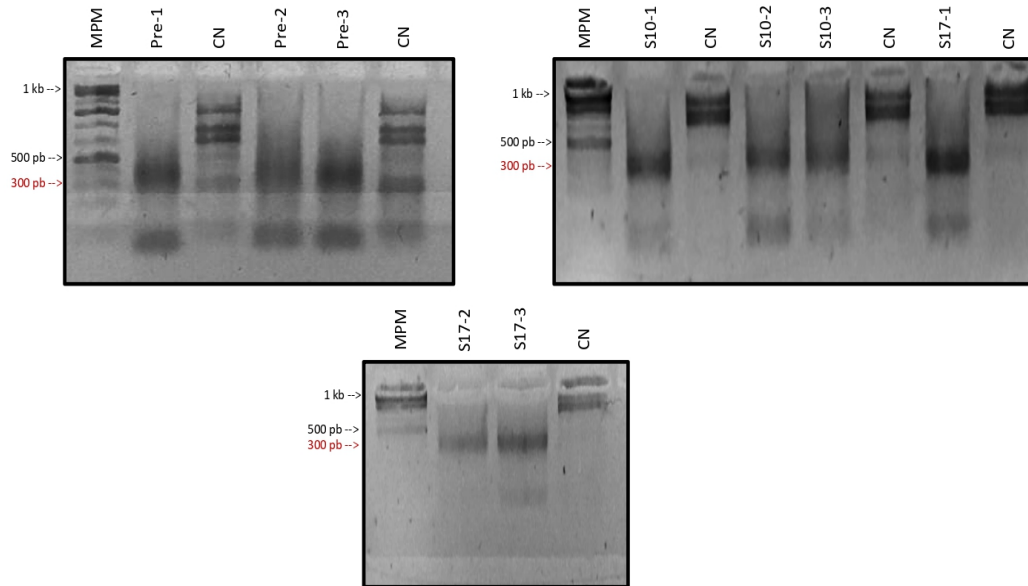


Figura S3. Electroforesis de las 9 librerías de ADN viral. MPM = marcador de peso molecular. CN = Control negativo. Fluoróforo Orange Loading Dye.

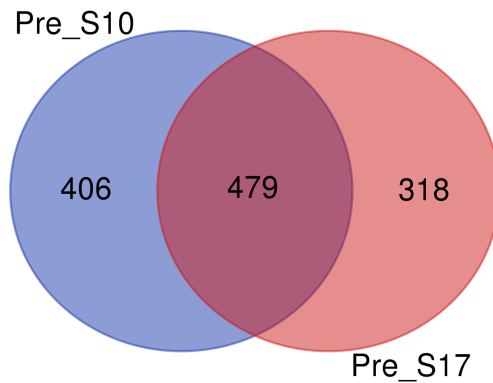


Figura S4. Número de contigs del fagoma intestinal de ratón con abundancia diferencial. Se observaron 406 contigs diferenciales en la Semana 10 con respecto al día pretratamiento, 318 contigs diferenciales en la Semana 17 con respecto al día pretratamiento y 479 contigs diferenciales tanto en la semana 10 postinoculación como en la semana 17 postinoculación.

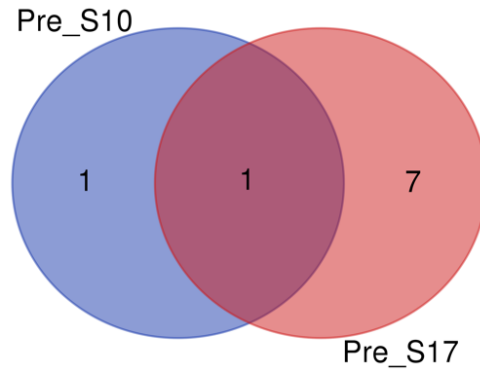


Figura S5. Número de contigs del fagoma intestinal de niños normopeso con abundancia diferencial. Se observó 1 contig diferencial en la Semana 10 con respecto al día pretratamiento, 7 contigs diferenciales en la Semana 17 con respecto al día pretratamiento y 1 contig diferencial tanto en la semana 10 postinoculación como en la semana 17 postinoculación.

