



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Impacto de la sobrenutrición materna durante la gestación y vida adulta de la descendencia sobre el perfil metabólico y bacteriano intestinal del conejo europeo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Vidblain Prieto Ibañez

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Ana María Salazar Martínez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Sofía Morán Ramos
[Instituto Nacional de Investigaciones Genómicas.](#)
Dra. Ivette Caldelas Sánchez
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2022



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.

Datos sinodales

PRESIDENTE	Canto Cetina Ileana Patricia (FM)
VOCAL	Díaz Muñoz Mauricio (INeurobiol)
VOCAL	Zambrano González Elena (INCMNSZ)
VOCAL	Cerbón Cervantes Marco Antonio (FQ)
SECRETARIO	Torres y Torres Nimbe (INCMNSZ)

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi comité tutorial, la Dra. Ana María Salazar Martínez, por sus comentarios tan certeros y enriquecer el proyecto con sus puntos de vista, a la Dra. Sofía Morán Ramos por el apoyo en todo momento, resolver mis dudas tanto experimentales como en el análisis estadístico acerca del proyecto y la Dra. Ivette Caldelas Sánchez por su dedicación, devoción y por ser la guía durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana María Salazar Martínez por su confianza, por su apoyo y entusiasmo el cual me abrió el panorama en el mundo de la investigación.

A la Dra Sofía Morán Ramos y su grupo de trabajo realizado en la Unidad de Genómica de Poblaciones aplicada a la Salud en el Instituto de Investigaciones Genómicas (INMEGEN), por el tiempo y carisma en el proceso de secuenciación del gen biomarcador del perfil bacteriano. Lic. Regina Flores López, por su apoyo en los análisis bioinformáticos.

A la Dra. Ivette Caldelas Sánchez por alentarme en el ámbito científico, a ser perseverante y hacer las cosas lo mejor posible. Por orientarme en todo momento y poder fortalecer mi carrera profesional.

A la M. En C. Erika Navarrete Monroy por su apoyo técnico para la realización de la parte experimental de este proyecto. Por apoyarme en el manejo de las muestras.

La M.V.Z. Georgina Díaz Herrera por su apoyo para el manejo y obtención de muestras en los lagomorfos.

Agradezco por el financiamiento para poder llevar a cabo el proyecto, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM, proyecto PAPIIT IN216822 y al Programa Institucional de Obesidad y Diabetes del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Así mismo quisiera agradecer al Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM. Por brindarme el espacio, que me ayudo a familiarizarme en el ambiente de investigación y por propiciar un ambiente enriquecedor para mi formación profesional.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado durante el tiempo de realización de mi maestría con número de CVU: 1084868

Mis agradecimientos se hacen extensivos a mis compañeros de laboratorio, al M en C. Juan Pablo Ochoa Romo por su tolerancia y entusiasmo en los procesos bioinformáticos, a la M en N. Carolina Cano Hernández y Fátima Ramírez por apoyarme con sus críticas académicas y conocer los diferentes puntos de vista.

Asimismo, quisiera agradecer a la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por apoyarme en resolver mis dudas sobre procedimiento de laboratorio. Admirable su entusiasmo en el área de investigación.

Dedicatorias

Quiero agradecer este trabajo a mis padres Norma Ibañez Ledesma y Rigoberto Prieto Pacheco, por ser mi parte motora, mi pulso y motivación para seguir en mi preparación profesional y hacerme ver que todo lo que me proponga lo puedo lograr con dedicación. Mamá gracias por escucharme cuando lo necesitaba y tus consejos como gran ser humano. Papá gracias por tu apoyo incondicional y motivarme cuando es necesario. Los amo infinitamente.

A mis abuelos Imelda Ledesma y Fulgencio Ibañez por su cariño incondicional, gracias por tolerar mi ausencia en las reuniones.

A mi hermano Alberto Prieto Ibañez por brindarme consejos y motivación para seguir creciendo profesionalmente. A mi primo Ángel Yubán Ibañez Millán por tu disposición y ayuda con tus diseños de imágenes.

A Nadia Estefanía Álvarez Chávez por las platicas académicas llenas de emoción, por tus consejos tan certeros en la parte bioinformática, por tu paciencia y por la ayuda infinita. Gracias por tu presencia en mi vida.

ÍNDICE

	Página	
1	Introducción	1
1.1	Síndrome metabólico	1
1.1	Criterios diagnóstico del síndrome metabólico	2
1.2	Origen prenatal de la Salud y enfermedad	3
1.2.1	Metabolismo materno fetal durante la gestación.....	4
1.2.2	La programación epigenética fetal	5
1.3	Microbiota intestinal	7
1.3.1	Relación entre la microbiota intestinal y los procesos metabólicos del huésped	14
1.3.2	Ontogenia de la Microbiota Intestinal	16
1.4	El conejo europeo como modelo para los estudios metabólicos y transgeneracionales	20
2	Antecedentes	20
3	Hipótesis	22
4	Objetivo General	22
4.1	Objetivos específicos	22
5	Material y métodos	22
5.1	Hembras pie de cría (F0)	23
5.2	Descendencia (F1) y reto metabólico	24
5.3	Obtención de muestras	25
5.4	Determinaciones metabólicas	25
5.5	Determinación microbiota intestinal	25
5.6	Análisis bioinformático	28
6	Resultados	30
6.1	Peso corporal	30
6.2	Ingesta de alimento y agua	31
6.3	Perfil metabólico	33
6.4	Perfil bacteriano intestinal: Diversidad α	35
6.5	Perfil bacteriano intestinal: Diversidad β	36
6.6	Perfil bacteriano intestinal: Abundancia relativa	37
6.7	Perfil bacteriano intestinal: Bacterias diferencialmente abundantes	41
6.8	Perfil bacteriano intestinal: Alteraciones en abundancia relativa	44

6.9	Correlación de los perfiles bacteriano intestinal y metabolismo energético	47
7	Discusión	49
8	Conclusiones	54
9	Perspectivas	54
10	Referencias bibliográficas	55
11.1	Anexo 1. Composición nutrimental de las dietas	65
11.2	Anexo 2. Descripción de los oligos forward y reverse en la primer PCR	66
11.3	Anexo 3. Descripción de los oligos forward y reverse en la segunda PCR	67
11.4	Anexo 4. Condición de los conejos europeos	68
11.5	Anexo 5. Diversidad α	69
11.6	Anexo 6. Diversidad β	71
11.7	Anexo 7. Abundancia relativa	73
11.8	Anexo 8. Correlación de datos	75

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease
GLU	Glucosa
COL	Colesterol
HDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
LDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
TG	Triglicéridos
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
SMet	Síndrome metabólico
OMS	Organización mundial de la salud
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
IMC	Índice de masa corporal
RI	Resistencia a la insulina
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
CC	Índice cintura cadera
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
DNAMT	DNA metiltransferasas
SAM	S-adenosilmetionina
LPS	Lipopolisacáridos
MI	Microbiota intestinal
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PYY	Neuropéptido YY
TLR4/9	Receptores tipo Toll 4/9
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
PGC1a	Proliferador de peroxisomas coactivador alfa
MUC2	Glicoproteína secretora Mucina 2
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
TJ	Uniones estrechas intestinales
AJ	Uniones adherentes
JAM	Molécula adherente de unión
IgA	Inmunoglobulina A
LP	Lámina Propia
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
NLRP	Proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina
IL-18	Interleucina 18
QIIME	Quantitative insights into microbial ecology
PERMANOVA	Permutational analysis of variance

Resumen

Investigaciones en el campo de biología del desarrollo han evidenciado que las enfermedades crónicas no transmisibles, como la cardiopatía, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial, el síndrome metabólico, se originan en las primeras etapas del desarrollo como la gestación e infancia, tales evidencias son apoyadas por la hipótesis conocida hoy en día como Orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad (Developmental Origins of Health and Disease -DOHaD-).

Establecer el impacto del consumo materno de las dietas desequilibradas sobre la salud de la descendencia es de suma relevancia, debido al incremento en la incidencia de sobrepeso y obesidad materna en nuestro país. El consumo de estas dietas puede generar adaptaciones en el feto, incluyendo adaptaciones metabólicas y epigenéticas. Estas adaptaciones prepararán a la descendencia en la vida postnatal, predisponiéndolo a desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles en la vida adulta.

El presente trabajo determinó el efecto que tiene el consumo de dietas desbalanceadas durante la gestación, así como tener una segunda exposición por parte de la descendencia en la vida adulta en el conejo europeo, en el perfil metabólico y bacteriano intestinal, ya que estudios sugieren que la alteración de la microbiota intestinal está relacionada con alteraciones metabólicas en el huésped.

Se demostró que el consumo de una dieta desbalanceada durante la gestación, así como el consumo directo de la misma, tienen efectos significativos en las concentraciones séricas de los analitos involucrados en el metabolismo energético tales como GLU, COL, HDL, LDL, TG y NEFA de la descendencia en la vida adulta. Adicionalmente, también fueron identificadas alteraciones en el perfil bacteriano intestinal, tanto en la diversidad y promoviendo la abundancia de bacterias pertenecientes al *Filo* Firmicutes y Proteobacterias, generando un desequilibrio conocido como disbiosis intestinal relacionado con el síndrome metabólico. Además, se identificaron seis bacterias que se correlacionaron con los analitos energéticos y que responden a la sobrenutrición materna, programación metabólica y el consumo directo de la dieta desequilibrada. Tanto la dislipidemia como la disbiosis intestinal provocados por el consumo de la dieta desbalanceada, que se vieron exacerbadas en la descendencia provenientes de madres sobrenutridas, repercutió en el fenotipo generando síndrome metabólico.

Introducción

1. Síndrome metabólico

Raven y colaboradores (1988) acuñaron el término síndrome X para referirse al conjunto de anormalidades metabólicas observadas en pacientes con diabetes tipo 2 (Rave, et al, 1988). El síndrome X, incluye anormalidades tales como: hipertensión arterial, dislipidemia, aumento del tejido adiposo visceral y resistencia a la insulina, siendo este último de acuerdo con los autores el principal mecanismo desencadenante de este síndrome, considerado como un factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles, como es el caso de las enfermedades cardiovasculares (ECV).

En 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió al síndrome metabólico (SMet) al conjunto de anormalidades metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles. Los componentes del SMet son:

- a) Resistencia a la insulina, la cual se define clínicamente como la incapacidad de producir insulina endógena para aumentar la captación y utilización de glucosa en un individuo (Lebovitz, 2001), diagnosticada si se presenta alteraciones en la glicemia en ayuno ≥ 100 mg/dl o en presencia de diabetes mellitus tipo 2.
- b) Obesidad, diagnosticada por el índice elevado de masa corporal.
- c) Hiperlipidemia, se presenta cuando hay hipertrigliceridemia y baja concentraciones de lipoproteínas/colesterol de alta densidad HDL-c.
- d) Hipertensión arterial, se presenta cuando hay presión sanguínea $\geq 140/90$ mmHg.
- e) Microalbuminuria, cuando hay excreción urinaria persistente de albúmina en el rango de 20- 200 μ g/minuto o de 30-300 mg/24 horas (Rochlani, et al., 2017).

Diversas organizaciones han propuesto criterios para el diagnóstico del SMet, en la actualidad se ha llegado al consenso de que se debe presentar al menos 3 características para considerar la presencia de SMet. En la Tabla 1 se resume algunas de éstas.

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT 2018), la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad se ha incrementado de manera acelerada, de tal forma que el 76.8% de la población adulta del sexo femenino entre 20 y 40 años, es decir, mujeres en etapa fértil presentan alguna de estas condiciones. Adicionalmente, de acuerdo con la OMS, estas condiciones están relacionadas con el desarrollo del SMet, el cual está íntimamente relacionada con la transición nutricional.

El modelo propuesto por Popkin y Gordon (2004) considera que ha ocurrido una transición nutricional, el cual considera tanto aspectos cuantitativos y cualitativos. Los cambios cuantitativos se refieren a los cambios en los patrones de alimentación con un consumo elevado de alimentos que tienen elevada densidad energética y una disminución en la ingesta de hidrato de carbono complejos, acompañado de inactividad física. Los aspectos cualitativos, como la adquisición monetaria y el nivel educativo, se refieren a cambios que inciden en el aumento de peso corporal y

generación del síndrome metabólico, con un concomitante incremento de enfermedades no transmisibles (Popkin y Gordon 2004).

Tabla1. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico. Tomado de Julibert, 2020.

IMC. Índice de masa corporal, HDL-c. Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, IFG. Glucosa en ayunas alterada, IGT. Intolerancia a la glucosa, IR. Resistencia a la insulina, DMT2, Diabetes Mellitus tipo 2, TG triglicéridos, CC circunferencia cintura.					
Medida clínica	Organización mundial de la Salud (WHO) 1998.	Grupo Europeo de el estudio de resistencia a la insulina 1999.	Panel de tratamiento de adultos III del Programa Nacional de Educación sobre el colesterol 2001	Diabetes Internacional Federación 2005	Asociación Americana del Corazón 2005.
Criterios	IR + cualquier otro 2	IR + cualquier otro 2	Cualquiera 3 de 5	WC + cualquier otro 2	Cualquiera 3 de 5
Resistencia a la insulina	IGT/ IFG IR	Insulina plasmática > percentil 75	-	-	-
Glicemia	IFG/IGT/DMT2	IFG/IGT	>110mg/ dl (incluye diabetes)	>100 mg/dl	> 100 mg /dl (incluye diabetes)
Dislipidemia	TG > 1.69 mmol/L y HDL-c	TG > 1.69 mmol/L y HDL-c	TG > 1.69 mmol/L	TG > 1.69 mmol/L	TG > 1.69 mmol/L
Presión sanguínea	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg + medicamentos hipertensivos	≥ 130/85 mmHg + medicamentos hipertensivos	≥ 130/85 mmHg + medicamentos hipertensivos	≥ 130/85 mmHg + medicamentos hipertensivos
Obesidad	Proporción cintura, cadera Hombres ≥ 0.9 Mujeres ≥ 0.85 IMC ≥ 30 kg/m ²	Circunferencia cintura Hombres ≥ 94 cm Mujeres ≥ 88 cm	Circunferencia cintura Hombres ≥ 102 cm Mujeres ≥ 88 cm	Circunferencia cintura ≥ 94 cm	Circunferencia cintura Hombres ≥ 102 cm Mujeres ≥ 88 cm
Otro	Microalbuminuria	-	-	-	-

Reportes recientes indican que, en nuestro país, desde el año 1961, el patrón de alimentación ha cambiado debido al incremento de consumo de alimentos de bajo costo pero con contenido energético elevado, causado por el aumento en el precio de alimentos de canasta básica (Moreno, 2014). Se ha sugerido que los estratos de menor ingreso monetario se inclinan a la selección de estos alimentos, ya que con ellos logran reducir la sensación de hambre. Mientras que, en los estratos de mayor ingreso monetario, existe mayor posibilidad de adquirir una

amplia variedad de alimentos (Bertran, 2006). Por lo que se ha demostrado que existe una estrecha relación la capacidad adquisitiva con la presencia de obesidad y su concomitante desarrollo de SMet.

Según datos de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos en los Hogares del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2012) la disponibilidad total de energía aumentó de 2316 Kcal/persona/día en 1961, a 3146 Kcal en 2009. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), estos cambios en la ingesta calórica se deben a que la energía derivada de los cereales, verduras y leguminosas se redujo considerablemente, mientras de manera simultánea la energía procedente de azúcares, alimentos de origen animal y grasas vegetales aumentaron por su alta palatabilidad (Moreno, 2014).

Estudios realizados en humanos y en modelos experimentales sugieren que el SMet tiene un origen multifactorial, en donde el medio ambiente y particularmente la dieta, tiene un efecto relevante en la etiología de este síndrome. Adicionalmente, se sabe que también están involucrados cambios en la regulación epigenética en donde las alteraciones metabólicas pueden ser heredados transgeneracionalmente (Basu, et al., 2019).

2. Orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad

El concepto de los orígenes en el desarrollo de salud y la enfermedad, Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), propone que algunas enfermedades crónicas no transmisibles como la cardiopatía, la diabetes mellitus tipo 2, el accidente cerebrovascular, la hipertensión arterial se originan en las primeras etapas del desarrollo, tales como la gestación e infancia (Barker and Osmond, 1986).

La hipótesis de DOHAD propuesta por Barker (2004) ha sido ampliamente aceptada y corroborada por investigaciones en el campo de biología del desarrollo. Esta hipótesis establece que la programación metabólica fetal prepara a la descendencia para las condiciones postnatales, tomando en cuenta el balance energético al que se expuso el feto durante el periodo prenatal. Se ha demostrado que la restricción calórica durante la gestación produce en la descendencia un bajo peso al nacer, así como en la vida adulta presentan mayor susceptibilidad a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial (Barker, et al., 1989). La sobrenutrición materna durante la gestación también puede provocar bajo peso al nacer y predispone a la descendencia a desarrollar dislipidemia (Li M., Slobododa and Vickers, 2011).

El término de programación metabólica fetal hace referencia a los estímulos o las señales metabólicas y hormonales, que provocan cambios generalizados y permanentes en la estructura de los órganos, la composición corporal, modifican las respuestas endócrinas y metabólicas en la descendencia durante la gestación, periodo crítico de desarrollo embrionario, cuando ocurre la organogénesis fetal, caracterizado por el desarrollo de todos los órganos del embrión a partir de los primeros tres tipos celulares pluripotentes derivados del blastocisto; el ectodermo, asociado al desarrollo de epitelio neural, ganglios embrionarios y epitelio escamoso estratificado, el mesodermo implicado en el desarrollo de cartílago, hueso, músculo

liso y músculo estriado y el endodermo, involucrado en el desarrollo del epitelio intestinal (Fall and Kumaran, 2019, Slack, 2008, Thompson et al, 1998). Este concepto establece que, durante el desarrollo, si hay una asignación de energía a un rasgo, por ejemplo, el desarrollo del cerebro necesariamente reduce la asignación a uno o más rasgos, como los procesos de reparación de tejidos (Barker, et al., 2002). Los recién nacidos con bajo peso al nacer, debido a una menor exposición a energía calórica durante la gestación, puede provocar adaptaciones que los hacen susceptibles al desarrollo de enfermedades no transmisibles en la vida adulta (Barker, 1995). Un posible mecanismo asociado a estos cambios son los niveles de hormonas y de metabolitos circulantes, a los que fueron expuestos la descendencia in útero. Por ejemplo la desnutrición calórica materna durante la gestación podría generar una respuesta adaptativa fetal, en la cual las concentraciones de glucosa en sangre sean reguladas con el fin de mantener la demanda energética del cerebro, pero a expensas del transporte de glucosa hacia los músculos, afectando el crecimiento y desarrollo muscular, lo cual podría tener como desenlace metabólico a largo plazo el desarrollo de resistencia a la insulina (Phillips, 1996).

Durante el periodo prenatal, la pre-implantación; momento que abarca las remodelaciones morfológicas, estructurales y epigenéticas que ocurren en el embrión justo antes de la implantación en el útero, juega un papel clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas de la descendencia (Peral, et al. 2022). En este periodo, la placenta es un tejido endócrino dinámico que actúa como el intermediario de las señales entrantes y salientes desde los compartimientos materno y fetal. La salud del útero y de la placenta son factores importantes para el correcto crecimiento y desarrollo fetal, actuando para comunicar entre el estado nutricional materno y las alteraciones metabólicas fetales (Goldfrey y Barker, 1996, Fernández, et al, 2019). Existen algunos factores bien establecidos que influyen en la programación metabólica, como lo son el metabolismo durante la gestación y mecanismos epigenéticos.

2.1 Metabolismo materno fetal durante la gestación

Durante la gestación ocurren cambios importantes a nivel metabólico, los cuales tienen una dinámica y temporalidad precisa, por lo que diferentes alteraciones importantes pueden trastocar esta regulación fina y tener como consecuencias importantes tanto para la madre, como para la descendencia (Liang, et al., 2020).

El sistema circulatorio materno-fetal están en contacto a través de la placenta, transportando moléculas bioactivas como hormonas esteroideas, macronutrientes y ácidos nucleicos circulantes, cuyas concentraciones se alteran a medida que avanza la gestación (Koh, et al., 2014). Se ha sugerido la existencia de dos etapas metabólicas durante la gestación, la primera etapa abarca los dos primeros trimestres de la gestación y se caracteriza por una condición predominantemente anabólica, en la que la secreción de insulina permite la acumulación de grasa corporal materna. Se ha reportado en modelos murinos, que el metabolismo de lípidos maternos, la acumulación de grasa corporal se debe a la hiperfagia y el aumento de la lipogénesis, así como la disminución de la actividad de la lipasa hepática (Zambrano, et al., 2016). Durante la segunda etapa, la cual abarca el último

trimestre de la gestación, se caracteriza por un estado de resistencia a la insulina para dirigir la energía materna a las necesidades requeridas por el feto, en el cual la glucosa es el sustrato energético más importante en donde el feto utiliza más del 50% del recambio total de glucosa materna. Respecto al metabolismo de lípidos se reduce la captación de triglicéridos circulantes y hay un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo (Zambrano, et al., 2016). Cuando la madre presenta sobrepeso u obesidad, en el cual se posee mayor suministro de energía y tasa metabólica durante el embarazo, la resistencia a la insulina fisiológica observada al final del embarazo es más pronunciada. Esta condición en particular, exponen al feto a concentraciones elevadas tanto de glucosa, como de lípidos, provocando efectos adversos en el feto, debido a que los niveles altos de glucosa sistémicos producen una disminución en la oxidación mitocondrial en placenta de ácidos grasos por la inhibición de carnitina palmitotransferasa 1 (CPT-1), aumentando la acumulación de triglicéridos en la placenta, lo cual se ha asociado con la presencia de diabetes mellitus gestacional (Visiedo, et al., 2013).

En el caso de una restricción calórica materna produce una disminución en la expresión de los receptores hormonales de la insulina, la leptina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), los cuales están involucrados en el transporte de nutrientes de la madre hacia el feto a través de la placenta, alteración que es evidente en el sincitiotrofoblasto, en específico en la membrana plasmática de microvellosidades que mira hacia la madre, disminuyendo la actividad transportadora de aminoácidos en las células trofoblásticas (Large y Powell, 2012).

Esta disminución de receptores debido a la exposición fetal a una dieta restrictiva, se asocia a un incremento de la resistencia a la insulina y leptina, así como al aumento del riesgo de desarrollar enfermedad crónica no transmisible en la vida posnatal del individuo, en particular durante la edad adulta (Kirk, et al., 2009). Por consiguiente, el consumo de una dieta desequilibrada durante la gestación puede provocar alteraciones en el medio intrauterino o del transporte de nutrientes de la madre hacia el feto a través de la placenta y afectar el adecuado desarrollo fetal. Lo cual evidencia que un adecuado estado nutricional materno durante la gestación resulta fundamental para propiciar un ambiente intrauterino favorable para el adecuado desarrollo fetal y metabólico de la descendencia.

2.2 La programación epigenética fetal

La epigenética se define como el estudio de los cambios que ocurren en la función de un gen que son heredables, aunque reversibles, sin causar algún cambio en la secuencia de DNA. Este mecanismo se basa en estímulos ambientales y genéticos, y promueve patrones de expresión genética, a corto, mediano y largo plazo (Dupont, et al., 2009). En la actualidad los tres mecanismos epigenéticos más estudiados y conocidos son las modificaciones postraduccionales de histonas, la metilación del DNA y los microRNA (Zhu, et al., 2019).

La metilación del DNA tiene una influencia en la expresión génica al controlar la facilidad de acceso de los modificadores de histonas, los factores de transcripción y la maquinaria transcripcional a la cromatina (Kovachev, et al., 2007). Enzimas específicas, como la DNA metiltransferasas (DNAMT) son las responsables de regular la expresión génica y también de catalizar la interacción con los factores de

transcripción. Una característica que tienen las DNAMT es que pueden tener accesibilidad a los metabolitos provenientes de los nutrientes. Estos nutrientes tienen la capacidad de ser influenciados por ciertas actividades del metabolismo por parte de la microbiota intestinal, como síntesis de metabolitos, como el folato, colina, vitamina B12 y betaína que tienen la capacidad de controlar el epigenoma al tener lugar en la interacción de una molécula de un carbono (Kovacheva, et al., 2007). Estos metabolitos tienen la función de donar un grupo metilo específico como el 6-metiltetrahidrofolato, necesario para la creación de S-adenosilmetionina (SAM) indispensables en los procesos de metilación del DNA (Crider, et al., 2012). Además, se ha reportado vías metabólicas por el cual se puede generar el SAM a partir del ATP, por ejemplo, la ribosa derivada de la vía pentosa fosfato respalda sinérgicamente la síntesis de ATP *de novo* que contribuye en la generación de SAM a través de la integración en el ciclo de la metionina (Yu, et al, 2019).

Recientemente se ha postulado la hipótesis de la programación fetal, la cual propone que puede haber eventos durante la vida intrauterina que provocan también enfermedades neurológicas en la vida postnatal que pueden originarse a partir de eventos de programación relacionados con genes de los progenitores, independientemente del genoma fetal (Fig. 1).

Preston y colaboradores describieron que ante el consumo de dietas alta en lípidos durante la gestación por parte de la madre, se incrementan los niveles de los ácidos grasos circulantes por encima de las concentraciones fisiológicas normales, ocasionando hiperlipidemia e hiperinsulinemia fetal provocando alteración en la descendencia a nivel cardíaco, con regulación negativa de la vía PI3K/AKT activada por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y regulación positiva del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas coactivador alfa (PGC1a), lo que provoca una remodelación del transcriptoma cardíaco (Preston, et. al., 2020).

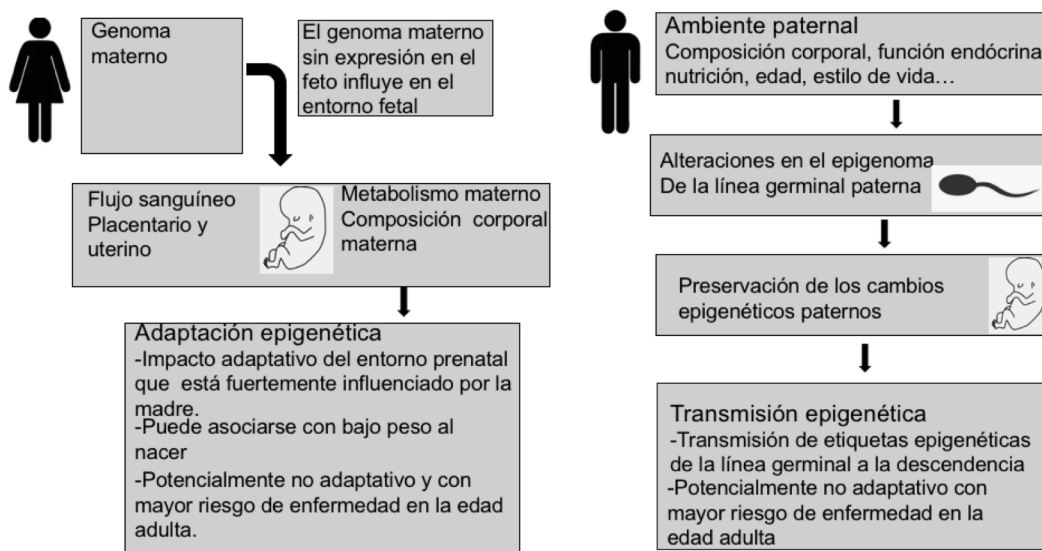


Figura 1. La hipótesis de la programación fetal propone que la programación fetal induce eventos durante la vida intrauterina y que provocan no solo enfermedades

cardiovasculares sino también neurológicas en la vida posterior podría originarse a partir de eventos de programación relacionados con genes maternos y paternos que afectan el fenotipo fetal independientemente del genoma fetal (Modificado de B. Hocher, et al 2014).

En los últimos años se ha reconocido que los mecanismos epigenéticos operan en la interface entre la microbiota intestinal y el genoma de las células epiteliales (Bergman, et al., 2020). Además, investigaciones apuntan a que la microbiota intestinal parecer tener un papel fundamental en alteraciones metabólicas.

3. Microbiota intestinal

El término de microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado (Icaza, 2013).

Mientras que el término microbioma hace referencia al total de los genes y metabolitos de los microorganismos que conforman o que están presentes en el ser humano, incluyendo en el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario, la cavidad oral, el tracto nasofaringe, el tracto respiratorio y la piel (Icaza, 2013). El microbioma se puede subdividir en cuanto a los integrantes de los microorganismos, denominado como bacterioma al contenido genético de las bacterias, micobioma al contenido genético de las levaduras y viroma al contenido genético de los virus que alberga la microbiota (Rowan, et al., 2019).

El huésped junto con sus simbioses se denomina holobiontes y su genoma colectivo se le denomina hologenoma (Adak y Khan, 2019). Varias investigaciones como el Proyecto del Microbioma Humano y el Metagenoma del Tracto Intestinal Humano analizaron cuatro sitios de colonización microbiana: la cavidad oral, la intestinal, la vaginal y la cutánea. De estos sitios, la microbiota intestinal ha tenido particular atención por la actuación en los procesos de salud-enfermedad del huésped (Adak y Khan 2019).

La microbiota intestinal hace referencia al conjunto de los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal. Se estima que la microbiota intestinal contiene más de 1000 billones de bacterias y más de 1000 especies diferentes (Koboziev, 2014), lo que supone un contenido genético estimado entre 10-100 veces superior al genoma humano (Bull y Plummer, 2014).

El tracto gastrointestinal se divide anatómicamente en estómago, intestino delgado y grueso, el microambiente característico de cada compartimento, como los niveles de oxígeno, temperatura y pH, selecciona el crecimiento de una microbiota específica (Adak y Khan, 2019). El microambiente intestinal favorece el crecimiento de bacterias, predominantemente de siete divisiones taxonómicas, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia y Cyanobacteria. Dentro de éstas, los Bacteroidetes y los Firmicutes constituyen más del 90% de la microbiota intestinal, en el estómago se encuentran predominantemente las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, en el intestino delgado y en el intestino grueso Bacteroidetes y Firmicutes (Fig. 2). Además, este fino equilibrio Bacteroidetes/Firmicutes es considerada como factor pronóstico de la salud y la enfermedad (Backhed, et al 2005).

Adicional a la clasificación taxonómica, la microbiota intestinal se puede clasificar en Enterotipos: en donde el Enterotipo 1 se caracteriza por el predominio de Bacteroides con actividad sacarolíticas y proteolíticas, y el Enterotipo 2 se caracteriza por predominio de Prevotella con actividad degradante de glicoproteína de la mucina; mientras que el Enterotipo 3 se caracteriza por el predominio de Ruminococo con actividades degradantes de mucina y transporte de azúcar a través de membrana (Arumugan, et al., 2011). Estudios han analizado las asociaciones de los hábitos dietéticos con dos enterotipos, el consumo prolongado de proteína y grasa animal promueve la presencia de Enterotipo 1 y 3, mientras que el consumo de una dieta de carbohidratos refinados promueve la prevalencia de Enterotipo 2 (Wu, et al, 2011).

El adecuado funcionamiento de la microbiota intestinal, depende en gran medida de la integridad de la mucosa, la cual está constituida en un 90-95% de agua, electrólitos, 1-2% de lípidos y 1-5% proteínas (Paone y Cani, 2020). El moco intestinal depende de las proteínas que se denominan mucinas, las cuales son los componentes estructurales y funcionales. Las mucinas son una familia de proteínas glicosiladas que consisten en un núcleo de proteína con secuencias ricas en aminoácidos prolina, treonina y serina, denominado PTS, en donde la serina y treonina están altamente O-glicosiladas, proceso indispensable para la producción de moco. Las mucinas son sintetizadas y secretadas por las células calciformes, presentes principalmente en la cripta que en las vellosidades del intestino delgado (Paone y Cani, 2020).

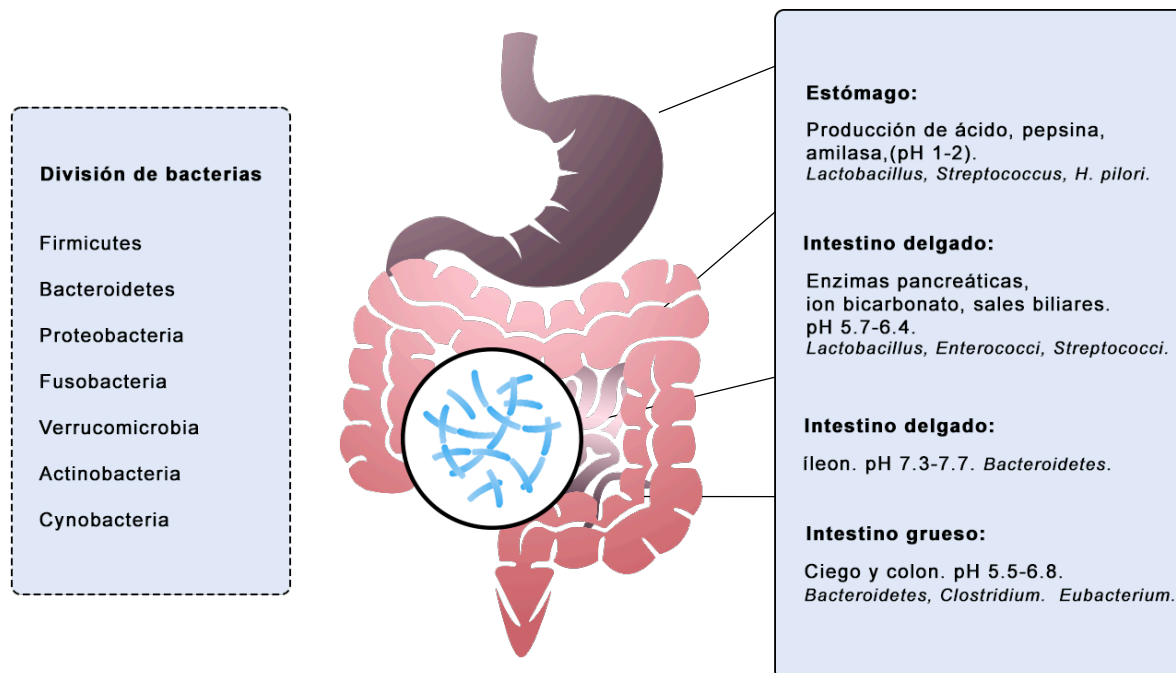


Figura 2. División de las bacterias a nivel taxonómico Filo. Distribución de la colonización bacteriana esperada a lo largo del tracto gastrointestinal (estómago,

intestino delgado proximal, intestino delgado distal e intestino grueso) de acuerdo a condiciones como pH, bicarbonato y enzimas (Modificado de Adak y Khan, 2019).

En las células Goblet la expresión de MUC2 pasa del núcleo al retículo endoplásmico, en donde los monómeros de MUC2 forman dímeros. En el aparato de Golgi tendrá una reacción enzimática de O-glicosilación, los dímeros de MUC2 forman trímeros en la red de Golgi, donde se empaquetan en las vesículas secretoras. Las células calciformes llenan sus vesículas secretoras de MUC2 mientras migran desde el fondo de la cripta que contienen otros elementos como el fragmento Fc de la proteína de unión a IgG (FCGBP), accesorio del canal de cloruro 1 (CLCA1), proteína de gránulos de zimógeno 16 (ZG16) y homólogo de gradiente anterior 2 (AGR2). Las vesículas secretoras destruyen su contenido después de su fusión con la membrana apical de las células calciformes, mediante exocitosis, permitiendo la secreción de moco (Fig. 3) (Paone y Cani, 2020). Además, la mucina sirve como nicho para los microorganismos residentes puedan adherirse y proliferar, a su vez los microorganismos pueden remodelar la capa de moco del tracto gastrointestinal para que se renueve (Paone y Cani, 2020). Se sugiere que el perfil de glicosilación de las mucinas puede influir en la composición de bacterias asociadas al moco, seleccionando aquellas bacterias en que los O-glicanos de mucina promueven la homeostasis con los microorganismos del huésped, sugirieron que las adhesinas bacterianas específicas permiten la adaptación dentro de la localización específica del huésped (Bergstrom, 2013).

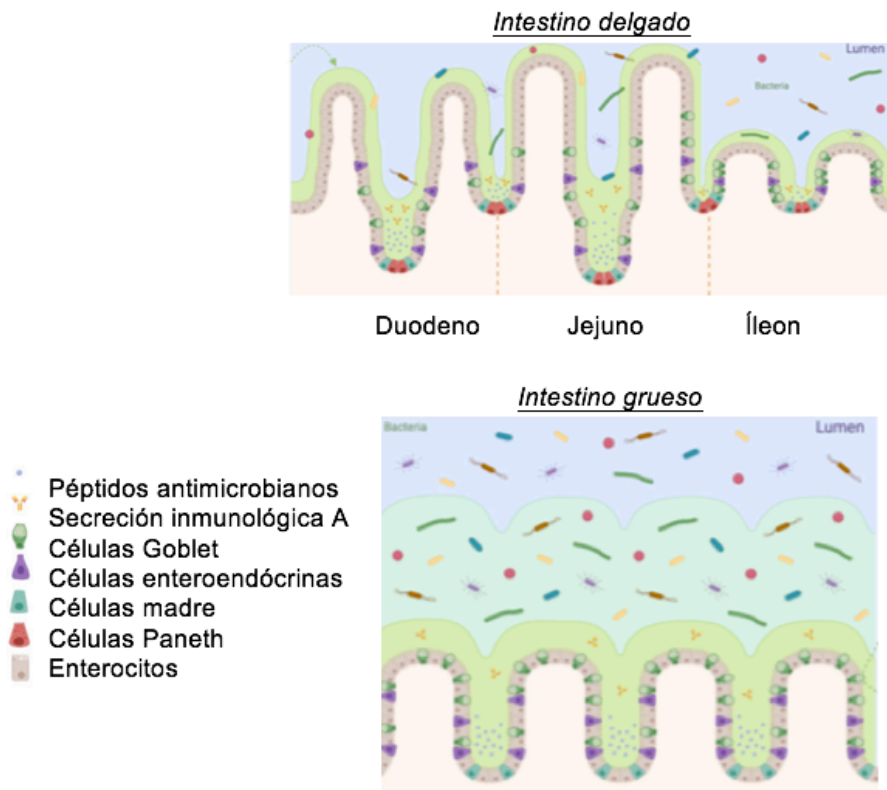


Figura 3. Esquema de la producción y distribución del moco en el intestino delgado y grueso. La capa de moco recubre a los enterocitos, protegiéndolas del contacto con sustancias tóxicas, enzimas digestivas y microorganismos patógenos (Modificado de Paone y Cani, 2020).

Sartor y col. en 2008 reportaron que la composición y concentración de especies microbianas localizadas en el tracto gastrointestinal es diferencial o esta compartimentalizada; en el estómago la abundancia bacteriana es $0-10^2$ de bacterias con predominancia de *Lactobacillus*, *Candida*, *Streptococcus*, *Helicobacter pylori* y *Peptostreptococcus*. A su vez en el intestino delgado cuenta principalmente con *Streptococcus* y *Lactobacillus* con concentraciones que va incrementando desde el duodeno hasta el íleon de 10^2-10^3 . A partir del íleon distal empieza a haber una mayor concentración de bacterias siendo de 10^7-10^8 con predominio de *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Actinomycinae*, *Corynebacteria* y finalizando con el intestino grueso con una concentración hasta 10^{12} , con predominio de *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* y *Enterobacteriaceae* (Koboziev, 2014). Este establecimiento de la colonización de bacterias proporciona funciones que el propio huésped no podría llevar a cabo. Por ejemplo, cumple con 5 funciones principales; metabólicas, neurológicas, estructurales, inmunitarias y regulación la expresión génica del huésped (Adak y Khan, 2019, Celiker y kalkan, 2020).

En relación con su función metabólica, se sabe que en el tracto gastrointestinal de los seres humanos digiere aproximadamente 85% de los carbohidratos, 65-95% de las proteínas y las grasas. En el colon, la microbiota intestinal capta 10-30% de la energía de los macronutrientes y al resto se excreta en las heces (Bergman, 1990). Los microbios intestinales tienen una variedad de enzimas para la utilización de los diversos macronutrientes como los carbohidratos, proteínas y lípidos. Los integrantes de los phyla *Bacteroidetes* y *Firmicutes* tienen en su genoma, genes que codifican para la enzima glucósido hidrolasas que les permite la utilización de diferentes polisacáridos como fuentes de carbono. La microbiota intestinal fermenta todas las fibras dietéticas lo que da como resultado la liberación de gases como el metano, hidrógeno y dióxido de carbono, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el formiato, acetato, propionato, butirato, valerato, isovalerato, ácidos orgánicos como lactato y succinato y alcoholes como metanol y etanol (Louis y Flint, 2009).

La microbiota intestinal también está involucrada en el metabolismo de las proteínas, la cual puede ser hidrolizada por bacterias tales como *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. y *Succinivibrio dextrinosolvens*. Las cuales a su vez son capaces de sintetizar proteasas y peptidasas para generar aminoácidos, péptidos y tripéptidos en el intestino delgado, a su vez estos productos son utilizados por ciertas bacterias intestinales o absorbidos por los enterocitos intestinales (Fan, et al., Zhao, et al., 2019). Por otra parte, los aminoácidos no digeridos generalmente al llegar al intestino grueso no son absorbidos por los colonocitos, sino que se fermentan por los géneros *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* y *Lactobacillus* en numerosos metabolitos como los ácidos grasos de

cadena corta, sulfato de hidrógeno y amoníaco (Zhao, et al., 2019). Además, la disponibilidad de proteína dietética sirve como señalización del eje intestino-cerebro, mediante la producción de neurotransmisores tales como GABA, la norepinefrina, la dopamina, la histamina y la serotonina, contribuyendo en el mantenimiento y funcionamiento neurológico del huésped (Portune, et al 2016).

En modelos murinos, se ha reportado que la ingesta de dietas altas en lípidos se asocia a cambios en la microbiota intestinal, causando una disminución del filo Bacteroidetes y aumento de los filos Firmicutes y Proteobacteras (Murphy, Velázquez and Herbert, 2015). Caesar y colaboradores (2015) compararon los efectos de una dieta rica en grasas saturadas en roedores y lo contrastaron con roedores alimentados con una dieta isocalórica y elevado en ácidos grasos poliinsaturados. Con esto encontraron que tanto la diversidad, como la abundancia de la microbiota intestinal de los roedores que consumieron una dieta rica en grasa saturadas, presentaron una disminución de Akkermansia Muciniphila, Lactobacillus y Bifidobacterium. Adicionalmente, el consumo de grasas saturadas redujo la sensibilidad a la insulina. Estos cambios a nivel intestinal debido al contenido de ácidos grasos en la dieta posiblemente se deban a que los ácidos grasos tienen actividad antibacteriana, provocando daños en la membrana celulares bacterianas. Además, se ha reportado que la microbiota intestinal puede metabolizar los ácidos grasos de cadena larga por Lactobacillus, promoviendo su crecimiento, reconstituyendo el perfil bacteriano y reduciendo la lesión hepática (Chen, et al., 2015).

Es bien conocida la comunicación bidireccional que existe entre el intestino y el cerebro, la cual se le conoce como el eje intestino-cerebro cuya interface es el sistema nervioso entérico (Holzer, et al., 2012). Investigaciones recientes mostraron que los cambios en la microbiota intestinal pueden afectar las funciones conductuales y cognitivas a nivel central (Hong & Wang, 2016). En 2013, el Instituto Nacional de Salud Mental, Estados Unidos, inicio un proyecto de investigación sobre el eje microbiota-intestino-cerebro para aclarar la comunicación de este eje. En humanos como en animales, se ha demostrado que la microbiota intestinal puede desempeñar un papel clave en el funcionamiento cerebral y desarrollo cognitivo mediante la producción de hormonas, factores inmunitarios y metabolitos, lo que sugiere eventualmente que la alteración de la microbiota intestinal puede asociarse a ciertas patologías del sistema nervioso central (Mayer, et al., 2014). Sudo y colaboradores (2004) reportaron que el estrés inducido por restricción en roedores libres de gérmenes condujo al incremento en los niveles de corticoesterona y hormona adrenocorticotropina, en comparación con roedores convencionales y que dicha respuesta podría revertirse al transplantar Bifidobacterium infantis. En este estudio se evidencio que la microbiota intestinal juega un papel relevante para el adecuado desarrollo de la reacción al estrés, relacionado con el adecuado desarrollo del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal, función de la microbiota intestinal para la maduración neuroendocrina (Sudo, et al., 2004).

Otra función que cumple la microbiota intestinal está relacionada con el mantenimiento óptimo de la barrera intestinal. Evidencias indican que el consumo de una dieta equilibrada promueve el estado eubiótico de la microbiota intestinal; dicho estado se caracteriza por una preponderancia de especies de bacterias benéficas pertenecientes al Filo Bacteroidetes, promoviendo un adecuado equilibrio

entre los Filos Firmicutes y Bacteroidetes, involucrado en el adecuado síntesis de mucina por parte de las células Globet, dando integridad de la barrera intestinal (lebba, 2016). El epitelio intestinal es una capa de células columnares que están estrechamente unidas por complejos de unión intercelular que regulan la permeabilidad membranar en la que participan las uniones estrechas intestinales (TJ) y las uniones adherentes (AJ) que comprenden el complejo de unión apical, uno de los componentes en la barrera intestinal (Rohr, et al., 2020). Los componentes de las uniones estrechas intestinales y las uniones adherentes están como complejos multiméricos que consisten en proteínas transmembranales como E-cadherina, ocludina, Claudina y molécula adherente de unión (JAM) (Rohr, et al., 2020). La estructura de estas proteínas incluye dominios extracelulares e intracelulares (Fig. 4), en el dominio extracelular une la superficie lateral epitelial, con células epiteliales intestinales adyacentes que albergan proteínas TJ, mientras que los dominios intracelulares se unen a proteínas como cateninas y zonulina (Rohr, et al., 2020).

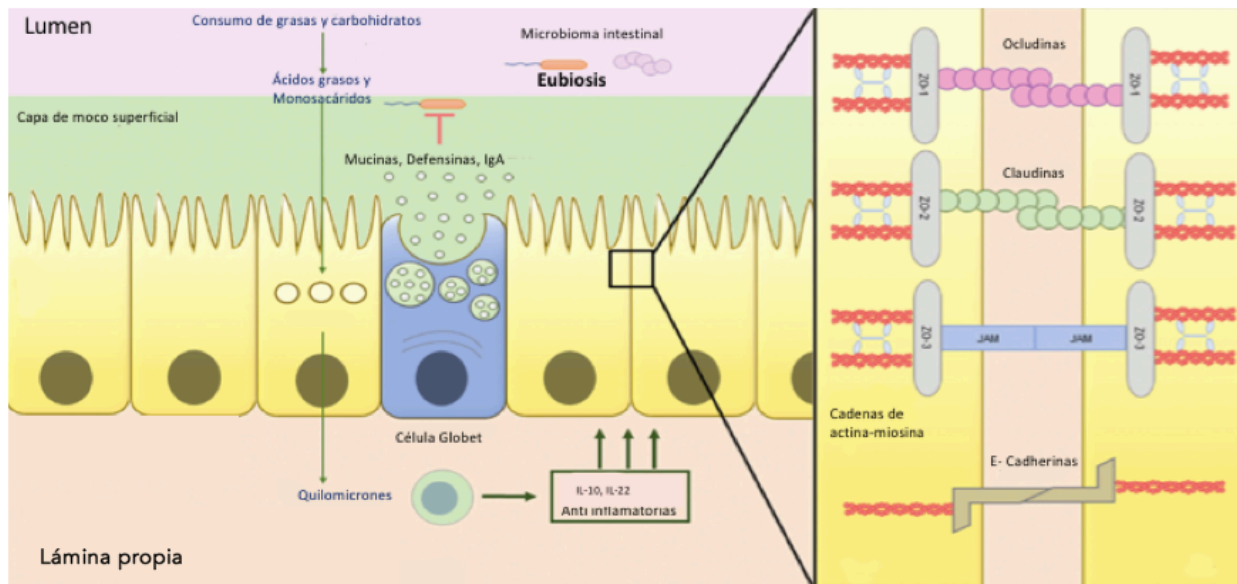


Figura 4. Consumo de una dieta equilibrada promueve el estado eubiótico de la microbiota intestinal. Este estado de la microbiota intestinal se caracteriza por un óptimo estado en la barrera intestinal, el cual utiliza varios mecanismos para evitar el paso de componentes del Lumen hacia la Lámina propia (LP). El moco producido por las células Globet mantiene la integridad de la barrera física intestinal, permitiendo la adecuada producción de defensinas y estimulando las respuestas inmunitarias a través de la IgA secretada. Además, las uniones estrechas (TJ) formadas entre los enterocitos son numerosas y permiten de forma selectiva la permeabilidad de moléculas hacia la LP. Varias proteínas se encuentran involucradas en el mantenimiento de TJ, el cual incluye ocludina, Claudina, cadherinas, integrales en la barrera intestinal (Modificado de Rohr, et al., 2020).

En cuestión de la función inmunitaria, el tracto gastrointestinal está involucrado en la respuesta inmunológica innata y adaptativa, ya que algunas respuestas inmunológicas se presentan en las organizaciones linfoides en las placas de Peyer (Round y Mazmanian, 2009). La barrera inmunológica innata consiste en el moco intestinal, péptidos antimicrobianos e Inmunoglobulina A secretora. Los péptidos antimicrobianos son secretados por células epiteliales intestinales que incluyen células enterocitos, células calciformes y células de Paneth que restringen el acceso tanto de microorganismos comensales, como de patógenos hacia el epitelio intestinal. Los péptidos antimicrobianos que incluyen defensinas, catelicidinas y lecitinas de tipo C, son proteínas catiónicas que se encuentran retenidas en el moco intestinal. Estos péptidos pueden unirse a las membranas celulares microbianas cargadas negativamente o atacando enzimáticamente la pared celular para romper la membrana externa o interna (Boneca, et al. 2007). La inmunoglobulina A (IgA) protege el epitelio intestinal de los microorganismos patógenos y sus enterotoxinas, el reconocimiento de los microorganismos patógenos mantiene su activación de las células presentes en las placas de Peyer, en el folículo linfóide o lámina propia. Las células dendríticas no migratorias de tipo macrófago en las placas de Peyer capturan antígenos lumenales a través del transporte trans-epitelial, el antígeno capturado se transfiere a las células CD103 migratorias que se dirigen hacia el área interfolicular, las CD103 interactúan con las células Treg, que a su vez interactúan con las células B para que sintetizen IgA con la ayuda de ácido retinoico y factor de crecimiento transformante- β (Rescigno, et al, 2001). Además, la respuesta inmune innata puede reconocer microorganismos patógenos mediante receptores de reconocimiento de patrones codificados en la línea germinal, los receptores tipo Toll (TLR) reconocen los patrones moleculares asociados a microorganismos que contengan lipopolisacáridos de origen bacteriano (LPS), lipoproteínas, flagelinas y DNA de patógenos que contiene CpG no metilado (Akira, Uematsu y Takeuchi, 2006).

La microbiota intestinal también tiene la capacidad de modular la expresión génica y la regulación del metabolismo del huésped; ciertos cambios epigenéticos también pueden ocurrir en la microbiota intestinal como regulación de RNA no codificante, reestructuración de la cromatina, modificaciones de histonas y metilación del DNA (Celiker y Kalkan, 2020). Estos cambios pueden causar enfermedades metabólicas, como el síndrome metabólico y la obesidad (Celiker y Kalkan, 2020). Remely y colaboradores (2015) compararon la microbiota intestinal entre individuos sanos y con obesidad, se observó que los pacientes con obesidad presentaron menor diversidad y una mayor cantidad de *Faecalibacterium Prausnitzii*, también encontraron que el gen receptor de ácidos grasos libres 3 (FFAR3) tenía un nivel de metilación reducido (Remery, et al., 2015).

Un mecanismo adicional que puede ocurrir con los ácidos grasos de cadena corta es la modificación de las histonas, durante la acetilación de histonas, el grupo acetilo está siendo catalizado por la enzima histona acetiltransferasa, el mecanismo de acción es la transferencia del grupo acetilo hacia la posición en la acetil-coenzima A al grupo amino ubicado en los depósitos de lisina, en la cola de histona (Bernstein, et al, 2007). Este mecanismo está controlado por diferentes metabolitos que son derivados de la fermentación de la microbiota intestinal; los ácidos grasos de cadena corta tienen la capacidad de modular el estado de la cromatina de muchos

componentes tisulares, por ejemplo, las células de colon (Krautkramer, et al, 2016). De acuerdo con estos estudios, las modificaciones epigenéticas en un individuo tienen un papel en la etiología de enfermedades crónico no transmisibles, como es el caso de la obesidad.