12. Referencias bibliográficas

- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JL. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101. Epub 2004 Oct 25. PMID: 15505215; PMCID: PMC524219.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bikel, S., Valdez-Lara, A., Cornejo-Granados, F., Rico, K., Canizales-Quintero, S., Soberón, X., Del Pozo-Yauner, L. and Ochoa-Leyva, A. (2015) Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Comput Struct Biotechnol J*. (Vol. 13, pp. 390-401). <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.06.001>.
- Bikel, S., López-leal, G., Cornejo-granados, F., & Gallardo-, L. (2020). Gut Phageome Analysis Reveals Disease-Specific. Biorxiv.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.
- Brandt, L. J., Aroniadis, O. C., Mellow, M., Kanatzar, A., Kelly, C., Park, T., Surawicz, C. (2012). Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Gastroenterology*, (Vol. 107, pp. 1079–1087). <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.60>
- Breitbart, M., Haynes, M., Kelley, S., Angly, F., Edwards, R., Felts, B., Mahaffy, J., Mueller, J., Nulton, J., Rayhawk, S., Rodriguez-Brito, B., Salamon, P. & Rohwer, F. (2008). Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res Microbiol*. (Vol. 159, pp. 367–373).
- Broecker, F., Klumpp, J., Schuppler, M., Russo, G., Biedermann, L., Hombach, M., Rogler, G., & Moelling, K. (2016). Long-term changes of bacterial and viral compositions in the intestine of a recovered *Clostridium difficile* patient after fecal microbiota transplantation. *Molecular Case Studies*, 2(1), a000448. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000448>
- Brussow, H., Canchaya, C. & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (Vol. 68, pp. 560–602).

- Dabke, K., Hendrick, G., & Devkota, S. (2019, October 1). The gut microbiome and metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI129194>
- Davis, C. (2016) The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutr Today*. (Vol. 51, pp. 167–174). <https://doi.org/10.1097/NT.000000000000167>.
- De Paepe M., Leclerc M., Tinsley C. & Petit M. (2014). Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (Vol. 4). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00039>
- Dion, M., Oechslin, F. and Moineau, S. (2020) Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol.* (Vol.18, pp. 125-138).
- Duerkop, B., Kleiner, M., Paez-Espino, D., Zhu, W., Bushnell, B., Hassell, B., Winter, S., Kyrpides, N. and Hooper, L. (2018). Murine colitis reveals a disease-associated bacteriophage community. *Nat Microbiol.* (Vol. 3, pp.1023-1031). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0210-y>.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., and Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 497–504. doi: 10.1038/nrmicro 3050
- Enault F, Briet A., Bouteille L, Roux S., Sullivan MB. & Petit MA. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *International Society for Microbial Ecology*. (Vol. 11, pp. 237–247)
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT). (2018). Instituto Nacional de Salud Pública. México. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Evia-Viscarra, M., Rodea-Montero, E., Apolinar-Jiménez, E., & Quintana-Vargas, S. (2013) Metabolic syndrome and its components among obese (BMI ≥ 95 th) Mexican adolescents, Pediatric Endocrinology Department, Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío. *Endocrine Connections*. (Vol. 2, pp. 208–215). <https://doi.org/10.1530/EC-13-0057>.
- Fancello L, Desnues C, Raoult D, Rolain JM. (2011). Bacteriophages and diffusion of genes encoding anti- microbial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J Antimicrob Chemother* (Vol. 66, pp.2448–2454).
- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc* 2015; 74:13-22; PMID:25268552; <http://dx.doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Food and drug administration. (2020).

- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Gallardo-Becerra, L., Cornejo-Granados, F., García-López, R., Váldez-Lara, A., Bikel, S., Canizales-Quintero, S., López-Contreras, B., Mendoza-Vargas, A., Nielsen, H. & Ochoa-Leyva, A. (2020). Metatranscriptomic analysis to define the Secrebiome, and 16S rRNA profiling of the gut microbiome in obesity and metabolic syndrome of Mexican children. *Microb Cell Fact.* (Vol. 19) <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01319-y>
- Groota, P., Frissen, M., Clercq, N., & Nieuwdorpa, M. (2017) Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut microbes.* (Vol. 8, no. 3, 253–267). <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1293224>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Harrison, E., Laine, A. L., Hietala, M. and Brockhurst, M. A. (2013). Rapidly fluctuating environments constrain coevolutionary arms races by impeding selective sweeps. *Proc. Biol. Sci.* (Vol. 280).
- Huang, P. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms.* (Vol. 2, pp. 231-237). <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- The GBD 2015 Obesity Collaborators (2015). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine*, 377(1), 13–27. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1614362>.
- John, G. & Mullin, G. (2016). The gut microbiome and obesity. *Curr Oncol Rep.* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1007/s11912-016-0528-7>.
- Kleiner M., Hooper, L. & Duerkop, B. (2015). Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics.* (Vol. 16:7). <https://doi.org/10.1186/s12864-014-1207-4>
- Lai, Z. L., Tseng, C. H., Ho, H. J., Cheung, C. K. Y., Lin, J. Y., Chen, Y. J., Cheng, F. C., Hsu, Y. C., Lin, J. T., El-Omar, E. M., & Wu, C. Y. (2018). Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33893-y>
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19505943; PMCID: PMC2723002.