1.2.2 Relación entre la microbiota intestinal y los procesos metabólicos del huésped

La evidencia creciente indica que la microbiota intestinal responde a factores ambientales, en particular a la dieta, de tal manera que impactan en su diversidad y abundancia relativa alterando el metabolismo del huésped, relacionado con el síndrome metabólico, con un posible desenlace a enfermedades crónico no transmisibles como la obesidad, el hígado graso no alcohólico, entre otros (Maruvada, et al., 2017).

Evidencias indican que la microbiota intestinal promueve la degradación de fibra a oligosacáridos y monosacáridos, en particular en el intestino grueso, promueve la producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente propionato, acetato y butirato, este último proporciona energía a las células epiteliales del colon, mientras que el acetato y propionato llegan al hígado, donde son sustratos para la gluconeogénesis y la lipogénesis (Fig. 5) (Tremaroli y Backhed, 2012).

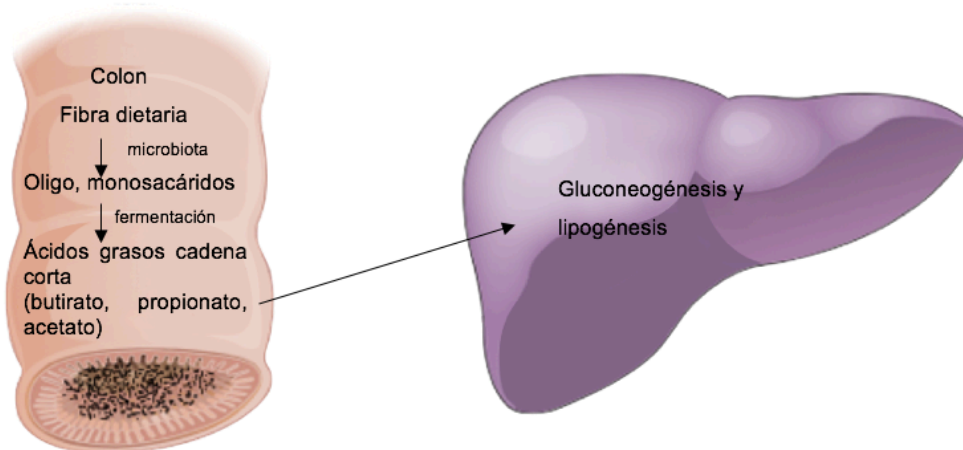


Figura 5. Fermentación de la fibra en el colon. Carbohidratos complejos, como la fibra dietética son metabolizados por la microbiota residente en el intestino grueso a oligosacáridos y monosacáridos, luego fermentados a ácidos grasos de cadena corta (principalmente butirato, propionato y acetato), donde el butirato actúa como fuente de energía para las células epiteliales del colon, y el acetato y propionato llegar al hígado donde son sustrato para la gluconeogénesis y la lipogénesis (Modificado de Tremaroli y Backhed, 2012).

Cotillard y colaboradores reportaron que, en el consumo de una dieta alta en lípidos, se asocia con una disminución del Filo Actinobacteria de la subclase Bifidobacterium spp, el cual está involucrado en la producción de los ácidos grasos de cadena corta,

disminuyendo la integridad de la barrera intestinal (Cotillard, et. al., 2013). Además, cuando hay consumo de una dieta alta en grasa se asocia a una mayor producción de ácido biliar en el cual la microbiota intestinal transformará el ácido tauracólico a ácido sulfhídrico, este ácido promueve la apoptosis de los enterocitos (Rohr, et al., 2020).

Por otra parte, los lipopolisacáridos y peptidoglucanos se pueden reconocer mediante las proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina, que forman el complejo de inflammasoma, dañando la integridad de la barrera intestinal (Fig.6), estimulando la vía paracelular en donde habrá traslocación bacteriana, que presentan una membrana de lipopolisacáridos, activando los receptores TLR4 y 9 en el hígado, aumentando la secreción del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y el desarrollo de hígado graso no alcohólico y/o la esteatohepatitis no alcohólica (Tremaroli y Backhed, 2012).

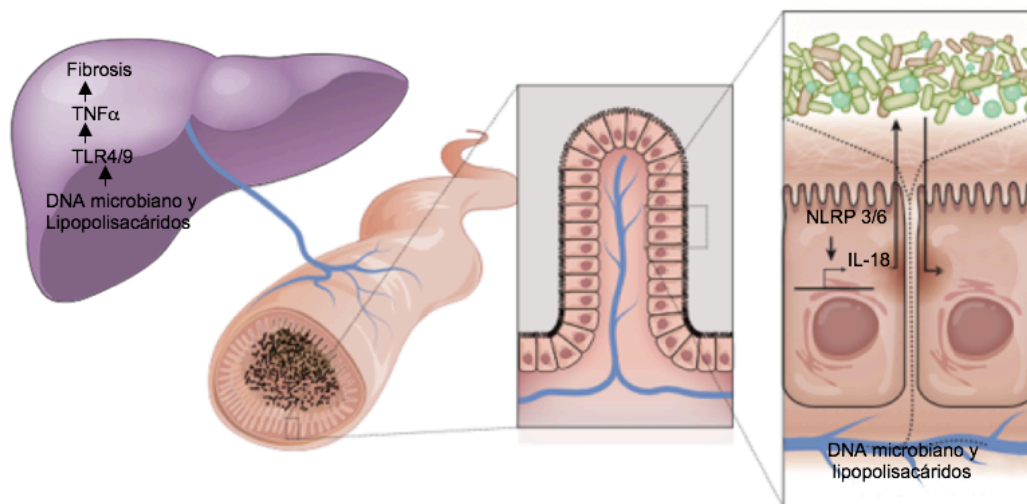


Figura 6. Disbiosis intestinal promueve la permeabilidad de la barrera intestinal, provocando fibrosis hepática. El incremento de lipopolisacáridos en plasma parece aumentar con una mayor ingesta de grasas. Tanto el DNA bacteriano como los lipopolisacáridos parecen estar relacionados con la permeabilidad intestinal. Las proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina (NLRP) 3 y 6 son reguladores en la ecología microbiana a través de IL-18. En el Hígado, los lipopolisacáridos y el DNA microbiano pueden activar receptores tipo Toll 4 y 9, provocando un incremento del factor de necrosis tumoral α . Una continua elevación de las concentraciones de $TNF\alpha$ puede desembocar a fibrosis hepática. NLRP 3/6. Proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina. $TNF\alpha$. Factor de necrosis tumoral alfa. TLR 4/9. Receptores tipo toll 4/9. (Modificado de Tremaroli y Backhed 2020).

En consecuencia, la disbiosis intestinal, se ha relacionado con un aumento en la aparición de enfermedades metabólicas. Tal es el caso de la diabetes mellitus, obesidad, enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, las enfermedades inflamatorias del intestino, el cáncer, alteraciones en la respuesta inmunitaria, en enfermedades neurodegenerativas y síndrome metabólico (Sharma, et al. 2019, Barberán, et al, 2020). Ridaura y colaboradores (2013) demostraron que la microbiota intestinal alteraba el metabolismo de la glucosa en gemelos homocigotos en el cual uno era delgado y el otro presentaba obesidad (Ridaura, et al., 2013). Al transferir la microbiota intestinal inoculada a ratones libres de gérmenes, éstos adquirieron el fenotipo del individuo donante, generando un ratón delgado u obeso. Otro estudio elaborado por Koh y colaboradores mostró que la microbiota intestinal de personas con diabetes mellitus tipo 2 tenían una mayor producción de imidazol propionato, el cual está relacionado con la alteración del metabolismo de la glucosa. Para confirmar este efecto, se inoculó la microbiota de las personas con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y se transfirió a un ratón libre de gérmenes, incrementando la concentración de imidazol propionato, alterando el metabolismo de glucosa del huésped (Koh, et al., 2019). Desde entonces, se acepta que la alteración de la microbiota intestinal conocido como disbiosis, es tan importante como la genética del huésped en el desarrollo de varias enfermedades. Esto nos lleva a la oportunidad de monitorear, prevenir o incluso tratar enfermedades humanas, mediante la regulación de la microbiota intestinal (Bahare et. al. 2021).

1.3.2 Ontogenia de la Microbiota Intestinal

En la actualidad prevalece la controversia sobre el momento en el que se establece o se lleva a cabo la colonización inicial de la microbiota, si este comienza a colonizarse in útero o al momento del nacimiento. Esta controversia es desafiada por estudios en los que se detectaron microorganismos en los tejidos del útero, así como en la placenta y el meconio (Pérez, et al 2017).

La hipótesis del útero estéril sugiere que el feto se desarrolla en un ambiente estéril y la colonización ocurre en el momento del parto (Pérez, et al. 2017). Los estudios que apoyan la hipótesis del útero estéril sugieren que el meconio, primera deposición del recién nacido no alberga bacterias detectables (Hansen, et al 2015). Desde el estudio realizado por Harris y Brown en 1927 remarcó la hipótesis, al investigar la presencia de bacterias cultivables en el líquido amniótico de mujeres sometidas a cesáreas, dando negativo a las muestras. Estudios posteriores basados en cultivos del líquido amniótico confirmaron que era libre de bacterias durante un embarazo saludable (Stroup, 1962). La presencia detectable de alguna bacteria se interpretaba como infecciones subclínicas o clínicas ya que en los casos que daban positivo a presencia de alguna bacteria se relacionaba con complicaciones durante la gestación (Prevedourakis, 1971 y Lewis, 1976). Sugiriendo que el momento de nacimiento es cuando se coloniza la descendencia con la microbiota. Existen reportes que indican que la descendencia nacidos vía vaginal adquiere una microbiota similar al de la vagina de la madre con presencia de *Lactobacillus*. Mientras que la descendencia nacidos vía cesárea, adquieren una microbiota parecido al de la piel de la madre, colonizados por bacterias anerobias

facultativas como la especie de *Clostridium*. Se ha reportado que la microbiota fecal de la descendencia es 72% similar a la de sus madres quienes nacieron vía vaginal y quienes nacieron vía cesárea se reduce al 41% (Aagaard, et al 2012).

En contraste, existe otra hipótesis la colonización in útero que sustenta que la colonización microbiana de la descendencia comienza antes de su nacimiento (Pérez-Muñoz, et al 2017). Se han propuesto varias rutas para explicar cómo las bacterias pueden colonizar la cavidad uterina durante el embarazo saludable. Sugiriendo dos vías principales que se están considerando actualmente: primero la ascensión vertical desde la vagina y/o tracto urinario a la cavidad uterina y segunda una vía hematológica a través de la placenta (Neu, 2016). Los microorganismos no solo están presentes en el ambiente intrauterino en embarazos sanos a término, sino que el útero tiene su propia microbiota que puede contribuir a la colonización del feto (Wassenaar y Panigrahi, 2014). Sugieren que el entorno intrauterino puede facilitar el establecimiento de un microbioma diverso y que podría actuar en el desarrollo del feto (Wassenaar y Panigrahi, 2014). También se ha propuesto que la microbiota uterina, con predominio del género *Lactobacillus* está involucrado en el adecuado desarrollo inmunológico del útero, antes del embarazo, el cual afectaría en gran medida el potencial receptivo del endometrio, así como la capacidad de iniciar correctamente la formación de la placenta (Agostinis, et al., 2019).

Algunas consideraciones que se deben tener en cuenta en esta controversia, es la metodología con lo que se han analizado la presencia de bacterias y las funciones de la placenta, ya que proporciona nutrientes al feto y tiene protección contra microorganismos patógenos por lo que cuenta con características fisiológicas e inmunitarias que previenen la colonización de ciertas bacterias (Maltepe, et al 2010). La barrera materno-fetal tiene dos elementos anatómicamente distintos, la placenta corioalantoidea y la membrana corioamniótica. Esta barrera está formada a nivel placentario por el sincitiotrofoblasto, una capa de células epiteliales especializadas de los citotrofoblastos subyacentes (Figura 7). El sincitiotrofoblasto invade activamente la pared uterina, formando el componente fetal externo de la placenta y las vellosidades placentarias. Además, esta capa epitelial forma un interfaz entre la sangre materna y el líquido extracelular embrionario que regula el paso de oxígeno y nutrientes entre los capilares materno-fetal. Así mismo, las células del sincitiotrofoblasto actúan como barrera impidiendo que las células maternas o bacterianas atraviese y lleguen al torrente sanguíneo fetal, por lo que cuenta como una protección estructural (Pérez Muñoz, et. al., 2017). Por otra parte, los trofoblastos extravellosos proporcionan otro nivel de protección, invadiendo la decidua y anclan la placenta en la pared uterina, además la decidua presenta células asesinas naturales, macrófagos y leucocitos (Zeldovich, et al 2013). Sin embargo, Stinson y colaboradores (2019) realizaron un estudio en mujeres que se sometieron a partos por cesárea sin evidencia de infección intrauterina, evidenciaron que había presencia de microbiota fetal en las muestras de meconio y en la mayoría de las muestras de líquido amniótico, cuidando que no hubiera contaminación de dichas muestras, evidenciando que no solo hay DNA bacteriano en el útero, sino también ácidos grasos de cadena corta que puede influir en el desarrollo del sistema inmunológico fetal (Stinson, et al., 2019).

La colonización microbiana del intestino del lactante representa el ensamblaje *de novo* de una comunidad microbiana compleja, un proceso que está influenciado por varios factores tanto ambientales, como del huésped.

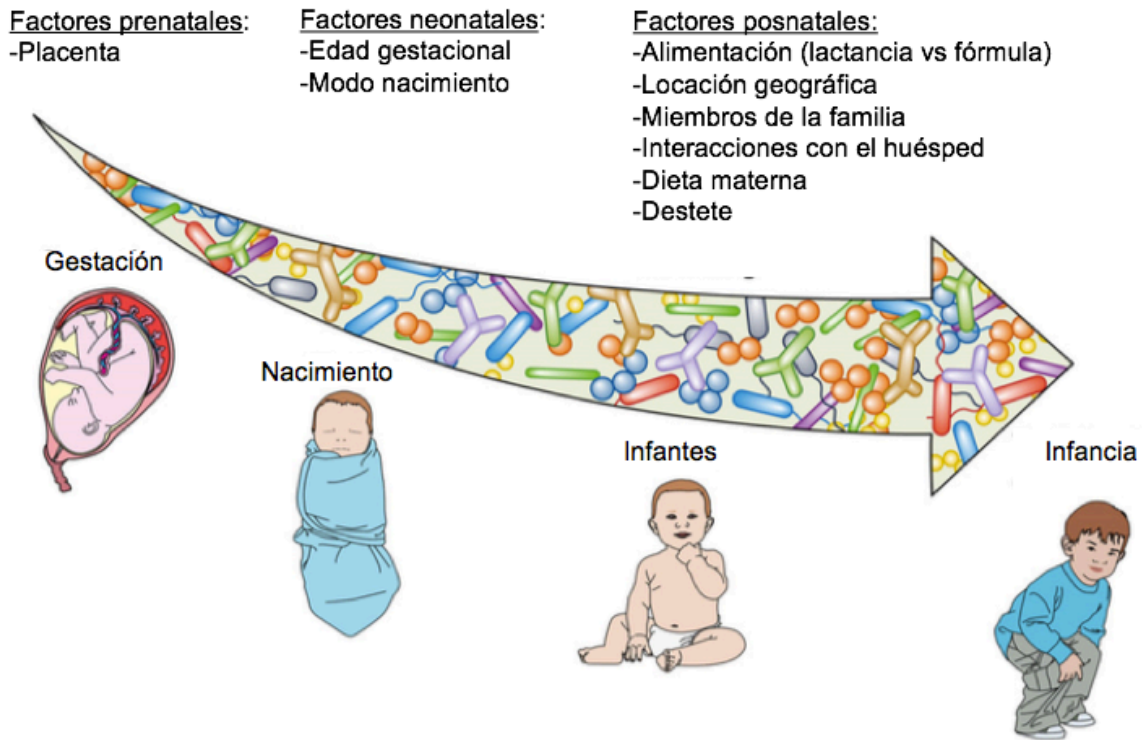


Figura 7. Representación esquemática muestra una lista de factores prenatales, neonatales y posnatales que contribuyen a la composición bacteriana del intestino en los lactantes (Modificado de Milani, et al. 2017).

En las primeras etapas de desarrollo (Figura 7), generalmente la microbiota intestinal posee baja diversidad y está determinada por dos filos principales: Actinobacteria y Proteobacteria (Avershina, et al. 2013). Durante el primer año de vida, la diversidad microbiana aumenta y la composición de la microbiota converge hacia una característica microbiana parecida a la de los adultos (Avershina, et al. 2013). Estudios sugieren que esta etapa es crucial para el establecimiento de la microbiota intestinal, en el cual va a repercutir el uso de antibióticos ya que se ha reportado que los lactantes a los que se les administraron antibióticos tienen proporciones más bajas de bacterias del ácido láctico y enterococos (Sender, et al., 2016). La alimentación del lactante es otro factor que influye en la colonización de la microbiota intestinal, en infantes amamantados la microbiota está constituida predominantemente por *Streptococos* y *Bifidobacterias*, mientras que los neonatos alimentados con fórmula láctea tuvieron una predominancia de *Enterobacterias* y *Bacteroides* intestinales (Lakshminarayanan, et. al., 2014). Adicionalmente, se han

descrito cambios en la colonización intestinal después de la introducción de alimentos sólidos, un estudio reportó la diferencia de microbiota intestinal de infantes que consumieron una dieta occidental y la dieta africana. Los infantes que consumieron una dieta occidental tuvieron una reducción de la diversidad microbiana con menor cantidad de Actinobacteria y Bacteroidetes, en comparación con la dieta africana (Vermuri, et al 2018).

Alrededor de los dos o tres años de edad la diversidad de la microbiota intestinal continúa siendo menor en comparación con la microbiota intestinal en adultos. En la etapa pre-puberal de sujetos sanos, ésta es más estable, alrededor de 7-12 años empieza a ser rico en abundancia de especies en el cual tienen taxones bacterianos y genes funcionales similares a la microbiota adulta enriquecida con Lachnospiraceae, Anaerovox y Faecalibacterium (Vermuri, et al, 2018).

Aunque en la edad adulta, la composición de la microbiota intestinal es relativamente estable, se compone predominantemente de Bacteroidetes y Firmicutes, está sujeta a modificaciones tanto en la composición como en la diversidad bacteriana por eventos de la vida, por ejemplo, el consumo del tipo de dieta (Koenig, et al 2011). En un estudio longitudinal realizado en humanos, en el que se analizó la microbiota intestinal durante 10 años, mostró que la presencia de un mismo enterotipo dura hasta seis meses, posterior a este lapso habrá fluctuaciones entre éstos (Lynch y Pedersen, 2016).

En los adultos mayores de 65 años, la comunidad microbiana cambia, la variabilidad interindividual es mayor en esta etapa comparada con las anteriores (Imahori, 1992). Se presenta una disbiosis en la microbiota intestinal con la edad, junto con el uso de antibióticos y la falta de una adecuada alimentación, en donde se caracteriza por una mayor abundancia de los Filo Bacteroidetes y Clostridium grupo IV, en comparación con los sujetos más jóvenes donde la bacteria Clostridium grupo XIVa es más prevalente (Biagi, et al 2010). En general, la capacidad de la microbiota para llevar a cabo procesos metabólicos como la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la amilólisis se reduce en los adultos mayores, mientras que la actividad proteolítica aumenta, contribuyendo a alteraciones metabólicas degenerativas (Biagi, et al 2010).

Estudios sugieren que la composición de la microbiota intestinal puede ser el factor clave en la programación metabólica de la obesidad aumentando el riesgo de desarrollo de alteraciones metabólicas en la descendencia, incluso la sobrealimentación materna durante el embarazo es asociado con alteraciones tanto en la composición, como en la abundancia de la comunidad microbiana intestinal en la descendencia (Zhou, 2017). Sin embargo, no hay suficiente evidencia sobre el efecto que posee el consumo crónico durante la gestación de dietas altas en lípidos y carbohidratos, aunado a el consumo de esta misma dieta por parte de la descendencia en la vida adulta. Por lo que en el presente proyecto pretendemos dilucidar si la exposición prenatal y en la vida adulta a una dieta alta en carbohidratos y lípidos, producen alteraciones en la diversidad y abundancia del microbioma intestinal de la descendencia y alteración metabólica.

1.4 El conejo europeo como modelo para los estudios metabólicos y transgeneracionales

En las últimas décadas investigaciones realizadas en conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) evidencian las ventajas respecto a otros modelos animales. Se ha reportado sobre la administración de dietas altas en lípidos y/o carbohidratos simples para inducir SMet (Zarzoso, et al 2019). Dentro de las principales ventajas de este modelo, son sus estrechas similitudes en lo que se refiere al metabolismo de lípidos, con relación a los humanos. En el conejo europeo, aproximadamente el 40% del colesterol en plasma está contenido la apolipoproteína B y las lipoproteínas de baja y muy baja densidad. Adicionalmente, el conejo europeo presenta altos niveles de la proteína de transferencia del éster de colesterol, un importante regulador del transporte reverso del colesterol por lo que son susceptibles a aterosclerosis inducida por el consumo de una dieta alta en grasa (Picone, et al 2011). Las lesiones observables en el conejo europeo con aterosclerosis van desde lesiones en fase inicial, el cual se caracteriza cuando se presentan lesiones denominadas estrías grasas, dichas lesiones se componen de células espumosas derivadas de macrófagos entremezclados con células de músculo liso y la matriz extracelular, así como lesiones avanzadas, caracterizadas por depósitos de calcio (Zhang, et al. 2010). Además, la distribución del tejido adiposo en los conejos es semejante a la disposición en el ser humano. Por lo que el conejo ha sido aceptado como modelo de dislipidemia y acumulación de grasa visceral, siendo un modelo cercano al ser humano.

Otra de las ventajas que presenta el conejo europeo es respecto a la estructura de la placenta, la cual está constituida por dos capas celulares, denominado hemodiorial, refiriéndose al número de capas celulares en la barrera placentaria entre el tejido materno y el tejido fetal (Figura 8) (Andersen, et al. 2018). La placenta de los humanos posee una sola capa por lo que se hace referencia que es de tipo hemomonocorial. En el caso de los roedores presentan tres capas celulares siendo hemotricorial. El número de capas que separan al tejido materno del tejido fetal es considerado como un factor que puede modificar la transferencia de los nutrientes entre la madre y el feto (Thornburg, et al., 2010). Por lo tanto, la anatomía y fisiología de placenta en los conejos representa una ventaja en los estudios transgeneracionales. Adicionalmente, este modelo tiene ciclos reproductivos relativamente cortos y una vida relativamente larga para explorar la aparición de enfermedades crónicas en la descendencia (Chavatte, et al, 2016).

Aunado a lo anterior, las ventajas de la reproducción en el modelo del conejo son el momento exacto de las etapas de fertilización y gestación, el alto número de blastocistos y su rendimiento, la implantación relativamente tardía en un momento en que la gastrulación ya esta en desarrollo (Fischer, et al, 2012).

Antecedentes

El estado nutricional materno es un factor importante para el estado de salud de la descendencia, debido a la creciente evidencia clínica y experimental, que indican la relación sobre el origen de las enfermedades metabólicas que se presenta en el periodo gestacional, por lo que un factor clave es el ambiente nutricional de la gestante.

Uno de los métodos experimentales para inducir síndrome metabólico materno en modelos animales, es la administración de dietas altas en lípidos y carbohidratos. Dicha dieta, se administró solo durante la gestación para conocer el efecto que tiene en la descendencia.

Los efectos metabólicos que producen tanto en las madres como en su descendencia asociadas al tipo de dieta administrado, dependen de la duración de la ingesta y el porcentaje elevado de lípidos y carbohidratos de la dieta. Además de la ventaja del modelo, el conejo europeo puede presentar características fisiopatológicas que evidencian las alteraciones metabólicas así como el cambio en la diversidad y abundancia de la microbiota intestinal.

De especial importancia, el consumo de dietas que tuvieron las madres también puede repercutir en la diversidad y abundancia de la microbiota intestinal de la descendencia. Datos preliminares mostraron que el consumo de dietas altas en lípidos y carbohidratos provocaba una disminución de la especie *Akkermansia* en la descendencia, de peculiar interés ya que tiene efectos de mantenimiento e integridad de la barrera intestinal.

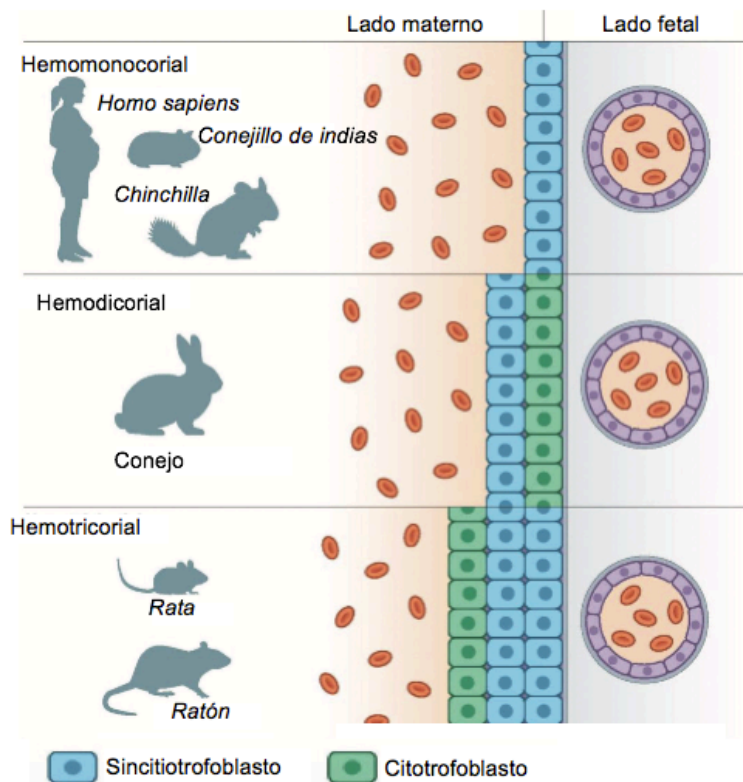


Figura 8. Esquema de diferentes barreras placentarias. a) La barrera placentaria hemomonocorial del homo sapiens, conejillo de indias y chinchilla, sólo una capa de sincitiotrofoblasto separa el espacio sanguíneo materno de los capilares fetales. b) La barrera placentaria hemodicorial en el conejo, una capa de sincitiotrofoblasto y una capa de citotrofoblastos separan el espacio sanguíneo materno de los capilares

fetales. c) La barrera placentaria Hemotricorial, reportada en ratas y ratones, tres capas de células trofoblásticas separan el espacio sanguíneo materno de los capilares fetales. (Modificado de Andersen, et al. 2018).

Dado el incremento acelerado de sobrepeso, obesidad y síndrome metabólico, de especial interés en mujeres en edad reproductiva, por el aumento en el consumo de dietas altas en lípidos y carbohidratos, los estudios transgeneracionales en modelo de conejo europeo basados en la sobre nutrición materna empieza a tomar relevancia.

Hipótesis

El consumo crónico materno de una dieta alta en carbohidratos y lípidos durante la gestación, aunada al consumo de la misma por parte de la descendencia en la etapa adulta, se asocia a alteraciones en el metabolismo energético, así como a cambios en el perfil bacteriano intestinal en el conejo europeo.

Objetivos

General

Establecer si en el conejo europeo la sobrenutrición materna durante la gestación, aunada al consumo de dietas altas en carbohidratos y lípidos por parte de la descendencia en la vida adulta (reto metabólico), se asocia a cambios en los perfiles metabólico y bacteriano intestinal.

Específicos

Determinar si el estado nutricional materno durante la gestación, aunado el reto metabólico de la descendencia en la etapa adulta se asocia a:

- El metabolismo energético.
- El perfil bacteriano intestinal.
- La correlación entre las alteraciones metabólicas y el perfil bacteriano intestinal.

5 Material y Métodos

El presente proyecto se realizó de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH Pub. No. 86-23, revisada en 1996) y conforme a las normas de Tratamiento de animales en Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM (número de registro #98).

5.1 Hembras pie de cría (F0)

El estudio se realizó en conejos de la cepa Chinchilla. Se utilizaron dos grupos de conejos (Figura 9), conejas alimentadas con dieta estándar (CON, n=8) y el segundo grupo conejas alimentadas con una dieta alta en lípidos y carbohidratos (SN, n=12). Los animales fueron criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Las hembras reproductoras se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable, 120x 60x 45cm y se mantuvieron en un ciclo de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad, encendido de las luces a las 09:00 horas.

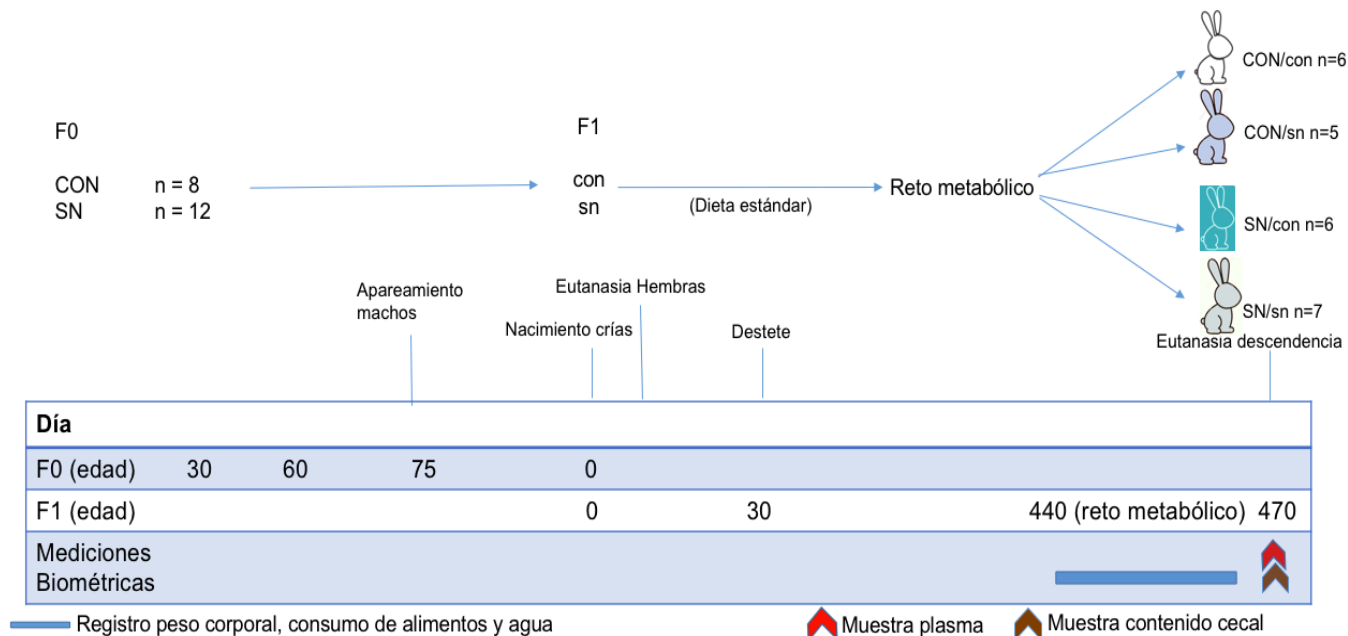


Figura 9. Diseño experimental del protocolo de los animales y grupos experimentales. Se obtuvieron 20 conejas pie de cría en el cual se subdividieron de acuerdo con la dieta proporcionada. Se aparearon con machos alimentados con dieta estándar. El día 0 es el momento del nacimiento de las crías, denominado con F1, la descendencia fue alimentada con madres nodrizas que consumieron una dieta estándar, al día 30 de nacidos se realizó el destete, consumiendo una dieta estándar. Al día 440 se proporcionó el reto metabólico durante 30 días, subdividiendo los grupos en CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN. Al día 470 se obtuvieron las muestras de suero y contenido cecal.

Las crías fueron obtenidas de conejas (F0) nulíparas de 24 semanas de edad, alimentados con dieta estándar para conejo, (Tabla 1, Conejo Ganador Malta Cleyton, México) o con una dieta rica en grasa y carbohidratos (Anexo 1).

La dieta SN fue elaborada a partir de la dieta estándar, la cual se suplementó con 0.1% de colesterol (Sigma, E.U.A.), 4% aceite de soja, (Sigma, E.U.A.) y 15% azúcar refinada (Great Value, México), proporcionando 47% y 10% más de energía

de las grasas y carbohidratos que el obtenido de CON. Durante todo el experimento los animales de ambos grupos tuvieron acceso *ad libitum* al agua y alimento.

A las 20 semanas de edad, las hembras de ambos grupos experimentales se aparearon con machos de 24 meses de edad, de la misma cepa, que fueron alimentados con dieta CON durante toda su vida.

Durante la gestación, las hembras se alojaron individualmente. Las hembras CON continuaron con la dieta CON, mientras que las hembras SN tuvieron una alimentación mixta, recibiendo la dieta SN cada tercer día y los demás días, la dieta CON. Cuatro días antes de la fecha programada al parto, se colocó una madriguera artificial en la jaula de las conejas preñadas.

5.2 Descendencia (F1) y reto metabólico

El día del parto se definió como el día posnatal cero (P0). Los conejos recién nacidos se pesaron al nacer, se marcaron en las orejas para su identificación individual y se les permitió permanecer en la madriguera con la madre durante 6 horas. Posteriormente, éstas se dividieron en dos grupos:

- Crías obtenidas de hembras CON.
- Crías obtenidas de hembras SN.

Cada camada se ajustó con 6 conejos cada una. En el presente estudio se utilizó un total de 24 conejos Chinchilla.

Los conejos de ambos grupos fueron amamantados por nodrizas alimentadas con dieta CON hasta el día P31, el cual fue inicio del destete. La etapa de transición se realizó en los días P32-P35, por lo que además de tener acceso a la hembra lactante, también tenían acceso a la dieta CON de forma *ad libitum*. Los animales fueron destetados al día P36, ambos grupos de animales recibieron dieta CON, a la cual tuvieron acceso *ad libitum* hasta el día 440 de edad, momento en que se sometieron al reto metabólico, el cual consistió en administrar la dieta desequilibrada (dieta SN), durante 30 días de acuerdo con los siguientes grupos experimentales:

- ♀ **CON-CON** Grupo de animales obtenidos de hembras alimentados con dieta estándar y que en la edad adulta la descendencia fue alimentada con dieta estándar. Constituido por 2 hembras y 4 machos.
- ♀ **CON-SN** Grupo de animales obtenidos de hembras alimentados con dieta estándar y que en la edad adulta la descendencia fue alimentada con dieta alta en lípidos y carbohidratos. Integrado por 2 hembras y 3 machos.
- ♀ **SN-CON** Grupo de animales obtenidos de hembras alimentados con dieta alta en lípidos y carbohidratos y que en la edad adulta la descendencia fue alimentada con dieta estándar. Conformado por 2 hembras y 4 machos
- ♀ **SN-SN** Grupo de animales obtenidos de hembras alimentados con dieta alta en lípidos y carbohidratos y que en la edad adulta la descendencia fue alimentada con dieta alta en lípidos y carbohidratos. Con 2 hembras y 5 machos.

Durante los 30 días que duro el reto metabólico, se registró diariamente el consumo de alimento y agua. Dicho registro se realizó colocando 300 gr de alimento en el comedero y 1.9 l de agua en el bebedero de cada animal a las 9:00 horas, el alimento y agua remanente fueron medidos pasadas 24 horas. De inmediato se completó la misma cantidad de alimento y agua, respectivamente. El peso corporal de los conejos fue obtenido una vez a la semana a las 9:00 horas, colocando al conejo en medio de la báscula digital (s/m).

Al término del reto, en el día 470 de edad, la descendencia fue eutanizada. Para tal efecto, los animales fueron colocados en un cepo de manta para impedir su movilidad, se les expuso a una dosis de sevoflurano inhalado, (Abbott, México) para sedarlos, posteriormente en la vena marginal de alguna de las orejas se le inyectó una sobredosis de 30 mg/kg de pentobarbital (Pisabental, Pisa Agropecuaria, México). Posteriormente los animales fueron decapitados con ayuda de una guillotina.

5.3 Obtención de muestras

Para determinar los niveles séricos de glucosa (GLU), colesterol (COL), colesterol de alta densidad (HDL), colesterol de baja densidad (LDL), triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (NEFA). Los animales se mantuvieron en ayuno por 15 h antes de tomar la muestra de sangre, dicha muestra se obtuvo mediante la inserción de un catéter en la arteria de alguna de las orejas, el plasma recolectado se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min para obtener el suero, las cuales fueron almacenadas en un ultracongelador a -70°C hasta el momento de las determinaciones.

Para determinar el perfil bacteriano intestinal, fueron obtenidas muestras de contenido cecal, las muestras fueron colocadas en un tubo Eppendorf de 2 ml y se almacenaron en un ultracongelador a -70°C , hasta el momento de las determinaciones.

5.4 Determinaciones metabólicas

Las muestras de suero fueron analizadas mediante la técnica de colorimetría en el cual se procesa usando el método de espectrofotometría utilizando el Kit comercial de ensayo colorimétrico enzimático (Randox Laboratories LTD., Reino Unido y Biosino Bio-Technology & Science Inc.); las determinaciones se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.5 Determinación microbiota intestinal

La extracción de DNA bacteriano, se realizó mediante el Kit QIAamp PowerFecal DNA, QIAGEN México, conforme a las especificaciones del fabricante (Figura 10). Brevemente, la extracción se realizó de 0.2 g de contenido cecal, los cuales se transfirieron al tubo con perlas y se le añadió 750 μL de buffer Powerbead Solution, las muestras fueron homogenizadas mediante el Fastprep durante 45 s. Posteriormente, las muestras se incubaron y se transfirió el DNA al MN Spin column (Figura 10). Después se realizó lavados para retirar contaminantes de las muestras. Finalmente, se transfirió el DNA a un tubo de recolección mediante eluir con agua

grado biología molecular. Las concentraciones de DNA de cada muestra fueron determinadas por espectrofotometría, mediante mediciones en Nanodrop y se determinó la pureza de cada muestra midiendo la relación de absorbancia A260/A280. Posteriormente el DNA bacteriano se diluyó para tener una concentración final de 50 ng/μL y se almacenó en un ultracongelador a -70°C.

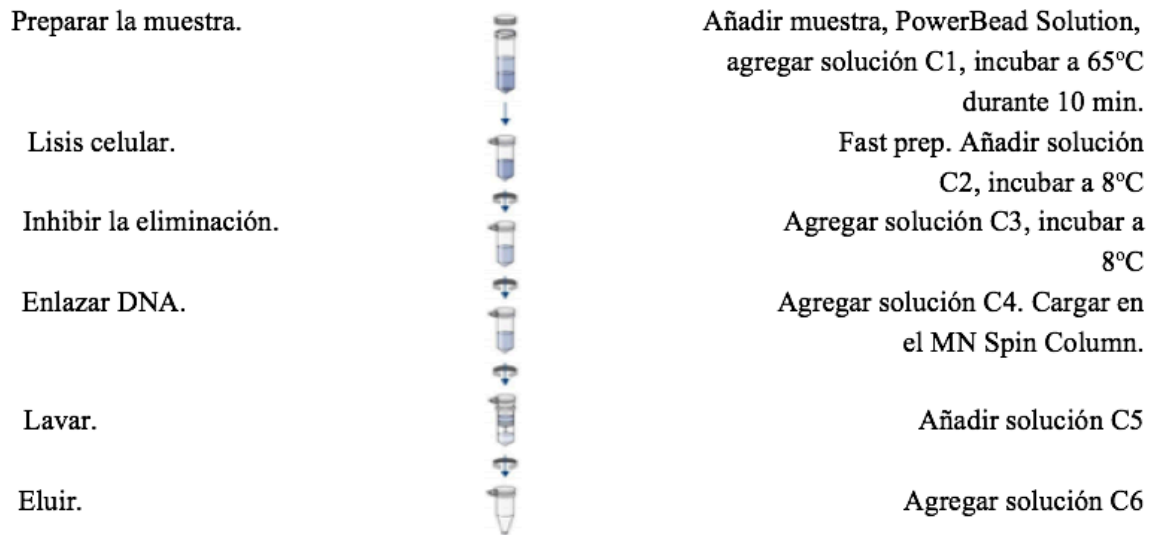


Figura 10. Protocolo del Kit QIAamp Powerfecal DNA para la extracción de DNA del contenido cecal.

La realización de las librerías se basó en el protocolo de amplificación de la región V4 del gen 16s RNAr (Figura 11). Se utilizó primers 515F (5'G TGC CAG CMG CCG CGG TAA 3'; 19 pb) y 806R (5'GG ACT ACH VGG GTW TCT AAT 3'; 20 pb), siendo este último oligo el que incluyó el código de barras para la identificación de la muestra, como sugiere el Earth Microbiome Project (Caporaso, et al., 2010).

Se utilizaron 30 μL del DNA de cada muestra para la realización de la primera PCR punto final, se usó una concentración de 50 ng/μL de ADN de cada muestra y se preparó 23 μL de la mezcla de reacción, el cual incluía 22.5 μL Platinum Taq DNA polimerasa y 0.5 μL primer universal forward, posterior se añadió 2 μL de DNA de cada muestra y 0.5 μL del primer reverse, de los cuales se utilizaron 24 diferentes (Anexo 3) y se colocaron en una placa los tubos para PCR pertenecientes a cada muestra; se realizó la PCR con los siguientes ciclos: 94°C durante 3 min por 1 ciclo, 94°C durante 30s por 30 ciclos, 50°C durante 30s por 30ciclos, 68°C durante 3 min por 30 ciclos y 68°C durante 5 min por 1 ciclo. Una vez concluido, se realizó la confirmación de la amplificación de la región V4 gen 16s RNAr mediante una electroforesis (agarosa al 2%). Los productos se purificaron usando perlas Angecourt AMPure XP, seguido de su cuantificación mediante el fluorómetro Qubit

2.0 (Invitrogen). Se realizó una segunda PCR punto final, se utilizó una mezcla de reacción con 45µL Platinum Taq DNA polimerasa y 1 µL primer universal forward y 1 µL de primer reverse, los cuales se ocuparon cuatro diferentes (Anexo 3); estos oligos son necesarios para que se unan por complementariedad a los oligos que se encuentran en la placa de flujo en el proceso de secuenciación en la plataforma de Illumina, los cuales se corrieron en cuatro tubos para PCR y se realizó la PCR con los siguientes ciclos: 94°C durante 2 min por 1 ciclo, 94°C durante 30s por 5 ciclos, 60°C durante 30s por 5 ciclos, 68°C durante 1.5m por 5 ciclos y 68°C durante 5 min por 1 ciclo. De nueva cuenta se realizó una electroforesis (agarosa al 2%), para comprobar que el amplicón sea más grande como resultado de la adición de los adaptadores de Illumina. Los productos se purificaron usando perlas Angecourt AMPure XP, seguido de su cuantificación mediante el fluorómetro Qubit 2.0. Las proporciones equimolares de amplicones de las muestras individuales se combinaron y secuenciaron utilizando una plataforma Illumina MiSeq 2 × 250, en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en colaboración con la Dra. Sofía Morán Ramos.

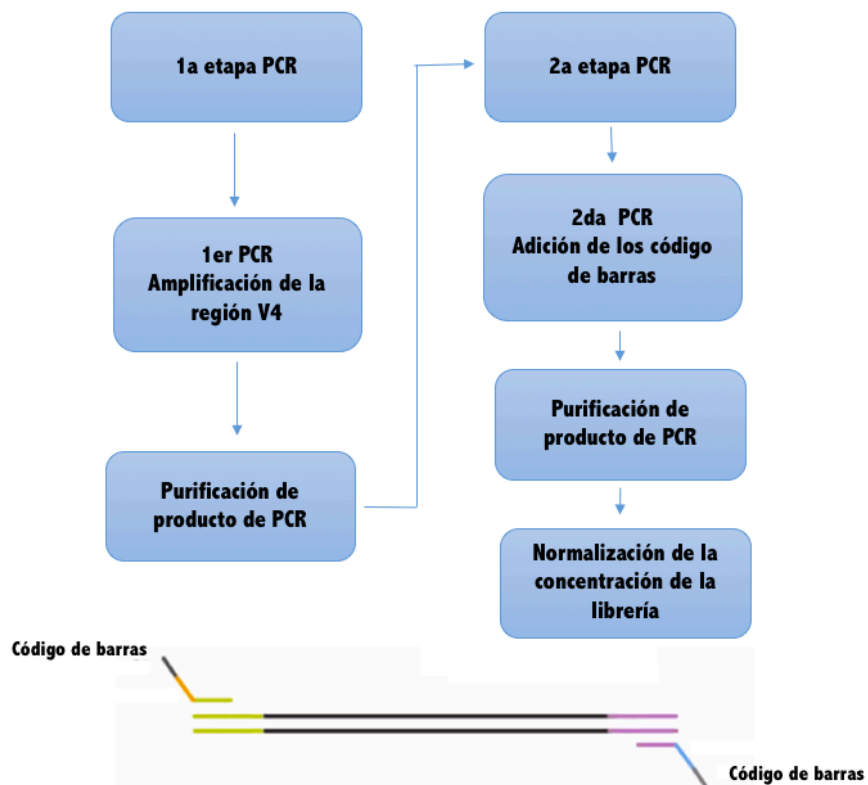


Figura 11. Protocolo de amplificación de la región V4 del gen 16s rRNA. (Modificado de Illumina Miseq system).

Cada una de las lecturas de las secuencias de la región V4 (254 pb) del gen 16s RNAr, se sometieron a un tratamiento para asegurar su calidad. Se removieron los

primers de las lecturas F1 y R2 y el código de barras, posteriormente se realizó el corte de las lecturas, seguido de la unión de ambas lecturas (F1 y R2) de cada muestra, usando fastq-join (Aronesty, 2013), para obtener amplicones con una longitud máxima de 250 par de bases los cuales se sometieron a un filtro de calidad.

Las librerías en formato *fastq* se convirtieron a formato *fasta*, y se generó una Tabla en formato BIOM (Del inglés: Biological Observation Matrix), la cual es una tabla de contingencia en un formato que puede ser reconocido por el software QIIME (Del inglés: Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Se analizaron un total de 3,217,865 secuencias de extremos emparejados utilizando QIIME v.2.0 (Caporaso et al., 2010). Se creó un archivo manifiesto (mapping file) donde se integran el código de barras, del Forward y el Reverse. La selección de unidades taxonómicas operativas (OTU) se realizó utilizando el conjunto de herramientas Qiime-tools, mediante el método UCLUST. Posterior se realizaron las agrupaciones de las lecturas de las secuencias, seguido de una comparación contra la base de datos SILVA generando una Tabla de contingencia con los OTUs establecidos, el nombre de cada muestra, el OTU y las lecturas de las secuencias. Las OTU se definieron como secuencias bacterianas con al menos un 97 % de similitud. Posteriormente, las secuencias se filtraron para eliminar las que presentaron baja calidad, quimeras, OTUs que están representados solamente por una lectura y combinación de lecturas de extremos emparejados, mediante el algoritmo de eliminación de ruido de amplicón divisivo (DADA2) (Callahan, et, al. 2016). Se exportó el archivo con el número de lecturas en un archivo denominado "OTU". Después de que los archivos de los OTUs/ASVs resultantes, se fusionaron en una Tabla general. La taxonomía se asignó de acuerdo con la taxonomía de referencia de las lecturas el cual se asignaron a nivel de dominio, filo, clase, orden, familia, género y especie, respectivamente, generando el formato de taxonomía "TAX". Los archivos generados se utilizan con el metadatos (Anexo 4) para realizar los análisis bioestadísticos.

5.6 Análisis bioinformático

Con el propósito de determinar el efecto de la sobrenutrición materna y el consumo directo de la misma por parte de la descendencia en el peso corporal, ingesta de agua y alimento, así como las concentraciones de los niveles séricos de cada analito, los datos fueron analizados mediante una ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc Bonferroni/Dunn. (StatView, SAS, Estados Unidos). Finalmente se graficaron con el programa Sigma Plot.

Para poder determinar el perfil bacteriano intestinal se analizó tanto la diversidad, como la abundancia. Dentro de las métricas de diversidad se encuentra la α , para poder determinar la diversidad dentro de las muestras se realizaron a partir de la Tabla BIOM con el comando "alpha_rarefaction.py" en QIIME, los cuales fueron el índice de Shannon para conocer la diversidad y homogeneidad de los OTUs con sus tratamientos respectivamente. Para estimar la riqueza de OTUs (diferentes tipos de especies bacterianas) en los tratamientos, se utilizó el índice de Simpson, el cual estima la riqueza y la distribución de la abundancia de las especies, detectando la dominancia de éstas y el índice de Shannon, el cual estima la equidad en la riqueza y abundancia dentro de los grupos experimentales. Se realizó a una

profundidad de 4000 lecturas, con la finalidad de evitar un sesgo por las diferentes profundidades de lecturas en cada muestra, los valores obtenidos de los análisis de las métricas Shannon, Simpson y OTUs observados, se evaluaron estadísticamente mediante Kruskal-Wallis, para determinar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Para graficar los análisis se utilizó el programa R (Anexo 5).

Para determinar la disimilitud del perfil bacteriano intestinal entre las muestras, se estimó la diversidad β , el cual se utilizaron las métricas de Bray Curtis y Jaccard. Se realizaron a partir de la tabla BIOM, en QIIME, utilizando el comando “beta_diversity_through_plots.py”, para la comparación de las comunidades microbianas en función de su tratamiento. Las matrices de distancia generadas en cada análisis de diversidad β se utilizaron para determinar el valor R, mediante una prueba PERMANOVA (Permutational analysis of variance), tal valor permite determinar la diferencia entre los grupos, a partir de las distancias generadas y representado por un valor que puede ir de 0 a 1, siendo 0 para una diferencia nula, y 1 que indica que los grupos son diferentes. Para graficar los análisis se utilizó el programa R (Anexo 6).

Para conocer la abundancia relativa bacteriana en cada grupo bajo estudio, se realizó a partir de la Tabla BIOM generada, se asignó la taxonomía a nivel de filo, familia y género, con QIIME 1.9.1, utilizando el comando “summarize_taxa_through_plots.py”, para normalizar dicha abundancia. Para graficar el análisis de abundancia se utilizó el programa R (Anexo 7).

Para saber cuáles son las bacterias diferencialmente abundantes entre los grupos bajo estudio, se realizó un análisis estadístico multivariante en el paquete LEfSe (Segata et al, 2011), con parámetros predeterminados, consultados en: [Galaxy \(harvard.edu\)](http://Galaxy.harvard.edu) (18/abril/2022), para detectar características significativas, taxonomía y abundancia de vías, que diferencian grupos y clasifican estas características por tamaño del efecto. El valor de α utilizado para la prueba factorial de Wilcoxon fue de 0,05. El umbral utilizado en la puntuación del análisis de discriminación lineal logarítmica para la característica discriminatoria fue 2.

Para el análisis de correlación de datos entre los niveles de los analitos metabólicos con las bacterias diferencialmente abundantes a nivel taxonómico género, mediante los resultados del análisis de LEfSe, se realizó la correlación de Spearman, medida de correlación o interdependencia entre dos variables aleatorias, en el programa R. Se elaboró un mapa de calor con su coeficiente de correlación y su valor- p (Anexo 8).

Resultados

6.1 Peso corporal

En cuanto al efecto de la sobrenutrición crónica materna por el consumo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos, así como el consumo de la dieta desequilibrada por parte de la descendencia en la vida adulta, la ANOVA (Grupo: $F_{(3,353)} = 1.8$, $p=0.11$) reveló que las conejas de los cuatro grupos bajo estudio presentaron un peso corporal similar entre 3.9 ± 0.4 – 4.0 ± 0.6 kg. (Figura 12).