- Lim, E. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat. Med.* (Vol. 21, pp. 1228–1234).
- Lin, D., Koskella, B., Ritz, N., Lin, D., Carroll-Portillo, A. & Lin, H. (2019). Transplanting Fecal Virus-Like Particles Reduces High-Fat Diet-Induced Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* (Vol. 9).
- Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. A., Wu, G. D., Lewis, J. D., & Bushman, F. D. (2011). The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome research.* (Vol. 21, pp. 1616–1625). <https://doi.org/10.1101/gr.122705.111>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), pp. 10-12. doi:<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Mirzaei, K., & Maurice, F. (2017, June 13). Ménage à trois in the human gut: Interactions between host, bacteria and phages. *Nature Reviews Microbiology.* Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30>
- Modi, R., Lee, H., Spina, S. & Collins, J. (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* (Vol. 499, pp. 219-222).
- Moran-Ramos S, Lopez-Contreras BE, Villarruel-Vazquez R, Ocampo-Medina E, Macias-Kauffer L, Martinez-Medina JN, Villamil-Ramirez H, León-Mimila P, Del Rio-Navarro BE, Ibarra-Gonzalez I, Vela-Amieva M, Gomez-Perez FJ, Velazquez-Cruz R, Salmeron J, Reyes-Castillo Z, Aguilar-Salinas C, Canizales-Quinteros S. Environmental and intrinsic factors shaping gut microbiota composition and diversity and its relation to metabolic health in children and early adolescents: A population-based study. *Gut Microbes.* 2020 Jul 3;11(4):900-917. doi: 10.1080/19490976.2020.1712985. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31973685; PMCID: PMC7524342.
- Nguyen, N., Vieira-Silva, S., Liston, A. & Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research. *Disease Models & Mechanisms.* (Vol. 8, pp. 1-16) <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>.
- Nale, J., Spencer, J., Hargreaves, K., Buckley, AM., Trzepiński, P., Douce, G. & Clokie, M. Bacteriophage Combinations Significantly Reduce *Clostridium difficile* Growth In Vitro and Proliferation In Vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* (Vol. 60, pp. 968-981).
- Norman, J., Handley, S., Baldrige, M., Droit, L., Liu, D., Keller, B., Kambal, A., Monaco, C., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T., McGovern, D., Keshavarzian, A., Mutlu, E., Sauk, J., Gevers, J., Xavier, R., Wang, D., Parkes, M. & Virgin, H. (2015). Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell.* (Vol. 160, pp. 447–460).

- Nutall, FQ. (2015) Body Mass Index. Obesity, BMI and Health: A Critical Review. *Nutr Today*. 2015;50(3):117Y128. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000092>
- Ott, J., Waetzig, H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J., Cassidy, L., Tholey, A. & Fickenscher, H. (2017). Efficacy of sterile fecal filtrate transfer for treating patients with clostridium. *Gastroenterology*. (Vol. 152, pp. 799-811).
- Park, J. H., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., Murata, Y., & Matozaki, T. (2016). Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: Role of short-chain fatty acids. *PLoS ONE*, 11(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156334>
- Peng, Y., Leung, H. C. M., Yiu, S. M., & Chin, F. Y. L. (2012). IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11), 1420–1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
- Peng, Z., Jin, D, Kim, H., Stratton, C., Wu, B., Tang, Y. & Sun, X. (2017). Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. (Vol. 55).
- Perry RJ, Peng, L., Barry, N., Cline, B., Zhang, D., Cardone, R., Petersen, K., Kibbey, R., Goodman, A., and Shulman, G.. Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*. 2016;534(7606):213–217.
- Rasmussen, T., Junker, C., Kot, W., Castro-Mejia, J., Zuffa, S., Swann, J., Hansen, L., Vogensen, F., Hansen, A. & Nielsen, D. (2020) Faecal virome transplantation decrease symptoms of type-2-diabetes and obesity in a murine model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. (Vol. 69, pp. 2122-2130). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320005>
- Reyes, A., Wua, M., McNulty, N., Rohwer, F. and Gordona J. (2013) Gnotobiotic mouse model of phage–bacterial host dynamics in the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (Vol. 110, pp. 20236–20241)
- Reyes, A. et al. Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 11941–11946 (2015).
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0), 1–17. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Rodriguez-Valera, F., Martin-Cuadrado, A., Rodriguez-Brito, B., Pasic, L., Thingstad, T., Rohwer, F. and Mira, A. (2009). Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2009.3489.1>
- Rolain JM, Fancello L, Desnues C, Raoult D. (2011). Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* (Vol. 66, pp. 2444–2447).