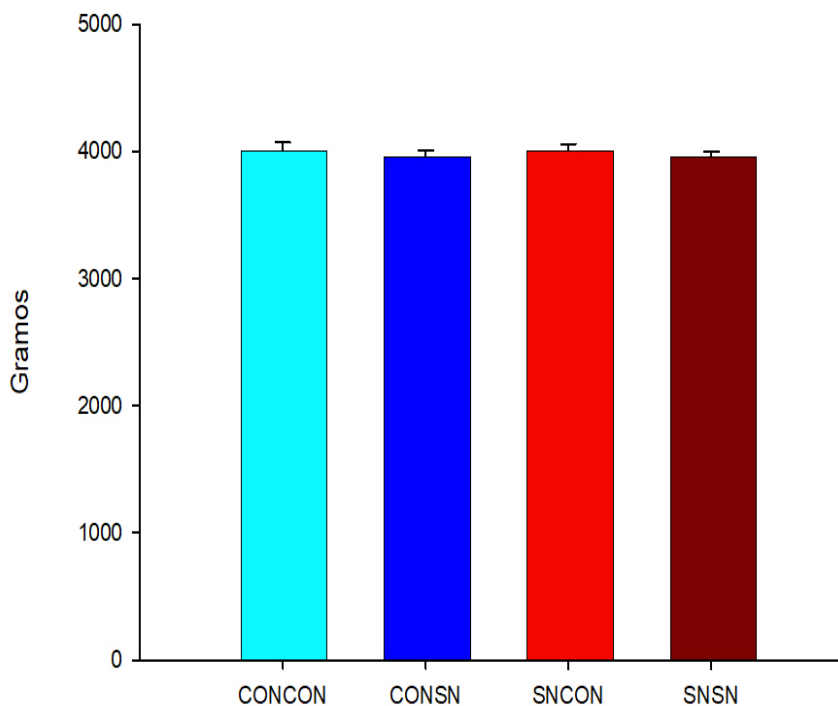


Figura 12. Promedio del peso corporal del conejo Chinchilla al término del reto metabólico. Barra azul claro (CON-CON, n=6), barra azul fuerte (CON-SN, n=6), barra rojo claro (SN-CON, n=6) y barra rojo oscuro, (SN-SN, n=6). Los valores están representados como medias $\bar{X} \pm$ E.E. El reto metabólico duro 30 días.

6.2 Ingesta de alimento, kcal y agua

En cuanto a la ingesta de agua, la ANOVA reveló cambios asociados a la condición nutricional de los animales (Grupo: $F_{(34994.056)}=15.51$, $p < 0.001$). Los animales del grupo CON-CON mostraron el mayor consumo de agua, ingiriendo 126.0 ± 5.9 ml al día, mientras que los grupos CON-SN, SN-CON y SN-SN consumieron 86.0 ± 3.1 , 115.0 ± 4.2 y 103.0 ± 3.6 ml/día, respectivamente (Figura 13a)..

Respecto al consumo de alimento, la ANOVA evidenció que no se presentó cambios significativos de la cantidad de gramos consumidos de alimento entre los grupos bajo estudio (Grupo: $F_{(1753.4)}=1.69$, $p=0.16$). Los animales pertenecientes a los cuatro grupos bajo estudio consumieron un promedio de alimento entre 69 ± 2.5 – 77.5 ± 3.3 g (Figura 13 b).

En la ingesta de kcal provenientes de los carbohidratos, fueron identificados cambios significativos entre los grupo de animales (Grupo: $F_{(12584.22)}=6.18$, $p < 0.001$). Los animales del grupo CON-CON consumieron un promedio de 98.5 ± 4.2 kcal/día, mientras que los animales que se sometieron al reto metabólico, el grupo CON-SN y SN-SN consumieron significativamente más kcal, con un promedio de 104 ± 4.6 y 109 ± 4.1 kcal/día, respectivamente. Mientras que los animales del grupo SN-CON mostraron una disminución significativa en el consumo de kcal/carbohidratos respecto al grupo CON-CON, con un promedio de 86 ± 3.1 kcal/día. (Figura 13 c).

De forma similar en la ingesta de kcal aportadas por los lípidos fueron observados cambios entre los grupos bajo estudio (Grupo: $F_{(2246.80)}=94.47$, $p < 0.001$). Los animales pertenecientes al grupo CON-CON consumieron un promedio de 6.5 ± 0.3 kcal/día. Similar a los animales del grupo SN-CON tuvieron un consumo de 5.8 ± 0.2 kcal/día, como era de esperar los animales que se sometieron al reto metabólico, el grupo CON-SN y SN-SN aumentaron su ingesta significativamente en la ingesta de kcal aportados por los lípidos, con un promedio de 13.3 ± 0.6 y 13.6 ± 0.5 kcal/día, respectivamente (Figura 13 d).

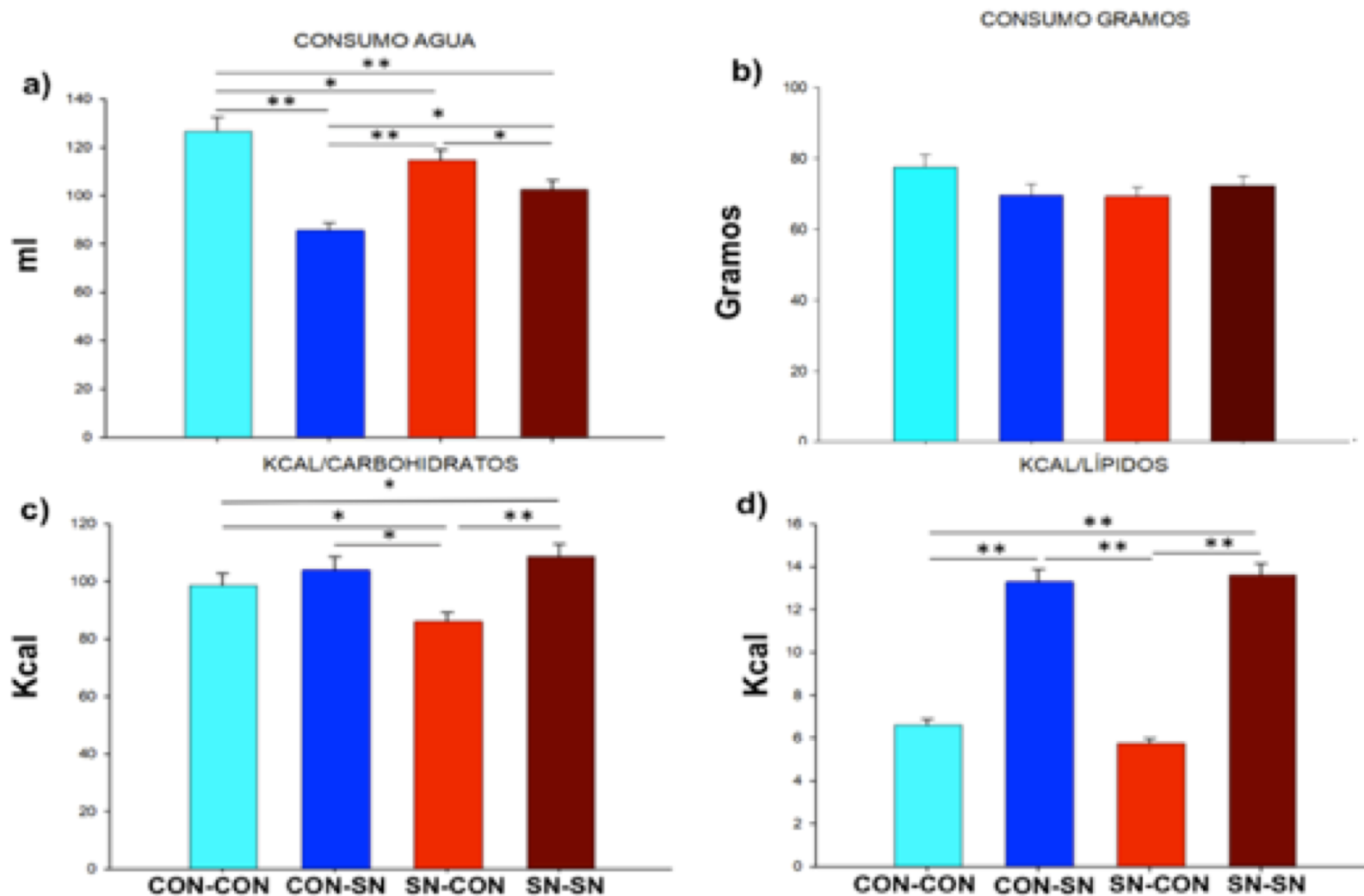


Figura 13. Promedio de la ingesta de agua, alimento y Kcal de conejos Chinchilla en la edad adulta después del reto metabólico. a) Promedio de consumo de agua. b) Promedio consumo de alimento en gramos. c) Promedio de consumo de kcal provenientes de carbohidratos y d) Promedio de consumo de kcal provenientes de los lípidos. Barra azul claro (CON-CON), barra azul fuerte (CON-SN), barra rojo claro (SN-CON) y barra rojo oscuro (SN-SN). Los valores están representados como medias \pm E.E. Los asteriscos representan la significancia estadística entre los grupos experimentales * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

6.3 Perfil metabólico

En relación a los niveles séricos de GLU (Figura 12 a), TG (Figura 12 b) y NEFA (Figura 14c) la ANOVA reveló que no se presentaron cambios significativos asociados a la condición nutricional de los animales (GLU: Grupo: $F_{(173.98)}=0.82$, $p=0.49$; TG: Grupo: $F_{(158.32)}=0.65$, $p=0.58$; NEFA: Grupo: $F_{(254.19)}=0.83$, $p=0.49$).

Por el contrario, en los niveles séricos de COL, HDL y LDL la ANOVA reveló cambios significativos en los niveles de estos analitos por el consumo de la dieta desequilibrada en la descendencia proveniente de madres sobrenutridas y por el consumo directo de la misma. En los niveles de COL (Grupo: $F_{(34676.73)}=5.58$, $p<0.05$), los niveles séricos promedio en ayuno de este metabolito en el grupo CON-CON fueron de 47.8 ± 6.4 mg/dl, un rango similar fue observado en el grupo SN-CON de 44.8 ± 2.2 mg/dl. En contraste, el grupo CON-SN y SN-SN mostraron un incremento significativo en los niveles de COL con un promedio de 126.1 ± 24.8 mg/dl. y 210.0 ± 68.4 mg/dl, respectivamente, respecto al grupo CON-CON (Figura 14 d). De forma similar los niveles séricos de LDL (Grupo: $F_{(4698.35)}=5.15$, $p<0.05$), el grupo CON-CON los niveles séricos promedio en ayuno fueron de 9.1 ± 3.2 mg/dl, y en el grupo SN-CON fue de 5.5 ± 0.6 mg/dl; mientras que los animales sometidos al reto metabólico, los grupos CON-SN y SN-SN aumento significativamente los niveles de LDL respecto al grupo CON-CON, con un promedio de 51.8 ± 18.8 y 55.8 ± 17.2 mg/dl, respectivamente (Figura 14f).

En relación a los niveles séricos de HDL, el análisis de varianza mostró cambios significativos en los niveles de este analito por el consumo de la dieta desequilibrada, (Grupo: $F_{(322.41)}=3.65$, $p<0.05$). Los animales pertenecientes al grupo CON-CON los niveles séricos promedio en ayuno fueron de 40.7 ± 5.7 mg/dl. La sobrenutrición materna durante la gestación (grupo SN-CON) produjo una disminución significativa de los niveles de HDL respecto al grupo CON-CON, con un promedio 28.2 ± 2.5 mg/dl. El reto metabólico (grupo CON-SN) también indujo una disminución significativa de HDL respecto al grupo CON-CON, con un promedio de 24.7 ± 4.0 mg/dl. De igual forma el grupo de conejos obtenidos de hembras sobrenutridas y que adicionalmente fueron sometidas el reto metabólico (grupo SN-SN), mostraron una disminución significativa respecto al grupo CON-CON, con un promedio de 26.2 ± 1.8 mg/dl (Figura 14e).

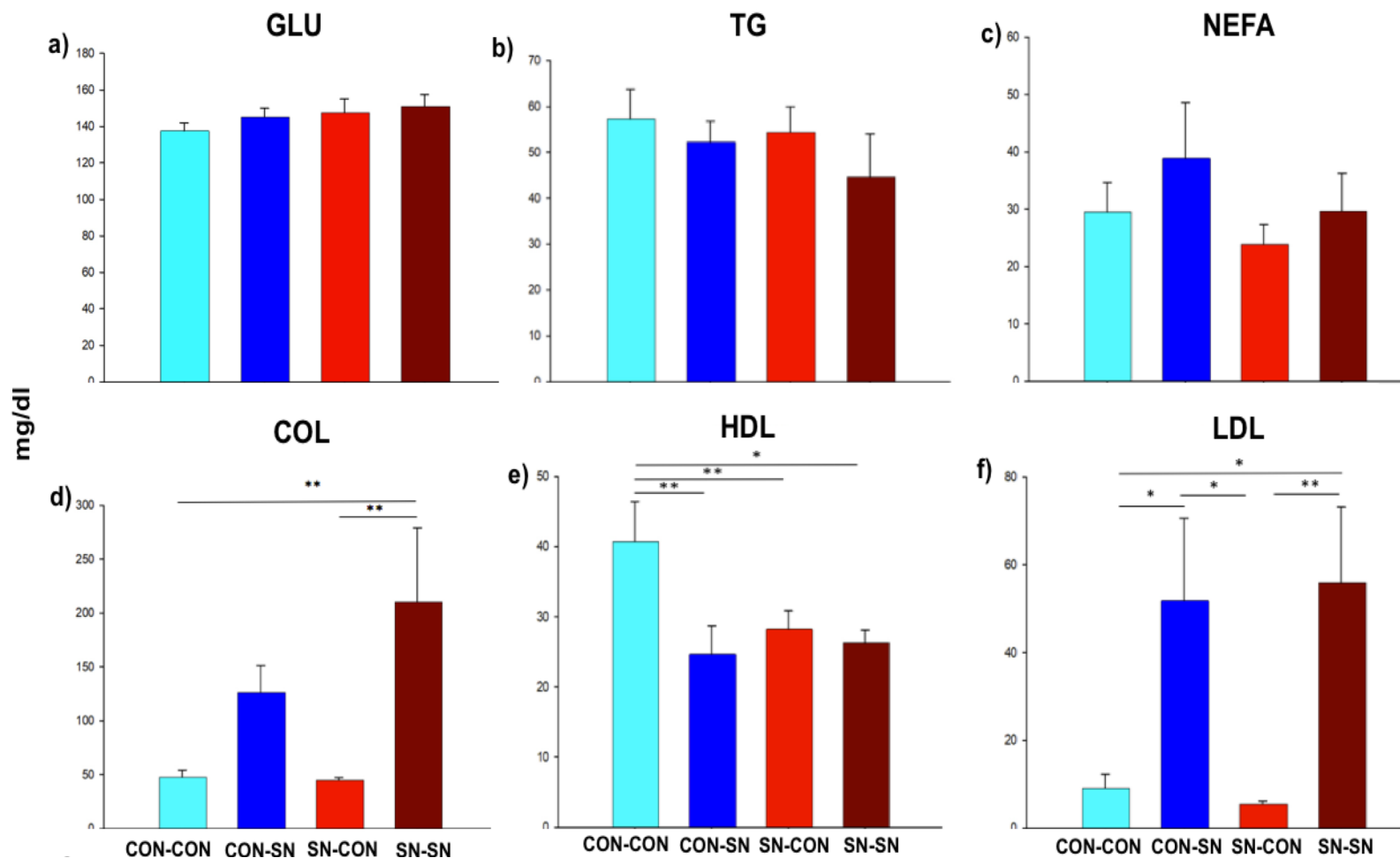


Figura 14. Perfil metabólico en conejos Chinchilla después de consumir la dieta desequilibrada. a) Promedio de GLU. b) Promedio de TG. c) Promedio de NEFA. d) Promedio de COL. e) Promedio de HDL. f) Promedio de LDL. Barras azules claro (CON-CON), barras azules fuerte (CON-SN), barras rojas claro (SN-CON) y barras rojas oscura (SN-SN). Los valores están representados como medias \pm E.E. Los asteriscos representan la significancia estadística entre los grupos experimentales * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

6.4 Perfil bacteriano intestinal: Diversidad α

Para conocer el efecto de la sobrenutrición materna por el consumo de dietas altas en lípidos y carbohidratos, así como una segunda exposición a la dieta en la edad adulta sobre el perfil bacteriano intestinal, se secuenció el gen 16s RNAr del contenido cecal de los animales pertenecientes a los grupos bajo estudio, para evaluar el efecto de dichas dietas mediante las métricas de diversidad y abundancia.

Se evaluó la diversidad α dentro de los grupos experimentales mediante 3 índices OTUs observados, Shannon y Simpson. En el primero de estos, OTUs observados (Figura 15a), los cuatro grupos bajo estudio presentaron una riqueza bacteriana similar ($p= 0.85$), entre 345-450. Respecto al índice de Shannon (Figura 15b) y el índice de Simpson (Figura 15c), los grupos mostraron tendencias similares (Shanon: $p=0.48$; Simpson: $p= 0.25$). Por lo que los grupos bajo estudio presentaron una equidad bacteriana similar.

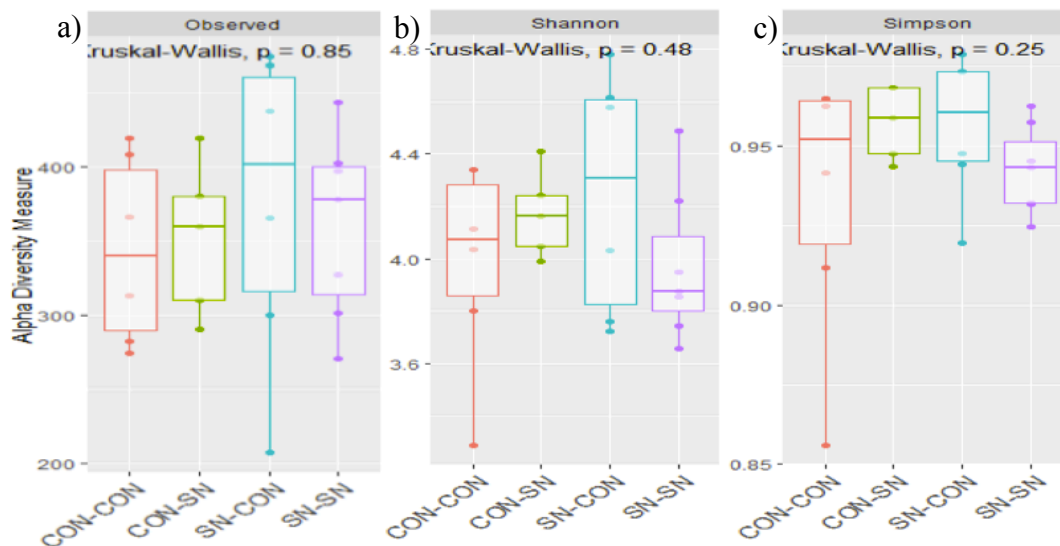


Figura 15. Diversidad α en conejos Chinchilla. a) OTUs observados, b) Índice de Shannon y c) Índice de Simpson. Barra roja (CON-CON), barra verde (CON-SN), barra azul claro (SN-CON) y barra morada (SN-SN). Los valores están representados como medias \pm E.E.

6.5 Perfil bacteriano intestinal: Diversidad β

Para determinar el efecto asociado a la sobrenutrición materna y/o reto metabólico sobre la diversidad bacteriana intestinal, se realizó el análisis de la diversidad β , el cual estima la disimilitud entre las muestras. De acuerdo con la PERMANOVA, reveló cambios significativos en la diversidad bacteriana por el efecto de sobrenutrición materna y el consumo directo de la dieta desequilibrada (Grupo: $F_{(0.3747)}=1.24$, $R^2= 14.9\%$, $p < 0.05$) y por sexo (Grupo: $F_{(0.65635)}=2.17$, $R^2= 8.7\%$; $p < 0.001$). Se utilizó la métrica de Jaccard entre los grupos experimentales, el cual estima la composición del perfil bacteriano intestinal ya que evalúa si hay presencia o ausencia de ciertas bacterias intestinales entre los grupos experimentales (Figura 16).

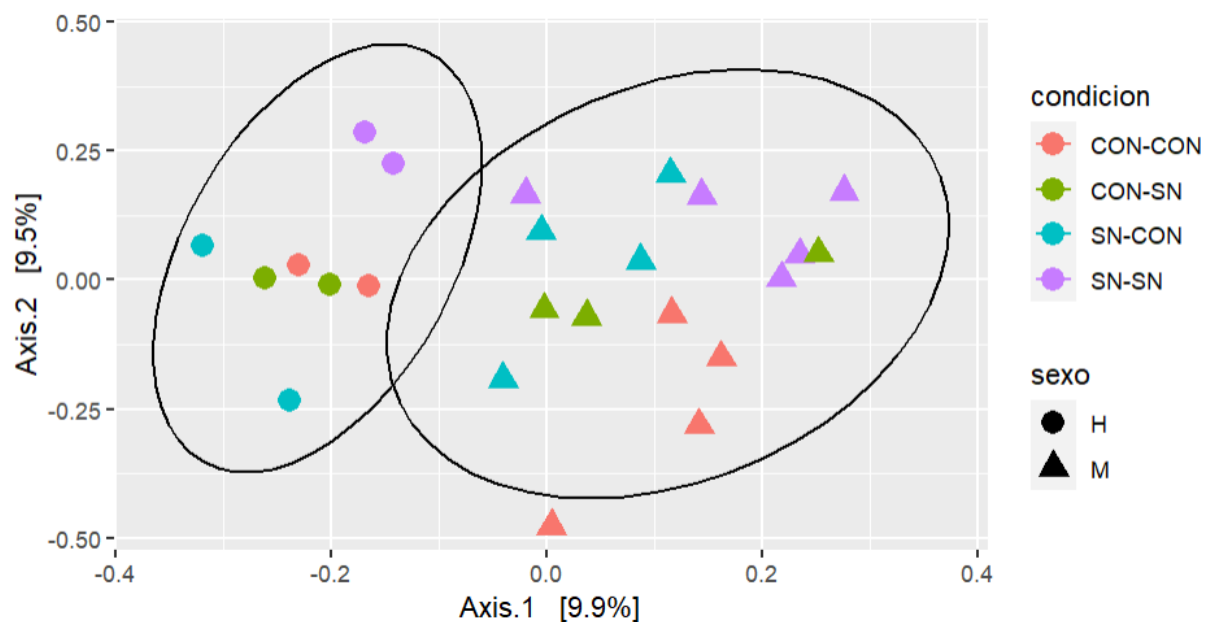


Figura 16. Diversidad β mediante la métrica Jaccard en conejos Chinchilla. Color rojo (CON-CON), color verde (CON-SN), el color azul (SN-CON) y el color morado (SN-SN). Los círculos representan a las hembras y los triángulos a los machos.

Además, la PERMANOVA reveló cambios significativos mediante la métrica Bray Curtis, el cual pondera por abundancia relativa, la diversidad bacteriana por el consumo de la dieta desequilibrada (Grupo: $F_{(0.29080)}=1.42$, $R^2= 16.2\%$, $p < 0.05$) y por sexo (Grupo: $F_{(0.62000)}=3.03$, $R^2= 11.5\%$; $p < 0.001$) (Figura 17). Por lo que la sobrenutrición materna y/o el reto metabólico son causantes de una disimilitud en la diversidad tanto en la composición, como en la abundancia del perfil bacteriano intestinal.

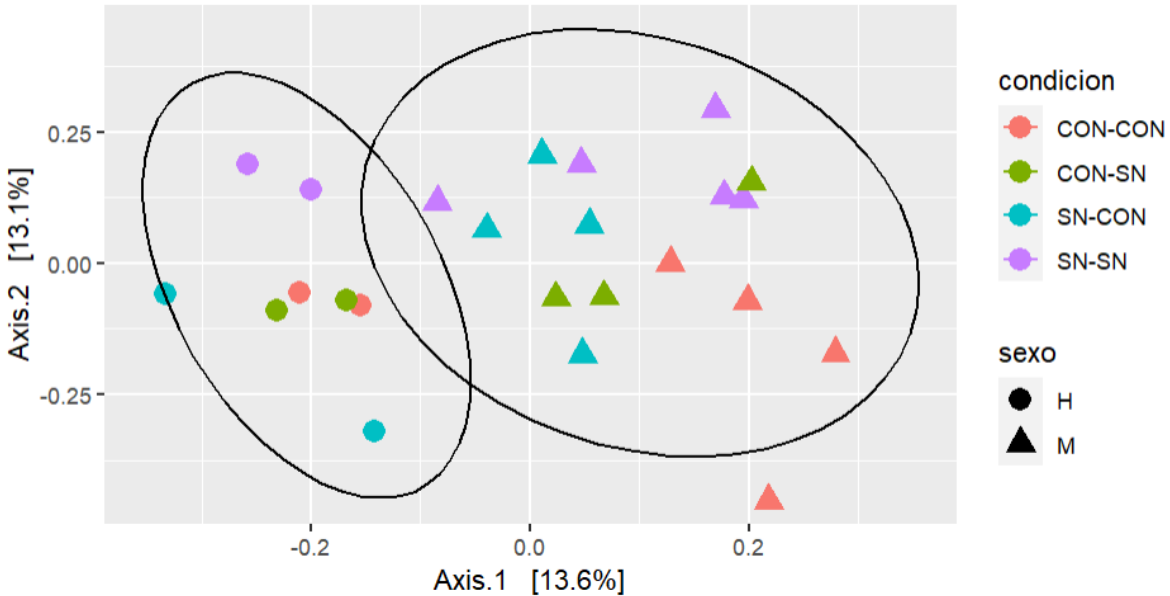


Figura 17. Diversidad β mediante la métrica Bray Curtis en conejos Chinchilla. Color rojo (CON-CON), color verde (CON-SN), color azul (SN-CON) y color morado (SN-SN). Los círculos representan a las hembras y los triángulos a los machos.

6.6 Perfil bacteriano intestinal: Abundancia relativa

Nivel taxonómico *Filo*

El análisis de taxonomía reveló que la sobrenutrición materna, así como el consumo directo de la dieta desequilibrada tiene efecto en la abundancia del perfil bacteriano intestinal. A nivel de *Filo* (Figura 18), los *Firmicutes* fueron los más abundantes, en el grupo CON-CON fue de 48.4%, en el grupo CON-SN fue de 57.7%, mientras que el grupo SN-CON fue de 57.8% y en el grupo SN-SN fue de 43.8%. Seguido de *Bacteroidota*, en el grupo CON-CON se presentó en 35.2 %, el consumo de la dieta desequilibrada provocó una ligera disminución de la abundancia relativa de dichas bacterias, en los grupos CON-SN (30.3%), SN-CON (30.0 %) y SN-SN (33.0%). El tercer *Filo* más abundante fue *Verricomicrobiota*, en el grupo CON-CON presentó una abundancia de 11.4%, los grupos CON-SN y SN-CON mostraron una disminución de este filo (abundancia fue de 4.6% y 7.9%, respectivamente), mientras que el grupo SN-SN mostraron un ligero incremento (16.5%). Respecto al *Filo* Proteobacteria, todos los grupos mostraron abundancias similares entre el 1.2 -1.7% (Figura 18). En el grupo CON-CON la abundancia relativa fue de $1.5 \pm 1.5\%$, en el grupo CON-SN fue de $1.7 \pm 0.02\%$, en el grupo SN-CON de $1.2 \pm 0.06\%$ y en el grupo SN-SN de $1.4 \pm 0.06\%$.