- Sanz, Y., Santacruz, A., & Gauffin, P. (2010). Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. In *Proceedings of the Nutrition Society* (Vol. 69, pp. 434–441). <https://doi.org/10.1017/S0029665110001813>.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Seth, R., Maqsood, R., Mondal, A., Bose, D., Kimono, D., Holland, L., Lloyd, P., Klimas, N., Horner, R., Sullivan, K., Lim, E. & Chatterjee, S. (2019). Gut DNA Virome Diversity and Its Association with Host Bacteria Regulate Inflammatory Phenotype and Neuronal Immunotoxicity in Experimental Gulf War Illness. *Viruses*. (Vol. 11). <https://doi.org/10.3390/v11100968>.
- Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011 Mar 15;27(6):863-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026. Epub 2011 Jan 28. PMID: 21278185; PMCID: PMC3051327.
- Schulfer, A., Santiago-Rodriguez, T. M., Ly, M., Borin, J. M., Chopyk, J., Blaser, M. J., & Pride, D. T. (2020). Fecal Viral Community Responses to High-Fat Diet in Mice. *MSphere*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msphere.00833-19>
- Silveira, C. & Rohwer, F. (2016). Piggyback-the-Winner in host-associated microbial communities. *Biofilms and Microbiomes*.
- Soverini, M., Turrone, S., Biagi, E., Quercia, S., Brigidi, P., Candela, M., & Rampelli, S. (2017). Variation of carbohydrate-active enzyme patterns in the gut microbiota of Italian healthy subjects and type 2 diabetes patients. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02079>.
- Tang, W., Wang, Z., Levison, B., Koeth, R., Britt, E., Fu, X., Wu, Y. and Hazen, S. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. (Vol. 368, pp. 1575–1584).
- Thingstad, T. (2000). Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr*. (Vol. 45, pp. 1320–1328).
- Toor, D., Wasson, M., Kumar, P., Karthikeyan, G., Kaushik, M., Goel, C., Singh, S., Kumar, A. and Prakash. (2019). A. Dysbiosis Disrupts Gut Immune Homeostasis and Promotes Gastric Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* (Vol. 20). <https://doi.org/10.3390/ijms20102432>.
- Turnbaugh, P., Ley, R., Mahowald, M., Magrini, V., Mardis, E. and Gordon J. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006. (Vol. 444, pp.1027-1031).
- Turnbaugh, O., Ridaura, V., Faith, J., Rey, F., Knight, R. and Gordon, J. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic

- Mice. *Sci Transl Med.* 2009 November 11; 1(6): 6ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3000322.
- Wang J., Lang T., Shen J., Dai J., Tian L. y Wang X. (2019). Core Gut Bacteria Analysis of Healthy Mice. *Front Microbiol.* (Vol. 10. Pp. 887)
- Wang, J., Ma, J., Cheng, Z., Meng, X., You, L., Wang, M., Zhang, X., & Wang, Y. (2016). A CRISPR evolutionary arms race: Structural insights into viral anti-CRISPR/Cas responses. *Cell Research*, 26(10), 1165–1168. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.103>
- Wang, S., Huang, M., You, X., Zhao, J., Chen, L., Wang, L., Luo, Y., & Chen, Y. (2018). Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 2–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31353-1>
- Weinbauer, G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* (Vol.28, pp.127-181). <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>.
- Wences, A.H., Schatz, M.C. Metassembler: merging and optimizing de novo genome assemblies. *Genome Biol* 16, 207 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0764-4>
- WHO. (2018). World obesity report. https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *BioRxiv*, 1–13. <https://doi.org/10.1101/762302>
- Zhuang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhuang, J., Li, Q., & Feng, Z. (2019). Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.10.002>