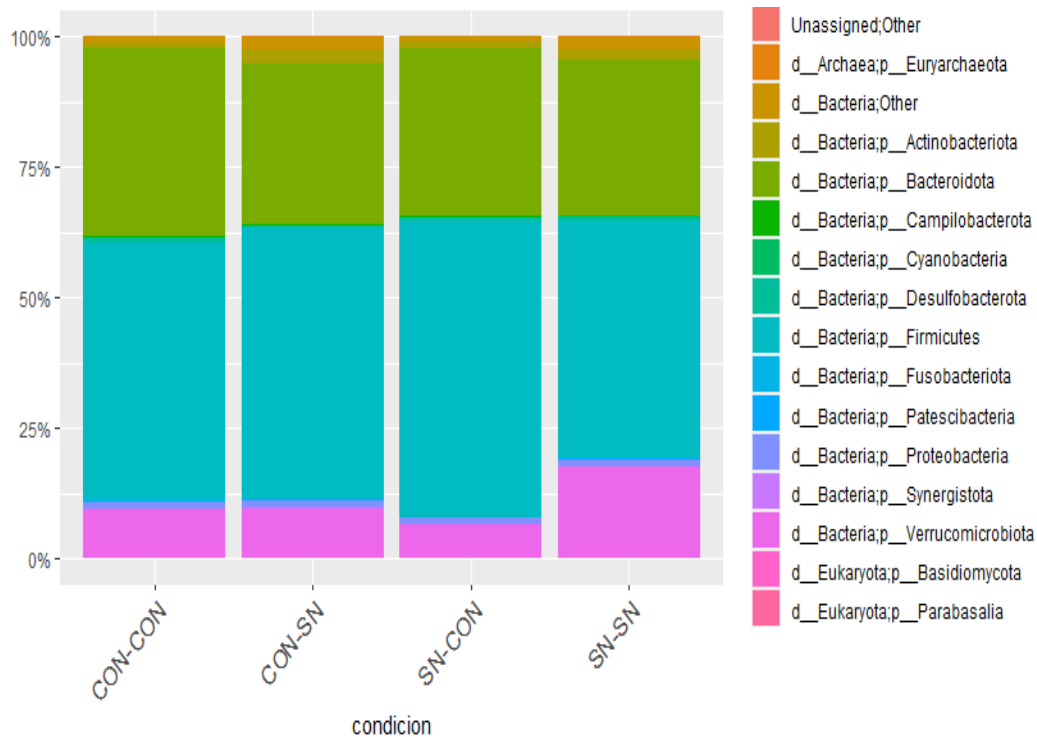


Figura 18. Abundancia relativa del perfil bacteriano intestinal a nivel taxonómico *Filo* en conejos europeo. Se esquematiza los 15 Filos más representativos ordenados de acuerdo con los grupos bajo estudio. Conejos provenientes de madres que consumieron una dieta estándar en la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (CON-CON), conejos obtenidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta desequilibrada (CON-SN), conejos obtenidos de madres que consumieron una dieta desequilibrada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y conejos originarios de madres que consumieron una dieta desequilibrada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la misma dieta (SN-SN).

Nivel taxonómico *Familia*

A nivel de Familia, la Bacteroidaceae fue el más abundante (Fig. 19); todos los grupos bajo estudio mostraron una abundancia entre el 14.9 – 18.5%. Seguido de la Familia Lachnospiraceae, el cual en el grupo CON-CON mostró una abundancia del 13.9%, la sobrenutrición materna y/o reto metabólico causó un incremento de esta familia cuya abundancia fue del 19.6% en el grupo CON-SN, 20.2% en el grupo SN-CON fue de $20.2 \pm 7.9\%$ y 17.5% en el grupo SN-SN. En tercer lugar de abundancia estuvo la Familia Oscillospiraceae, donde en el grupo CON-CON presentaron una abundancia del 11.9%, en el grupo CON-SN fue de 16.3%, en el grupo SN-CON del 13.5% y en el grupo SN-SN del 9.8%. En cuarto nivel de abundancia estuvo la Familia Akkermansiaceae, en el grupo CON-CON mostró un 11.3% de abundancia de esta familia, los grupos CON-SN y SN-CON mostraron una

disminución mostrando una abundancia del 4.6 y 7.9%, respectivamente, mientras que el grupo SN-SN mostró un incremento con una abundancia del 16.5%. Por último, la Familia Clostridia_vadinBB60 presentó una abundancia similar en los grupos CON-CON, CON-SN y SN-CON con un 10.2, 7.4 y 9.4%, respectivamente, en contraste el grupo SN-SN mostró una disminución marcada de esta familia con una abundancia del 3.4%.

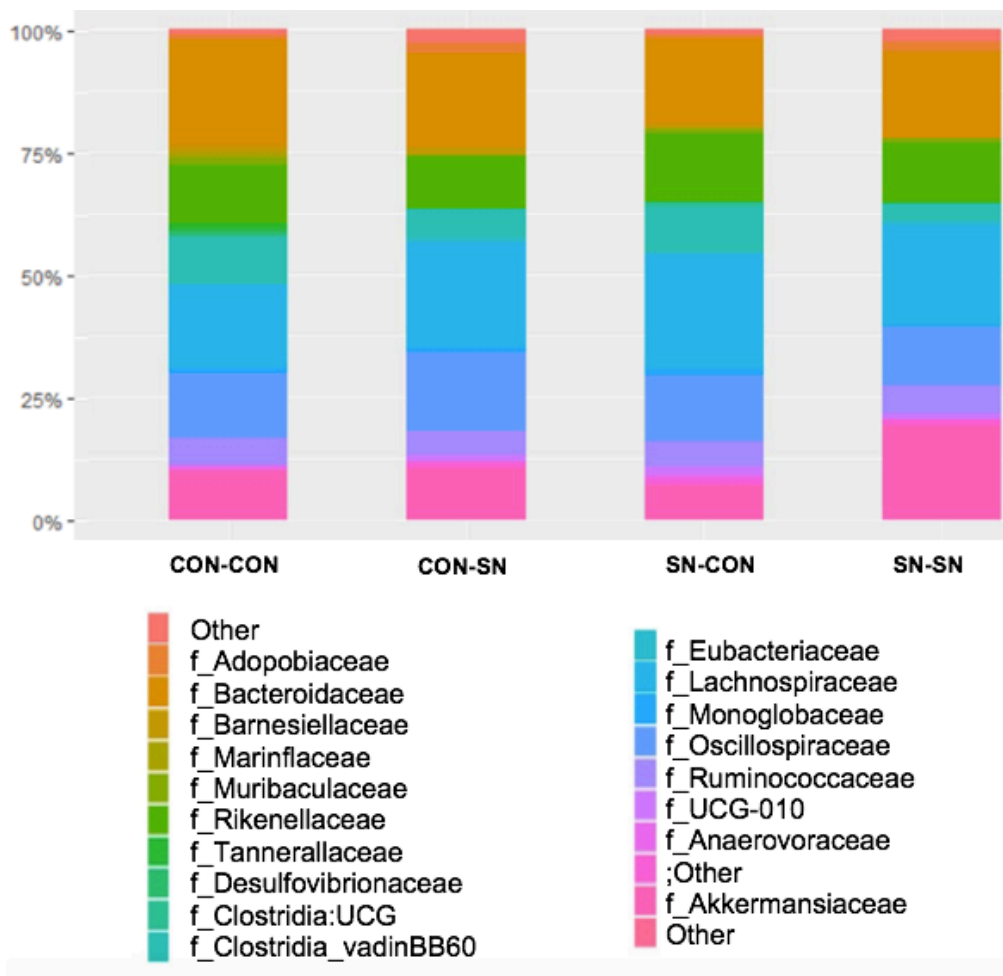


Figura 19. Abundancia relativa del perfil bacteriano intestinal a nivel taxonómico *Familia* en conejos europeos. Se esquematiza las 20 Familias más representativas, ordenados de acuerdo con los grupos experimentales. Conejos provenientes de madres que consumieron una dieta estándar en la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (CON-CON), conejos obtenidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta desequilibrada (CON-SN), conejos obtenidos de madres que consumieron una dieta desequilibrada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y conejos originarios de madres que consumieron una dieta desequilibrada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la misma dieta (SN-SN).

Nivel taxonómico Género

A nivel de Género, *Bacteroides* mostró una abundancia similar en todos los grupos bajo estudio del 14.9 – 18.5% (Figura 20). Seguido de *Lachnospiraceae* con una abundancia del $12.8 \pm 6.8\%$ en el grupo CON-CON, este género mostró mayor abundancia en los grupos CON-SN, SN-CON y SN-SN del 18.2, 19 y 16.3%, respectivamente. El género *Akkermansia* mostró una abundancia del 11.3% en el grupo CON-CON, en los grupos CON-SN y SN-CON mostraron una disminución en su abundancia alcanzando el 4.6 y 7.9%, respectivamente; por el contrario en el grupo SN-SN este género se incrementó alcanzando una abundancia del 16.5%. El género *Clostridia vadinBB60* mostró una abundancia similar del 7.4 – 10.2% en los grupos CON-CON, CON-SN y SN-CON, mientras que en el grupo SN-SN este género mostró una disminución alcanzando una abundancia de tan solo el 3.4%. Por último, un género perteneciente a la familia *Oscillospiraceae*, presentó una abundancia del 6% en los grupos CON-CON, SN-CON y SN-SN, mostrando un incremento en el grupo CON-SN alcanzando el 11.5%.

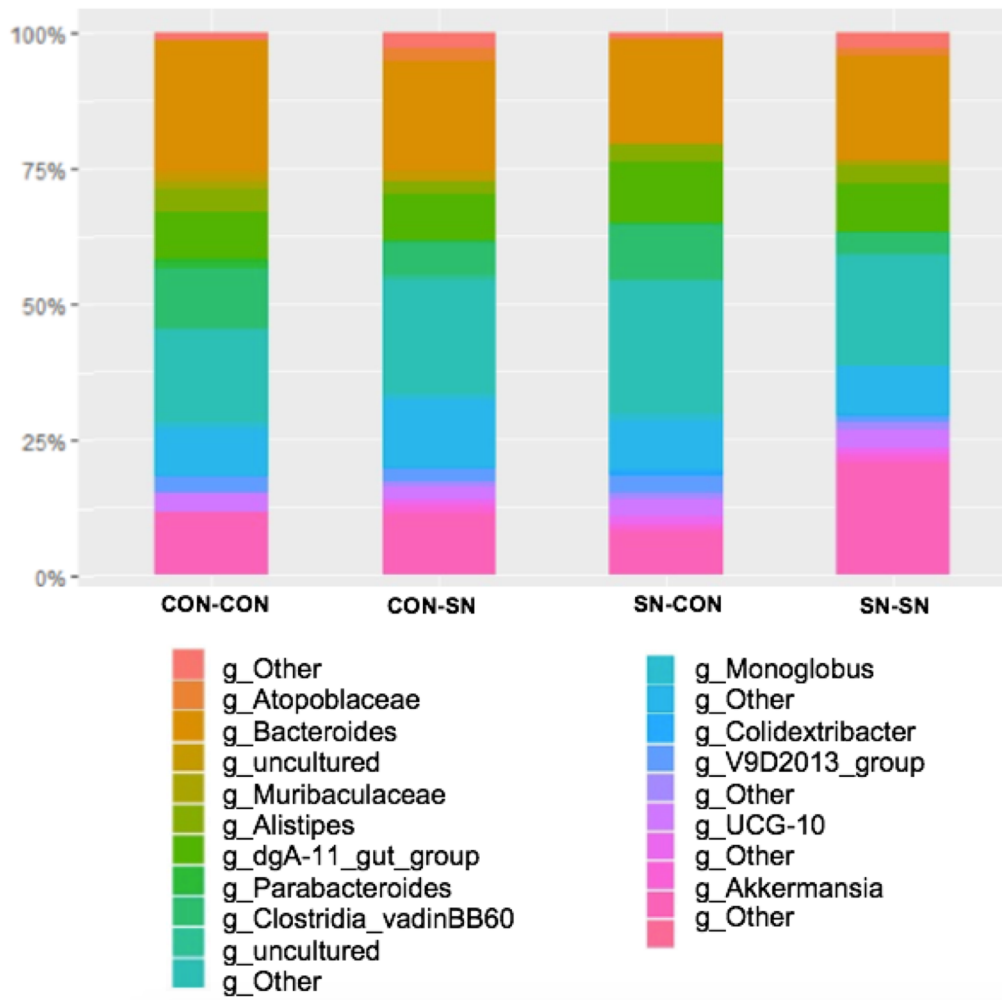


Figura 20. Abundancia relativa del perfil bacteriano intestinal a nivel taxonómico *Género* en conejos europeos. Se esquematiza los 20 Géneros más representativos, ordenados de acuerdo con los grupos experimentales. Conejos provenientes de madres que consumieron una dieta estándar en la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (CON-CON), conejos obtenidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta desequilibrada (CON-SN), conejos obtenidos de madres que consumieron una dieta desequilibrada durante la gestación y posnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y conejos originarios de madres que consumieron una dieta desequilibrada durante la gestación y posnatalmente tuvieron una segunda exposición a la misma dieta (SN-SN).

El consumo de dietas desequilibradas durante la gestación, así como el consumo directo de la misma por parte de la descendencia en la vida adulta, provocó diferencias en la abundancia en el nivel taxonómico *Filo*, *Familia* y *Género*, acentuándose en los animales que tuvieron las dos exposiciones a la dieta alta en carbohidratos y lípidos.

6.7 Perfil bacteriano intestinal: Bacterias diferencialmente abundantes

Para conocer el efecto que tiene el consumo de la dieta desequilibrada, se aplicó el análisis lineal discriminante (LDA) que utiliza método el tamaño del efecto (Lefse) para comparar las bacterias diferencialmente abundantes entre los grupos experimentales CON-CON y CON-SN. El grupo CON-CON presentó dos clados bacterianos, bacterias pertenecientes al género *Rikenellaceae* y *Frisingicoccus* respecto al grupo que consumió la dieta desequilibrada, CON-SN. A su vez, consumo de la dieta desequilibrada produjo un incremento en la abundancia de seis clados bacterianos, quienes destacan a nivel del *Filo Proteobacteria*, así como de los géneros *Subdoligranulum*, *Eubacterium_ventriosum* y bacterias que aún no se han reconocido (Figura 21a, b).

Para conocer el efecto de la sobrenutrición materna, se realizó el análisis lineal discriminante entre los grupos CON-CON y SN-CON. El LDA reveló que el grupo CON-CON presentó bacterias diferencialmente abundantes pertenecientes al filo, clase, orden, familia y género de *Campylobacterota* comparado con el grupo SN-CON. Los animales provenientes de madres sobrenutridas presentaron un incremento de bacterias pertenecientes al orden, familia y género de *Christensenellales*, además de los géneros *Parvibacter* y *Subdoligranulum* comparado con el grupo CON-CON Figura 22a, b).

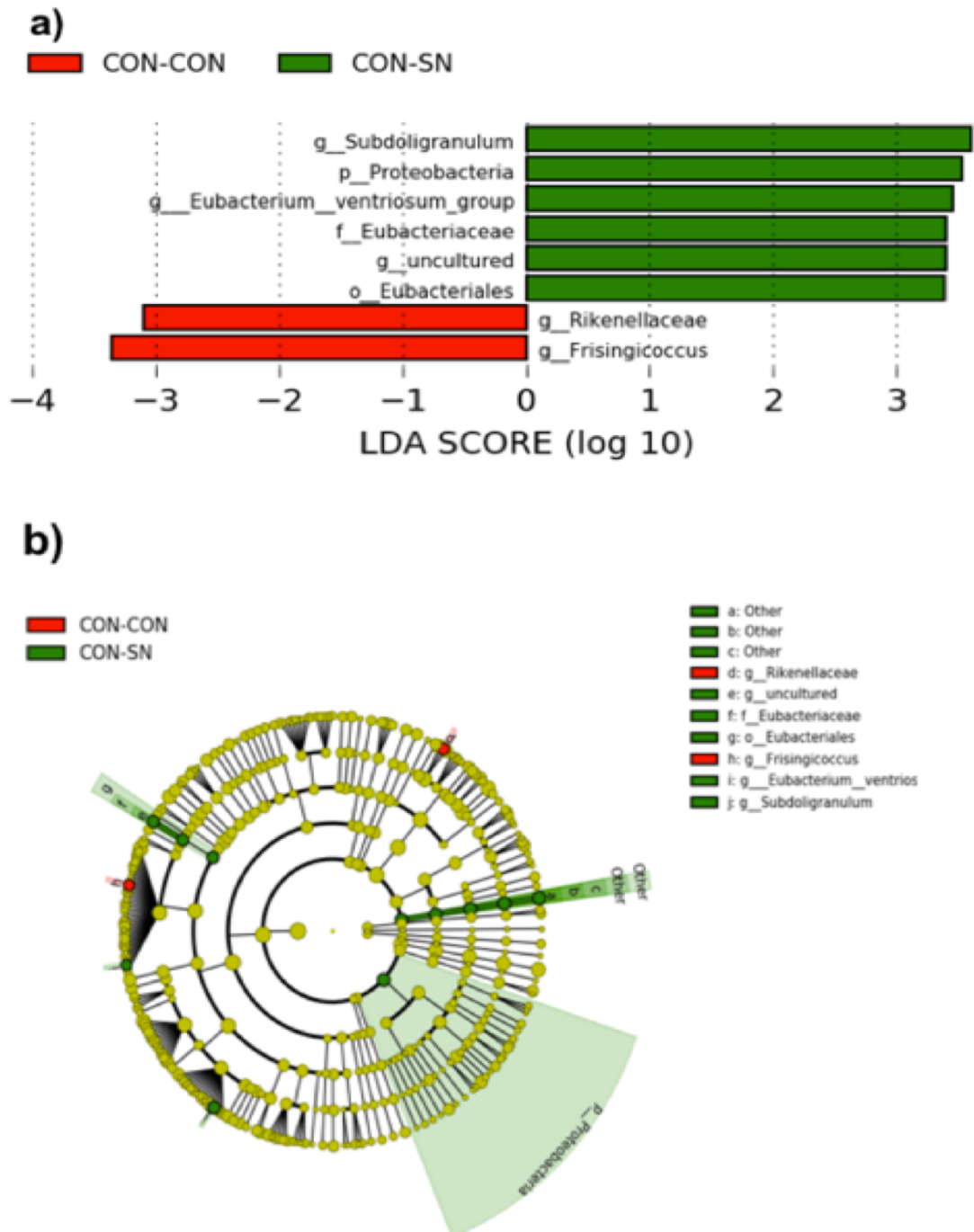


Figura 21. Análisis lineal discriminante por tamaño del efecto (Lefse) en conejos europeos. a) Análisis lineal discriminante comparando a los grupos experimentales **CON-CON** y **CON-SN**. Las barras rojas representan los clados bacterianos más abundantes en el grupo CON-CON. Las barras verdes representan los clados bacterianos más abundantes en el grupo CON-SN. b) Cladograma derivado de LEfSe que representa nodos dentro de la jerarquía taxonómica bacteriana intestinal. Los filios significativos están etiquetados con letras pertenecientes de acuerdo con el nivel taxonómico (p=filo, o=orden, f=familia y g=género).

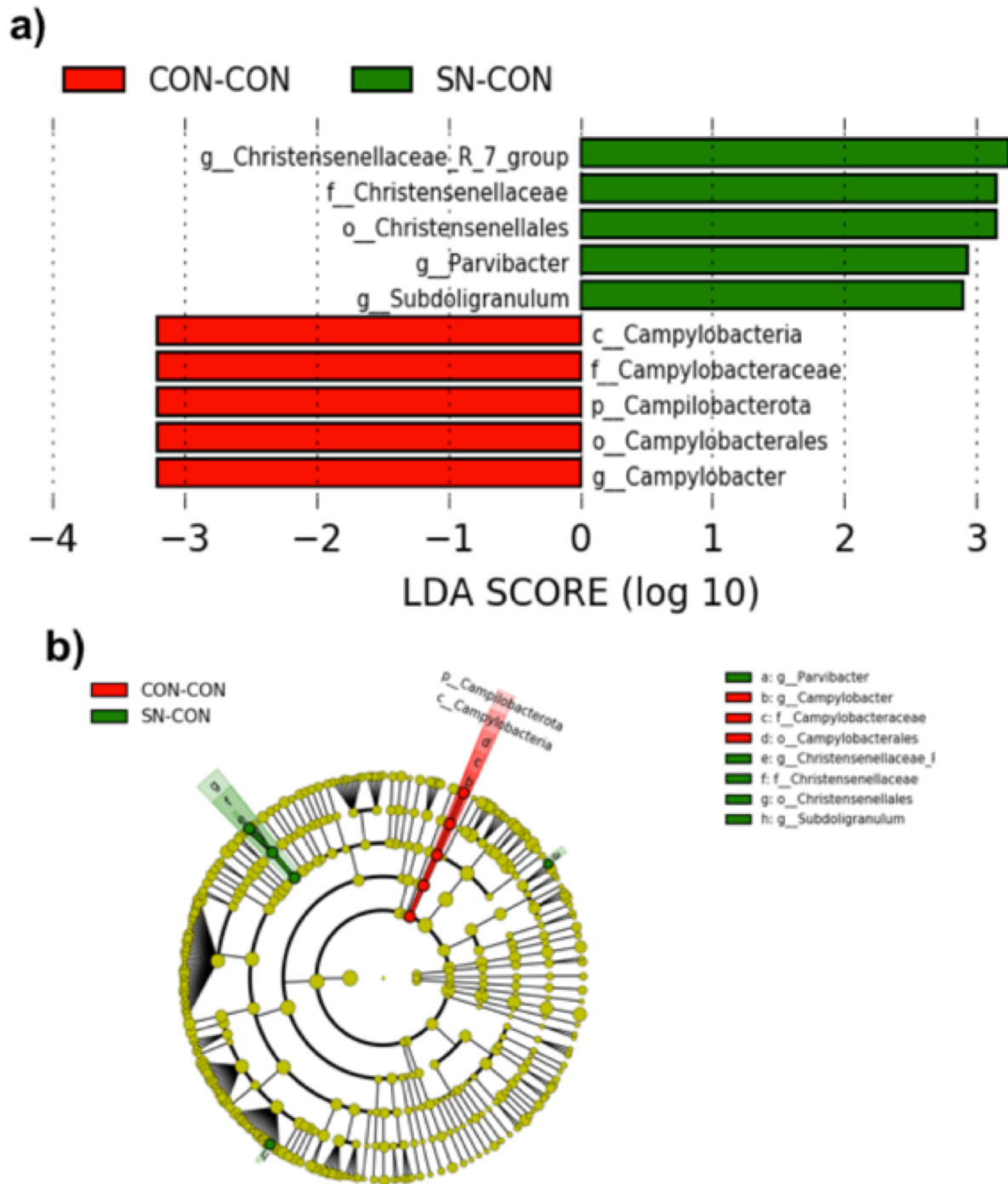


Figura 22. Análisis lineal discriminante por tamaño del efecto (Lefse) en conejos europeos. a) Análisis lineal discriminante comparando a los grupos experimentales CON-CON y SN-CON. Las barras rojas representan los clados bacterianos más abundantes en el grupo CON-CON. Las barras verdes representan los clados bacterianos más abundantes en el grupo SN-CON. b) Cladograma derivado de LefSe que representa nodos dentro de la jerarquía taxonómica bacteriana intestinal en conejos europeos.

Para conocer el efecto de la sobrenutrición materna, aunado a una segunda exposición por parte de la descendencia, se realizó LDA entre los grupos CON-CON y SN-SN, revelando que el grupo CON-CON presentó 18 clados taxonómicos diferencialmente abundantes respecto al grupo SN-SN, los cuales incluyen bacterias pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Butyricimonas*, *Hexamastix*, *Clostridium methylopentosum*, *Intestinimonas* y *Frisingicoccus*. Mientras que el grupo SN-SN presentó 11 clados taxonómicos diferentes respecto al grupo CON-CON, incrementando la abundancia de bacterias pertenecientes principalmente a los géneros *Akkermansia*, *Shuttleworthia*, UCG 005 y *Subdoligranulum* (Figura 23a, b).

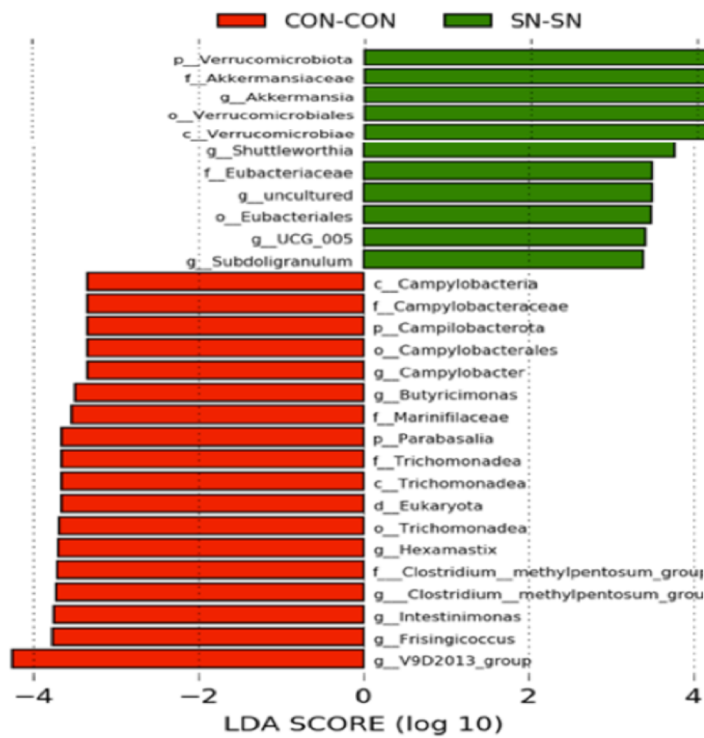
6.8 Perfil bacteriano intestinal: Alteraciones en abundancia relativa

De acuerdo con el análisis lineal discriminante para distinguir las bacterias que fueron diferencialmente abundante a nivel taxonómico de *Género* entre los 4 grupos bajo estudio, reveló ocho bacterias; *Subdoligranulum*, *Akkermansia*, *Clostridium methylopentosum*, *Campylobacter*, *Frisingicoccus*, *Hexamastix*, *Rikenellaceae* y *Eubacterium ventriosum*. Para conocer la abundancia relativa de las bacterias detectadas, se graficaron de acuerdo con los grupos bajo estudio (Figura 24).

Referente a *Akkermansia*, la sobrenutrición materna (SN-CON) produjo una disminución de la abundancia de esta bacteria con $7.401 \pm 5.137\%$ en comparación con el grupo CON-CON con un $9.871 \pm 7.667\%$, el consumo de la dieta desequilibrada en la vida adulta no tuvo efectos en la abundancia de *Akkermansia*, indicado por las estrechas similitudes los grupos CON-CON y CON-SN con $8.728 \pm 0.454\%$, interesantemente la sobrenutrición materna aunado al reto metabólico (SN-SN) incremento la abundancia relativa de *Akkermansia* con $18.282 \pm 4.496\%$ respecto al grupo CON-SN ($p < 0.05$). De manera similar, el incremento de la abundancia de *Rikenellaceae* en el grupo SN-SN fue de $0.514 \pm 0.331\%$ y fue estadísticamente mayor comparado con el grupo CON-SN, el cual presentó una abundancia de $0.041 \pm 0.072\%$ ($p < 0.05$). Simultáneamente, la sobrenutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desequilibrada, en el grupo SN-SN incrementó la abundancia *Subdoligranulum* con $0.342 \pm 0.336\%$ respecto al grupo CON-CON con $0.003 \pm 0.004\%$ ($p < 0.05$). De acuerdo con *Eubacterium ventriosum*, incremento la abundancia de manera significativa el consumo de la dieta desequilibrada con $0.118 \pm 0.048\%$ (CON-SN) comparado con el grupo CON-CON con $0.049 \pm 0.048\%$ ($p < 0.05$).

Por el contrario, el consumo de la dieta desequilibrada durante la gestación y en la edad adulta, por parte de la descendencia, redujo la abundancia de *Campylobacter*, *Hexamastix* y *Clostridium methylopentosum* con 0.115 ± 0.150 , 0.009 ± 0.002 y $0.006 \pm 0.009\%$ respectivamente, comparado con el grupo CON-CON, con 0.337 ± 0.240 , $0.014 \pm 0.001\%$ y $0.053 \pm 0.059\%$ respectivamente ($p < 0.05$). De manera peculiar, *Frisingicoccus* solo se disminuyó de manera significativa cuando los animales tuvieron un consumo directo de la dieta desequilibrada (CON-SN) con $0.082 \pm 0.059\%$, comparado con el grupo CON-CON con $0.163 \pm 0.026\%$ ($p < 0.05$).

a)



b)

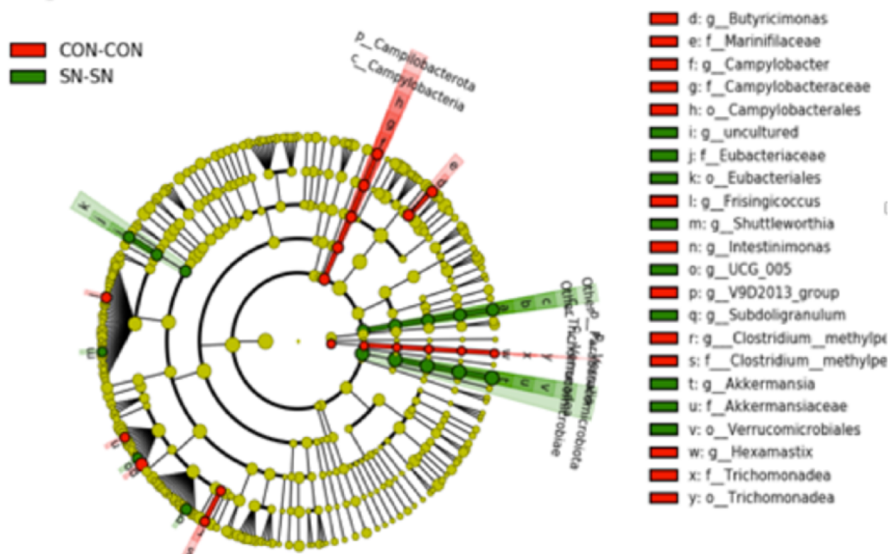


Figura 23. Análisis lineal discriminante por tamaño del efecto (Lefse) en conejos europeos. a) Análisis lineal discriminante comparando a los grupos experimentales **CON-CON** y **SN-SN**. Las barras rojas representan los clados bacterianos más abundantes en el grupo CON-CON. Las barras verdes representan los clados bacterianos más abundantes en el grupo SN-SN. b) Cladograma derivado de LEfSe que representa nodos dentro de la jerarquía taxonómica bacteriana intestinal en conejos europeos. Los filios significativos están etiquetados con letras pertenecientes de acuerdo al nivel taxonómico (p=filo, o=orden, f=familia y g=género).

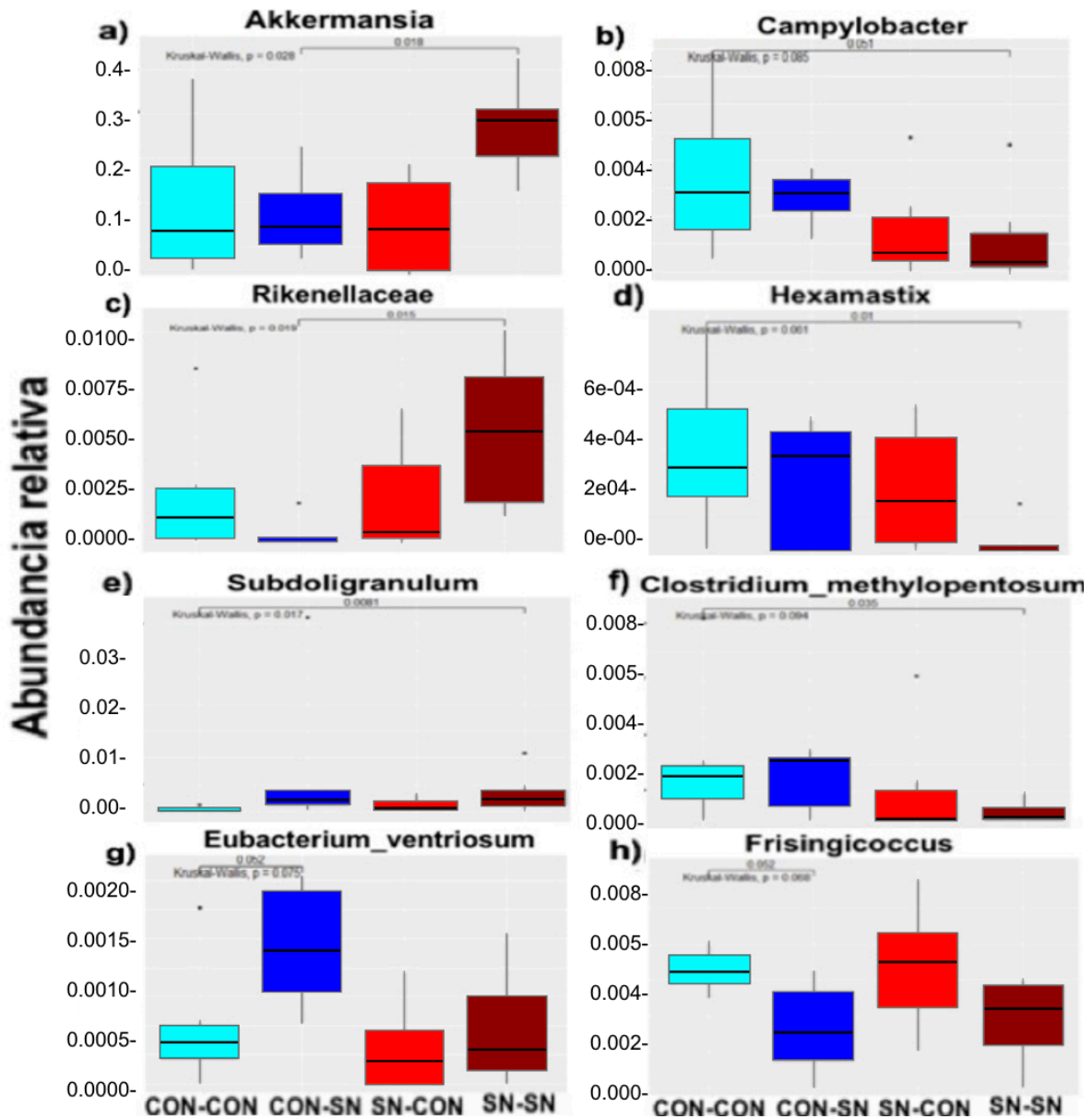


Figura 24. Bacterias diferencialmente abundantes en conejos Chinchilla. Se esquematiza de acuerdo a los grupos bajo estudio. Cajas azules claro (CON-CON), cajas azules fuerte (CON-SN), cajas rojo claro (SN-CON) y cajas rojo oscuro, (SN-SN). A nivel taxonómico género a) Subdoligranulum, b) Campylobacter, c) Rikenellaceae, d) Akkermansia, e) Frisingicoccus, f) Eubacterium ventriosum, g) Clostridium methylopentosum y h) Hexamastix. Los asteriscos representan la significancia estadística entre los grupos experimentales * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Los valores están representados como medias \pm E.E.

6.9 Correlación de los perfiles bacteriano intestinal y metabólico

En el grupo CON-CON, fueron identificadas 6 bacterias abundantes a nivel intestinal, los cuales presentaron una correlación significativa con los analitos energéticos (Figura 25), los cuales son:

Akkermansia exhibió una correlación negativa de manera significativa con TG y HDL en el grupo CON-CON. La sobrenutrición materna y/o el reto metabólico en la vida adulta se asocia a la pérdida de correlación de Akkermansia con estos analitos en los grupos experimentales CON-SN, SN-CON y SN-SN.

En el grupo CON-CON la abundancia de Rikenellaceae presentó una asociación positiva con GLU y TG y una asociación negativa con COL y LDL. El consumo de la dieta desequilibrada, en el grupo CON-SN produjo cambios en estas relaciones, de tal forma que solo persistió una correlación negativa con LDL. Mientras que en los grupos SN-CON y SN-SN, Rikenellaceae no presentó una correlación significativa con ninguno de los analitos considerados.

En relación con Campylobacter, su abundancia en el grupo CON-CON mostró una asociación positiva con HDL y una asociación negativa con COL y LDL. El reto metabólico en la edad adulta, se asoció con una correlación negativa de esta bacteria con LDL en el grupo CON-SN. La sola sobrenutrición materna crónica durante la gestación, grupo SN-CON, se asoció con la pérdida de la correlación del Campylobacter con los analitos bajo estudio. Interesantemente, la sobrenutrición materna aunado al reto metabólico, grupo SN-SN, indujo una correlación positiva de la abundancia de esta bacteria con los niveles de HDL.

En el grupo CON-CON, la abundancia de Frisingococcus mostró una correlación positiva con GLU y TG. La sobrenutrición materna y/o el reto metabólico se asociaron a la pérdida de correlación en la abundancia de Frisingococcus con los analitos asociados al metabolismo energéticos.

En relación con la abundancia de Eubacterium entriosum, presentó una correlación positiva con GLU, TG y HDL en el grupo CON-CON. La sobrenutrición materna y/o el reto metabólico se asociaron a la pérdida de correlación en la abundancia de esta bacteria con los analitos asociados al metabolismo energéticos.

La abundancia de Clostridium metholopentosum en el grupo CON-CON presentó una asociación positiva con COL y LDL y una asociación negativa con GLU. Interesantemente, el consumo de la dieta desequilibrada durante el reto metabólico (grupo CON-SN) se asoció con una asociación positiva con TG y una asociación negativa con COL y LDL. La sobrenutrición materna favoreció una asociación positiva con HDL y una asociación negativa con GLU. Al exponerse a ambos momentos con la dieta desequilibrada se observó una correlación negativa con los niveles de TG.

Por lo que la correlación entre los perfiles metabólicos y bacterianos, pueden verse alterados debido a de la sobrenutrición materna durante la gestación, así como por el consumo de la dieta desequilibrada en la vida adulta, o por la exposición a ambos.

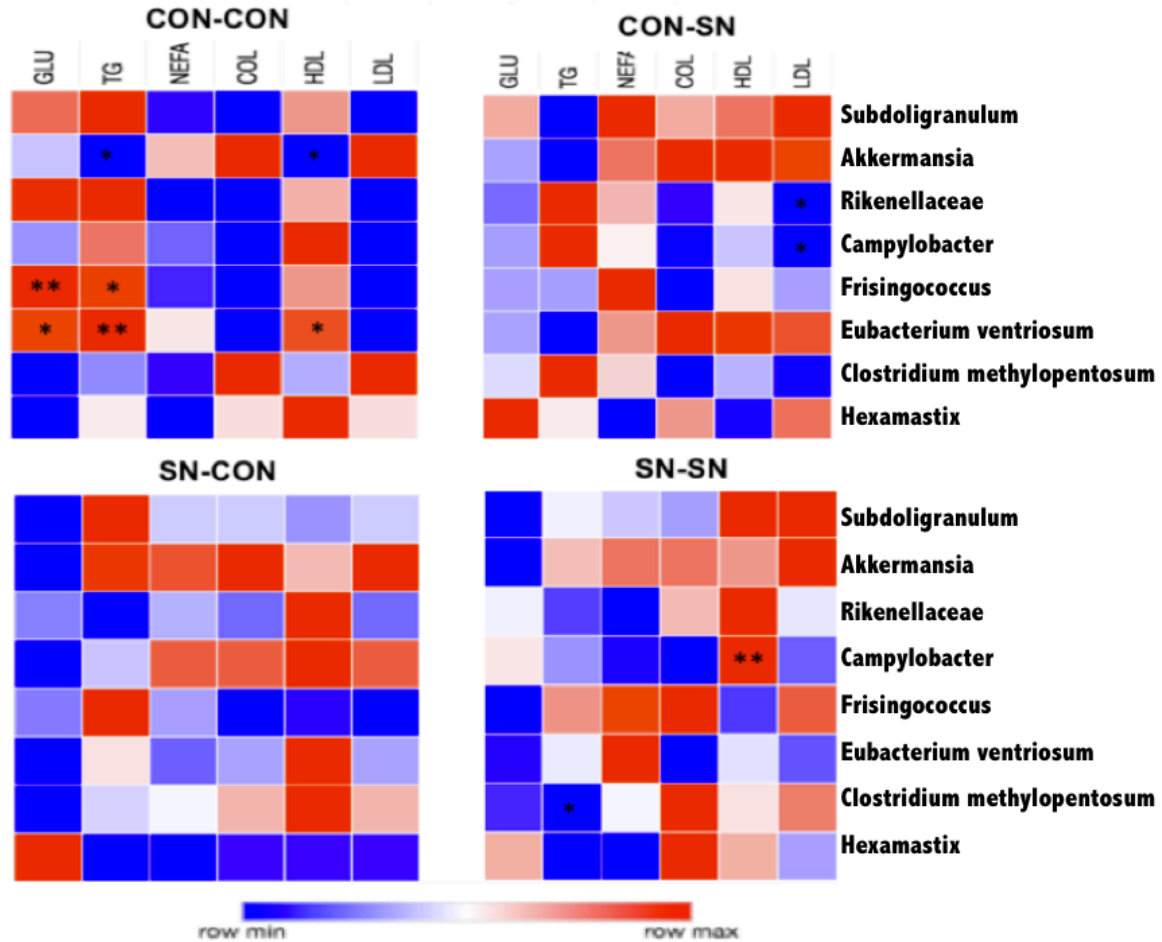


Figura 25. Correlación entre los analitos energéticos y las bacterias diferencialmente abundantes en conejos Chinchilla. Analitos energéticos: glucosa (GLU), triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (NEFA), colesterol (COL), lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL). Subdoligranulum, Akkermansia, Rikenellaceae, Campylobacter, Frisingococcus, Eubacterium ventriosum, Clostridium y Hexamastix son las bacterias a nivel taxonómico género diferencialmente abundantes. El color rojo representa una correlación positiva entre las concentraciones de los analitos y las bacterias intestinales. El color azul representa una correlación negativa entre las concentraciones de analitos y la abundancia del perfil bacteriano intestinal. Significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

7 Discusión

Nuestros resultados demuestran que el efecto de la sobrenutrición materna por el consumo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos durante la gestación produce alteraciones en la regulación metabólica de la descendencia en la edad adulta. Estas alteraciones están asociadas a cambios en la diversidad y abundancia del perfil bacteriano intestinal, los cuales se ven exacerbadas por una segunda exposición a la dieta desequilibrada.

La descendencia de hembras sobrenutridas no mostraron una disminución en el consumo de alimento, manteniendo el peso corporal. Contrario a lo observado en modelo murino, donde las madres gestantes que consumen una dieta alta en lípidos y carbohidratos durante la gestación, la descendencia mostró aumento en el consumo de alimento, con el subsecuente incremento de peso corporal y desarrollo de la obesidad (Darren, et. al., 2021).

Diversos trabajos han reportado la influencia del estado nutricional materno y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta de la descendencia (Desai y cols. 2014, Vicker y cols. 2000). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha caracterizado el efecto de la sobre-nutrición materna sobre el perfil de los diferentes analitos en la descendencia de conejos en la edad adulta. En contraste con los animales obtenidos de madres sobre-nutridas que recibieron una dieta estándar postnatalmente, presentaron cambios en los niveles de HDL y NEFA de manera espontánea (Salazar, et al. 2021). Estos resultados son similares a lo reportado en otros modelos, como es el caso de Alfaradhi y colaboradores, en donde la descendencia de roedores sobrenutridos presentaron mayor contenido de lípidos hepáticos, mayor concentración de PPAR γ y menores niveles de lipoproteína lipasa (Alfaradhi, et. al. 2014).

Los animales que consumieron una dieta desequilibrada desarrollaron dislipidemia el cual se caracteriza con altos niveles de COL, TG, LDL y disminución de HDL comparado con el grupo CON-CON. Este resultado podría explicarse ya que el conejo europeo es sensible a desarrollar dislipidemia por la presencia de apolipoproteína B y niveles altos de la proteína de transferencia del éster de colesterol. Esta proteína plasmática sintetizada por el hígado y tejido adiposo, tiene efectos sobre el intercambio de colesterol esterificado de HDL a LDL por triglicéridos (Di Bartolo, et. al. 2016). Es importante destacar, que este es el primer estudio del efecto del consumo directo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos previo y durante la gestación aunada a una segunda exposición a la dieta desbalanceada sobre los cambios en el perfil metabólico y bacteriano intestinal en conejos en la edad adulta.

En cuanto a los animales obtenidos de madres sobrenutridas y que en la edad adulta fueron expuestos al reto metabólico, estos mostraron un incremento en el consumo calórico, el cual está dado por el consumo directo de la dieta postnatal independientemente de la condición materna. Hallazgos en la literatura demuestran que el consumo de una dieta desbalanceada durante la gestación y la lactancia aunado a la ingesta de una dieta alta en grasas postnatalmente en la descendencia no tiene efectos en el peso corporal (Howie y cols. 2009, Sheen y cols. 2018). Contrario a lo observado por Godfrey y colaboradores, en donde demuestran que la obesidad materna independientemente del tipo de alimentación consumido posterior al destete en la descendencia, desarrollan obesidad (Godfrey, et. al, 2016).

En este trabajo no se observó un incremento en el peso corporal de la descendencia provenientes de madres sobrenutridas, lo cual se podría explicar por la composición de la dieta, así como el tiempo de consumo de la misma, el momento de la manipulación y la susceptibilidad específica del modelo a desarrollar alteraciones metabólicas.

Respecto a la microbiota intestinal, los resultados mostraron alteración en la diversidad y abundancia de bacterias a diferentes niveles taxonómicos desde filo, clase, orden, familia, género debido a la sobrenutrición materna, lo cual es un claro indicador que la diversidad y abundancia de las bacterias intestinales, se ve afectada por la programación fetal *in útero*. Los cambios más notables fueron observados en los animales obtenidos de hembras sobrenutridas y que fueron expuestos al reto metabólico (grupo SN-SN) los cuales mostraron un incremento de las bacterias pertenecientes al Filo *Firmicutes* y *Proteobacterias*, al mismo tiempo una disminución en la abundancia del Filo *Bacteroidota*, provocando disbiosis intestinal, con un desbalance en la proporción *Bacteroides/Firmicutes*, relacionadas con alteraciones metabólicas respecto a la glucosa y perfil lipídico, lo cual guarda una estrecha relación con los cambios observados en el huésped.

En cuanto al consumo directo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos en la edad adulta, no indujo una alteración en el consumo de alimentación. Aunque se han reportado hallazgos similares en roedores donde el consumo de dietas altas en lípidos produce cambios en los patrones conductuales de alimentación (Kohsaka y cols. 2007, Diaz- Urbina y cols. 2018). Esta alteración en el patrón de consumo de alimento se puede relacionar con disbiosis del perfil bacteriano intestinal, ya que puede alterar el sistema nervioso entérico con la subsecuente alteración de las hormonas que se relaciona con la ingesta de alimentos como Ghrelina, neuropéptido PYY, Serotonina, Glp 1-2 (Smitka, et al 2020).

Nuestros resultados mostraron que la combinación de la sobre-nutrición materna y el consumo directo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos en la edad adulta provoca un aumento de la abundancia relativa de las bacterias pertenecientes al Filo *Firmicutes*, *Verrocromicrobia* y *Proteobacterias*; estas alteraciones en la ecología microbiana ocurren antes de que los animales desarrollen SM. Posiblemente con mayor tiempo a la exposición a la dieta desbalanceada se podrían observar cambios en el peso corporal y el diagnóstico de SM.

El análisis metagenómico, así como los grupos experimentales, ayudaron a estimar la diversidad, la abundancia relativa de bacterias específicas y la correlación con la concentración de analitos involucrados en el metabolismo energético, lo que permite describir fenotipos del huésped, como el efecto del consumo de dietas altas en lípidos y carbohidratos, así como correlación de alguna patología como el síndrome metabólico. Al comparar los 4 grupos bajo estudio CON-CON, SN-CON, CON-SN y SN-SN para conocer el efecto de la programación metabólica en la alteración del perfil bacteriano intestinal, se presentaron 8 bacterias a nivel taxonómico género diferencialmente abundantes. En el grupo CON-CON al comparar con los grupos experimentales, presentó mayor abundancia de la bacteria *Campylobacter*, *Clostridium methylpentosum*, *Hexamastix* y *Frisingicoccus*, en el grupo CON-SN presentó mayor abundancia de las bacterias *Eubacterium ventriosum* y *Rikenellaceae*, respecto a los otros 3 grupos bajo estudio y los

animales pertenecientes al grupo SN-SN presentó mayor abundancia de Akkermansia y Subdoligranulum, comparado con los demás grupos experimentales.

Interesantemente, se incrementó la abundancia del género Akkermansia Muciniphila en el grupo SN-SN respecto a los demás grupos experimentales, datos que coinciden con las observaciones realizadas por Hagi y colaboradores, quienes reportan que el consumo de una dieta alta en lípidos en modelo murino promueve los ácidos biliares primarios secretados por el huésped, estos se convierten en ácidos biliares secundarios, mediante bacterias intestinales asociados con la hidroxilación y la desconjugación de la bilis, los ácidos biliares secundarios que pueden incrementar la abundancia de Akkermansia es el ácido desoxicólico (DCA) y el ácido ursodesoxicólico (UDCA) (Hagi & Belzar, 2021). Además, en nuestros resultados Akkermansia se correlacionó negativamente con los niveles séricos de HDL, existen evidencias que indican que los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas puede interactuar con el HDL disminuyendo su concentración, ya que puede unirse a los LPS bacterianos, promoviendo su eliminación (Pirillo, et al. 2015). Akkermansia Muciniphila es una bacteria que en altas concentraciones es degradadora de mucinas, que a su vez puede producir sulfuro y éste puede ser convertido a ácido sulfúrico relacionado con la apoptosis de los enterocitos. Contrario a lo reportado por Remely y colaboradores el cual establece que Akkermansia tiene efecto positivo en el huésped, ya que la disminución de la abundancia relativa se asoció con presencia de obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico (Remely, et al., 2016).

Además, el incremento de la abundancia de Akkermansia favoreció la presencia de Subdoligranulum, coincidiendo con lo reportado por Van Hul y colaboradores (2020). A su vez, Subdoligranulum presentó una asociación positiva con los niveles de triglicéridos en el grupo control, perdiendo esta correlación después de consumir 30 días la dieta desequilibrada, perdiendo su función protectora, ya que Van y colaboradores (2020) ha reportado esta bacteria con incremento en HDL y por ende como factor cardioprotector (Van Hul, et al 2020).

En cuanto al resultado de la abundancia de Eubacterium_ventriosum y los niveles de GLU, TG y HDL en los animales pertenecientes al grupo CON-CON, asociándolo con un fenotipo saludable, similar a lo reportado por de Moraes y colaboradores (2017), quienes observaron una asociación positiva entre Eubacterium_ventriosum y un IMC dentro del rango de normopeso (IMC kg/m^2 24.5 ± 4.2) y mayor concentración de HDL-c (49 ± 1 mg/dl), relacionado con un perfil cardiometabólico sano (de Moraes, et al. 2017). Esto podría deberse a que Eubacterium_ventriosum es una bacteria productora de butirato, ácido graso de cadena corta que estimula las células enteroendócrinas para secretar incretinas, que inhibe la producción de citosinas proinflamatorias (Barcenilla, et al. 2000).

De acuerdo con la abundancia de Hexamastix, el cual fue disminuyendo por el efecto de la sobrenutrición materna, así como el consumo directo de la dieta desequilibrada, se observó una correlación negativa con los analitos TG y NEFA, lo cual podría explicar que los animales pertenecientes a los grupos experimentales, la elevación de estos analitos por la disminución en la abundancia, ya que se ha reportado que Hexamastix puede degradar la fibra dietaria, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato, involucrado en el metabolismo lipídico a través de la interacción con los receptores nucleares como PPAR α , la cual

puede disminuir lipoproteínas con alto contenido de triglicéridos (Cepicka, et. al, 2010, Han et. al. 2017).

Se ha reportado que el género *Frisingicoccus*, perteneciente al Filo *Firmicutes*, está relacionado con beneficios en el huésped ya que puede producir AGCC como el butirato, también contribuye en la inhibición de patógenos oportunistas, protege contra la inflamación y puede intervenir en la regulación de las respuestas inmunitarias sistémicas lo que contribuye al ahorro de energía (Yang, et al, 2017). En el presente estudio las bacterias pertenecientes al género *Frisingicoccus* se correlacionó positivamente con los niveles de GLU y TG en los animales CON-CON, perdiendo su asociación con el metabolismo energético por el efecto de la sobrenutrición materna, así como el consumo directo de la dieta desequilibrada. Un posible mecanismo es que las bacterias relacionadas con el perfil lipídico en el grupo control, como *Frisingicoccus*, *Eubacterium ventriosum* y *Clostridium methylopentosum*, es que puede regular a la baja la expresión del RNAm del factor de transcripción lipogénica de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP1c), que están relacionados con el control de la lipogénesis en el hígado (Axling, et al. 2012).

Conforme a los resultados, el consumo de dietas desequilibradas por parte de la madre o por la descendencia, disminuye la abundancia de *Campylobacter*, bacteria Gram negativa, la cual se ha reportado como constituyente de la microbiota intestinal del huésped en mamíferos (Fernández, et, al, 2008). Un posible mecanismo por el cual disminuye su abundancia ante la exposición a la dieta desequilibrada es porque puede metabolizar aminoácidos para su crecimiento como el aspartato, glutamato, serina y prolina, además de carecer de genes involucrados en las vías metabólicas para el uso de glucosa, galactosa u otros carbohidratos (Stahl et al. 2012). Análisis del lipidoma, han demostrado que el metabolismo de los ácidos biliares afecta la composición de la microbiota intestinal, en este sentido el incremento de los ácidos biliares por el consumo de dietas desequilibradas pudo disminuir la capacidad de colonización de *Campylobacter* (Asakura, et al. 2021).

A lo largo de este estudio se ha evidenciado que la sobrenutrición materna provoca modificación en el perfil bacteriano intestinal y el consumo directo de las dietas desequilibradas influye en los niveles séricos relacionados al perfil lipídico. No obstante, nuestros resultados son un claro indicio que la combinación de la sobrenutrición materna y el reto metabólico en la edad adulta provoca disbiosis intestinal, acompañado con cambios en el perfil lipídico, esta alteración del perfil bacteriano ocurre antes de que se desarrolle hiperglucemia o SMet. Se considera que la disbiosis intestinal guarda una estrecha relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas, asociado con la resistencia a la insulina y la leptina, así como en la inhibición de factores transcripcionales involucrados en la síntesis de TG o COL (Axling, et al, 2012, Lee, et. al, 2019, Armandi, et al, 2021). Por lo que resulta relevante hacer un estudio más extenso en la microbiota intestinal, de modo que se pueda incluir los hongos, virus y arqueas, a su vez conocer su interacción con el huésped (Mims, et al. 2020, Richards, et. al. 2019).

En suma, la sobrenutrición materna provocó alteraciones en la descendencia provocando disminución en el consumo de alimento y agua, en el perfil lipídico tuvieron menores niveles de HDL-c y en el perfil bacteriano intestinal presentaron un aumento de bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* comparado con el grupo

CON-CON (Figura 26). Por otra parte, el consumo directo de la dieta desequilibrada por parte de la descendencia provocó un aumento en el consumo de kcal y disminución en el consumo de agua, alteró el perfil lipídico, disminuyendo niveles de HDL-c al mismo tiempo elevando niveles de colesterol total y LDL-c, en el perfil bacteriano intestinal presentó mayor disimilitud en la diversidad y aumento de la abundancia de bacterias pertenecientes al Filo Firmicutes comparado con el grupo CON-CON. Finalmente, los animales que estuvieron expuesto a la dieta desequilibrada tanto en el momento prenatal como posnatal presentaron mayor consumo de kcal y menor cantidad de agua, alteró el perfil lipídico provocando dislipidemia con niveles elevados de colesterol total, en el perfil bacteriano intestinal afecto tanto la diversidad como aumento de la abundancia de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, Verrucromicrobiota y Proteobacteria al mismo tiempo con una menor abundancia de bacterias benéficas fermentadoras de fibra y una pérdida de correlación entre los analitos energéticos y las bacterias intestinales.

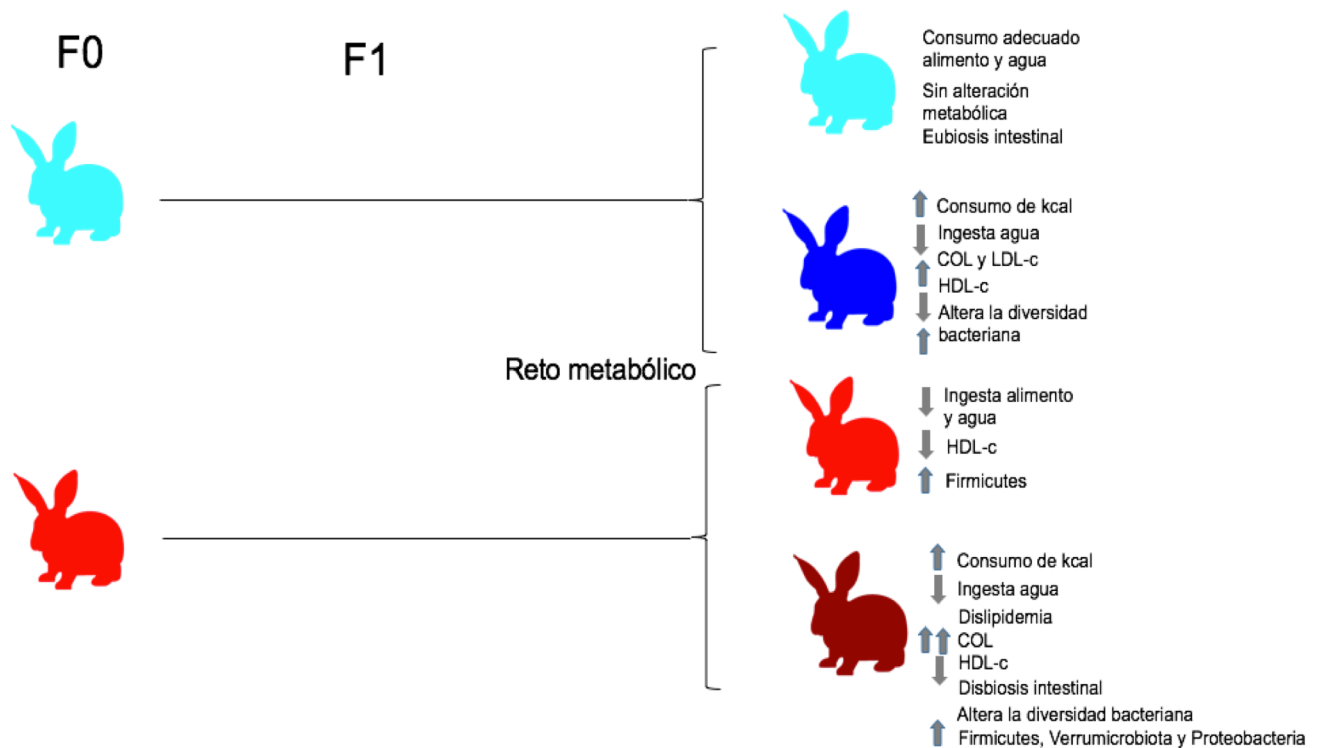


Figura 26. Resumen del diseño del proyecto con los efectos del consumo de la dieta desequilibrada.

Conclusiones

El consumo crónico de una dieta alta en lípidos y carbohidratos antes y durante la gestación por parte de la madre, provocó alteraciones en el perfil metabólico de la descendencia en la edad adulta, aun cuando consumieron una dieta estándar. Estas alteraciones se correlacionan con la modificación en la diversidad y abundancia del perfil bacteriano intestinal. Aunado a una segunda exposición al consumo de dietas desequilibradas por parte de la descendencia, produce alteraciones en el perfil lipídico. Estas alteraciones están asociadas al cambio en el perfil bacteriano intestinal, tanto en la diversidad β como la abundancia relativa, provocando un desequilibrio entre la relación Firmicutes/Bacteroidetes, relacionado con la disbiosis intestinal y síndrome metabólico.

Las alteraciones metabólicas, relacionadas con el síndrome metabólico, así como los cambios en el perfil bacteriano intestinal, son los resultados del consumo directo de la dieta desbalanceada. Por lo que el perfil bacteriano intestinal responde a estímulos como la sobrenutrición materna, programación metabólica y el consumo directo de la dieta desbalanceada repercutiendo en el fenotipo del huésped. A su vez, la microbiota intestinal responde al sexo del huésped, sugiriendo que puede intervenir en procesos endócrinos.

9 Perspectivas

De acuerdo con nuestros resultados sería indispensable el estudio del perfil bacteriano intestinal en el diagnóstico de algunas alteraciones metabólicas, como el síndrome metabólico, brindando información sobre la patología a abordar.

El concepto de DOHaD ofrece una estrategia preventiva primordial para reducir las enfermedades en las generaciones futuras al mejorar el desarrollo fetal. Sería de gran relevancia determinar el efecto de la microbiota intestinal materna como estrategia para mitigar los efectos adversos que genera el consumo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos. Por lo tanto, tener estrategias de intervención mediante prebióticos y probióticos ayudaría a entender los mecanismos por el cual se puede establecer estas alteraciones metabólicas.

10 Referencias bibliográficas

Adak Atanu & Khan Mojibur (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 76:473–493.

Aagaard Kjersti, Kevin Riehle, Jun Ma, Nicola Segata, Toni-Ann Mistretta, Cristian Coarfa, Sabeen Raza, Sean Rosenbaum, Ignatia Van den Veyver, Aleksandar Milosavljevic, Dirk Gevers, Curtis Huttenhower, Joseph Petrosino & James Versalovic. (2012). A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. *PLoS ONE*, 7(6), e36466.

Agostinis C., Mangogna A., Bossi F., Ricci G., Koshore U. & Bulla R. (2019). Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front Immunol.* 10: 2387.

Akira Shizuo, Uematsu Satoshi & Takeuchi Osamu (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.

Alfaradhi MZ, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden A, Ozanne SE.(2014). Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R26-34, 2014.

Andersen M., Alstrup O., Duvald S., Mikkelsen R., Vendelbo H., Ovesen G. & Pedersen M. (2018). Animal models of fetal medicine and obstetrics. Books, experimental animal models of human diseases, an effective therapeutic strategy, 343-373.

Armandi A, Rosso C, Caviglia GP, Ribaldone DG and Bugianesi E (2021) The Impact of Dysmetabolic Sarcopenia Among Insulin Sensitive Tissues: A Narrative Review. *Front. Endocrinol.* 12:716533

Avershina, Ekaterina Avershina, Ola Storrø, Torbjørn Øien, Roar Johnsen, Phil Pope & Knut Rudi. (2013). Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *Microbiol Ecol.* 87;280-290.

Arumugam Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes Julien, Thomas Bruls, Jean-Michel Batto, Marcelo Bertalan, Natalia Borruel, Francesc Casellas, Leyden Fernandez, Laurent Gautie, Torben Hansen, Masahira Hattori, Tetsuya Hayashi, Michiel Kleerebezem, Ken Kurokawa, Marion Leclerc, Florence Levenez, Chaysavanh Manichanh, H. Bjørn Nielsen, Trine Nielsen, Nicolas Pons, Julie Poulain, Junjie Qi, Thomas Sicheritz-Ponten, Sebastian Tims, David Torrents Edgardo Ugarte, Erwin G. Zoetendal, Jun Wang, Francisco Guarner, Oluf Pedersen, Willem M, Søren Brunak, Joel Dore, Jean Weissenbach S. Dusko Ehrlich & Peer Bork (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 (7346): 174–180.

Asakura H, Nakayama T, Yamamoto S, Izawa k, Kawase J, Torii Y & Murakami S (2021). *Front Vet Sci.* 18;8: 675570.

Axling U., C. Olsson, J. Xu, C. Fernandez, S. Larsson, K. Ström, S. Ahrné, C. Holm, G. Molin & K. Berger (2012). Green tea powder and *Lactobacillus plantarum* affect

gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice, *Nutr. Metab.*, 9, 1–18.

Bahare Salehia, Marina Dimitrijevi, Ana Aleks, Katarzyna Neffe-Skocinska, Dorota Zielinska, Danuta Kozłozyn-Krajewska, Javad Sharifi-Rad, Zorica Stojanovic, Radi, Selvaraj Milton Prabhu, Celia F. Rodrigues, & Natalia Martins (2021). Human microbiome and homeostasis: insights into the key role of prebiotics, probiotics, and symbiotics. *Critical review in food science and nutrition* 2021, vol. 61, No. 9, 1415–1428.

Barcenilla, A., Pryde, S. E., Martin, J. C., Duncan, S. H., Stewart, C. S., Henderson & C. (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1654–1661.

Barker DJ & Osmond C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 327: 1077–81.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B & Simmonds J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 8663: 577-580.

Barker D.J. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311:171– 174.

Barker D.J., Eriksson J. G., Forsén T. & Osmond C. (2002): Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31:1235–1239.

Basu, M. Trask, J. & Garg V. (2019). Shaping the future heart: transgenerational outcomes of maternal metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1;316(5):H1141-H1143.

Bergman E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* 70 (2): 567–590.

Bernstein, B. E., Meissner, A. & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128 (4), 669–681.

Backhed Fredrik, Ley Ruth, Justin L. Sonnenburg, Daniel A. Petersen & Jeffrey I. Gordon (2005). Programming of Host Metabolism by the Gut Microbiota. *Science* 307, 5717; 1915-1920.

Bergstrom Kirk & Lijun Xia (2013). Mucin-type O-glycans and their functions in intestinal homeostasis. *Glycobiologia*; 23:1026-37.

Biagi E, Nylund L, Candela M. & Ostan R, Bucci (2010). Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in senior and centenarians. *Plos One.* 5 (6).

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1), 57-59.

Boneca Ivo, Olivier Dussurget, Didier Cabanec, Marie-Anne Nahoric, Sandra Sousac, Marc Lecuit, Emmanuel Psylinakis, Vassilis Bouriotis, Jean-Pierre Hugot, Marco Giovannini, Anthony Coyle, John Bertin, Abdelkader Namanep, Jean-Claude Rousselle, Nadege Cayet, Marie-Christine Prevost, Viviane Balloy, &

- Michel Chignard, Dana J. Philpott, Pascale Cossart & Stephen E. Girardi (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *PNAS*, vol. 104 no. 3; 997–1002.
- Bull M.J & Plummer N.T. (2014). Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative Medicine*; 13:6.
- Caesar Robert & Schoeler Marc (2019). Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*.
- Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani Patrice D & Bäckhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metabolism*. 2015;22(4):658–68.
- Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. & Holmes S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature America, Inc.*
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK & Gordon JI, (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*.7:335–336.
- Celiker C. & Kalkan Rasime. (2020). Genetic and epigenetic perspective of microbiota. *Microbiology and Biotechnology*. Springer Nature.
- Cepicka I., Vladimír Hampl; Jaroslav Kulda (2010). Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one New Genus and three New Species. , 161(3), 400–433.
- Chen P, Torralba M, Tan J, Embree M, Zengler K. & Starkel P. (2015). Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*.148(1):203–14. e16
- Coopersmith (2007) Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness. *Shock* 28 (4): 384–393.
- Cotillard A., Sean P. Kennedy, Ling Chun Kong, Edi Prifti, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, Mathieu Almeida, Benoit Quinquis , Florence Levenez, Nathalie Galleron, Sophie Gougis, Salwa Rizkalla, Jean-Michel Batto, Pierre Renault, MicroObes consortium, Joel Dore, Jean-Daniel Zucker & Karine Clement Stanislav Dusko Ehrlich (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, Vol. 500; 585-589.
- Crider Krista, Thomas Yang, Robert Berry & Lynn Bailey (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate’s role. *Adv Nutr* 3(1):21–38.
- Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, Milagro FI & Martinez JA (2019). Diet, gut microbiota & obesity: links with host genetics and epigenetics and potential applications. *Adv Nutr* 10(suppl_1): S17–S30.
- Darren J. Fernandes, Shoshana Spring, Anna R. Roy, Lily R. Qiu, Yohan Yee, Brian J. Nieman, Jason P. Lerch & Mark R. Palmert (2021). Exposure to maternal high-fat

diet induces extensive changes in the brain of adult offspring. *Transl Psychiatry*. 2021; 11: 149.

de Moraes ACF, Fernandes GR, da Silva IT, Almeida-Pititto B, Gomes EP, Pereira AdC and Ferreira SRG (2017). Enterotype May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 7:47.

Dempsey J, Zhang A., & Cui J.Y. (2018). Coordinate regulation of long non-coding RNAs and protein-coding genes in germ-free mice. *BMC genomics* 19(1):834.

Di Bartolo, Belinda; Takata, Kohei; Duong, MyNgan; Nicholls, Stephen J. (2016). CETP Inhibition in CVD Prevention: an Actual Appraisal. *Current Cardiology Reports*, 18(5), 43.

Dupont, Armant & Brenner (2009). Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med Sep* 27(5):351–357.

Fall C.H.D. & Kumaran K. 2019 Metabolic programming in early life in humans. *Phil. Trans. R. Soc. B* 374: 20180123.

Fabrizio Pantanella & Serena Schippa. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiologica*:39;1-12.

Fan, P., Liu, P., Song, P., Chen, & Ma, X. (2017). Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Sci. Rep.*, 7, 43412.

Fernández, H., Vera, F., Villanueva & M.P García, A. (2008). Occurrence of *Campylobacter* species in healthy wellnourished and malnourished children. *Braz. J. Microbiol*. 39, 1e310.

Fernandez-Twinn, Denise S.; Hjort, Line; Novakovic, Boris; Ozanne, Susan E.; Saffery, Richard (2019). Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 62:1789–1801.

Fischer, B.; Chavatte-Palmer, P.; Viebahn, C.; Navarrete Santos, A. & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1–10.

Galtier-Dereure F, Boegner C. & Bringer J. (2000). Obesity and pregnancy: complications and cost. *Am J Clin Nutr*.71(5 suppl): 1242Se1248S.

Godfrey & Barker, (1996). Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Bmj* 312, 410.

Godfrey, Keith M; Reynolds, Rebecca M; Prescott, Susan L; Nyirenda, Moffat; Jaddoe, Vincent W V; Eriksson, Johan G; Broekman, Birit F P (2016). Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, S2213858716301073.

Hagi T. & Belzar C. (2021). The interaction of *Akkermansia muciniphila* with host-derived substances, bacteria and diets. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105:4833–4841.

- Han, Lu; Shen, Wen-Jun; Bittner, Stefanie; Kraemer, Fredric B; Azhar, Salman (2017). PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiology*, fca-2016-0059.
- Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH, Stevenson M, Okpapi A, Munro MJ., & Hold GL. (2015). First-pass meconium samples from healthy term vaginally-delivered neonates: an analysis of the microbiota. *PLoS One*. 10: e0133320.
- Harris JW. & Brown JH (1927). The bacterial content of the uterus at cesaren section. *Am J Obstet Gynecol*.13:133–43.
- Herrera E, Palacin M & Martin A, (1985). Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes*.34(suppl 2):42e46.
- Heintz-Buschart & Wilmes (2017). Human gut microbiome: function matters. *Cell press reviews. Trends in Microbiology*;1519.
- Holzer P. et al (2012). Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides* 46: 261-274.
- Icaza-Chávez M. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*; 78 (4): 240-248.
- Imahori (1992). How i understand aging. *Nutrition Reviews*, vol. 50, no. 12, pp. 351-352.
- Julibert García Alicia (2020). Ingesta lipídica y syndrome metabólico en adultos con alto riesgo cardiovascular [Tesis de doctorado, Universitat de les Illes Balears].
- Klingensmith, N. J., & C. M. Coopersmith. 2016. The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness. *Critical Care Clinics* 32 (2):203–212.
- Koboziev Lurii, Cynthia Reinoso Webb, Kathryn Furr & Matthew Brisham (2014). Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* 68; 122–133.
- Koenig Jeremy, Ayme Spor, Nicholas Scalfone, Ashwana Fricker, Jesse Stombaugh, Rob Knight, Largus Angenent & Ruth Ley (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (Supl. 1): 4578–4585.
- Kovacheva Vesela, Tiffany J. Mellott, Jessica M. Davison, Nicholas Wagner, Ignacio López Caviella, Aletta Schnitzler & Jan Blusztajn (2007). Gestational choline deficiency causes global and Igf2 gene DNA hypermethylation by up- regulation of Dnmt1 expression. *J Biol Chem* 282(43):31777– 31788.
- Lager & Powell, (2012). Regulation of nutrient transport across the placenta. *J. Pregnancy* 2012, 179.
- Lakshminarayanan, Stanton, Toole & Ross, (2014). Compositional dynamics of the human intestinal microbiota with aging: implications for health,” e *Journal of Nutrition, Health & Aging*, vol. 18, no. 9, pp. 773–786.

- Lebba Valerio, Valentina Totino, Antonella Gagliardi, Floriana Santangelo, Fatima Cacciotti, Maria Trancassini, Carlo Mancini Clelia Cicerone, Enrico Corazziari & Lebovitz H. E. (2001). Insuline resistance: definition and consequences. *Exp. Clin, Endocrinol, Diabetes*; 109 Suppl 2: S135-48.
- Lee, Clare J.; Sears, Cynthia L. & Maruthur Nisa (2019). Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, nyas.14107
- Li M., Sloboda D. M. & Vickers M. (2011). Maternal Obesity and Developmental Programming of Metabolic Disorders in Offspring: Evidence from Animal Models. *Exp Diabetes Res*. 2011; 2011: 592408.
- Lewis JF, Johnson P. & Miller P (1976). Evaluation of amniotic fluid for aerobic and anaerobic bacteria. *Am J Clin Pathol*; 65:58–63.
- Ley R., Backed F., Turnbaguh P., Lozupone A., Knight R & Gordon I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 11070–11075.
- Loh, M. Blaut (2012). Role of comensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*, 3, pp. 544-555.
- Louis & Flint (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294 (1): 1–8.
- Lynch Susan & Pedersen Oluf. (2016). “The human intestinal microbiome in health and disease,” e *New England Journal of Medicine*, vol 375, no. 24, pp. 2369–2379.
- Martínez Medina Jennifer (2020). Influencia de la dieta habitual sobre la microbiota intestinal y su relación con la presencia de complicaciones metabólicas en niños escolares [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Maltepe Emin, Anna Bakardjiev & Susan Fisher (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest*; 120: 1016-25.
- Marlicz Wojciech, Karolina Skonieczna-Zydecka, Konstantinos John Dabos, Igor Loniewski & Anastasios Koulaouzidis. (2018). Emerging concepts in non-invasive monitoring of Crohn’s disease. *TAG* 11:1756284818769076.
- Maruvada Padma, Vanessa Leone, Lee Kaplan & Eugene Chang (2017). The Human Microbiome and Obesity: Moving beyond Associations. *Cell Host & Microbe* 22, pp 589-599.
- Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF & Tillisch K. (2014). Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci*; 34:15490-6.
- Mims T., Qusai Al Abdullah, Justin Stewart, Sydney Watts, Catrina White, Thomas Rousselle, Amandeep Bajwa, Joan Han, Kent Willis & Joseph Pierre (2021). The gut mycobiome of healthy mice is shaped by the environment and shapes metabolic outcomes in response to diet. *Commun Biol*. 2021; 4: 281.

Moreno A., Hernández M., Silberman M., Capraro S., García J., Soto G. & Sandoval E. (2014). The nutrition transition and the double burden of malnutrition: changes in dietary patterns 1961-2009 in the Mexican socioeconomic context. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 64 (4), 231-240.

Morris JR (2001) Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293(5532):1103–1105.

Nugent & Bale (2015). The omniscient placenta: Metabolic and epigenetic regulation of fetal programming. *Frontiers in neuroendocrinology*.

Neu J. (2016). The microbiome during pregnancy and early postnatal life. *Semin Fetal Neonatal Med* 21:373–379.

Paone Paola & Cani Patrice. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partner? *Gut*; 0:1-12.

Peral-Sanchez, I.; Hojeij, B.; Ojeda, D.A.; Steegers-Theunissen, R.P.M.; Willaime-Morawek, S. Epigenetics in the Uterine Environment: How Maternal Diet and ART May Influence the Epigenome in the Offspring with Long-Term Health Consequences. *Genes* 2022, 13, 31

Pérez-Muñoz Maria-Elisa, Marie-Claire Arrieta, Amanda Ramer-Tait & Jens Walter. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*; 5:48.

Phillips (1996). Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. *Diabetologia* 39:1119–1122.

Picone O, Laigre P, Fortun-Lamothe L, Archilla, Peynot N, Ponter A, Berthelot V, Gordier G & Chavette-Palmer P. (2011). Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in to embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology*. 75: 287-289.

Pirillo A., Catapano A. & Norata G. (2015). HDL in infectious diseases and sepsis. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 224.

Popkin & Gordon (2004). The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *International Journal of Obesity*: 28, S2–S9.

Portune J. Kevin, Martin Beaumont, Anne-Marie Davila, Daniel Tomé, Francois Blachier & Yolanda Sanz (2016). Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends Food Sci Technol* 57: 213-232.

Preston CC, Larsen TD, Eclöv JA, Louwagie EJ, Gandy TCT, Faustino RS & Baack ML (2020). Maternal High Fat Diet and Diabetes Disrupts Transcriptomic Pathways That Regulate Cardiac Metabolism and Cell Fate in Newborn Rat Hearts. *Front. Endocrinol.* 11:570846

Prevedourakis CN, Strigou-Charalabis E. & Kaskarelis DB. (1971). Bacterial invasion of amniotic cavity during pregnancy and labor. *Obstet Gynecol*; 37:459–61.

Richards AL, Muehlbauer AL, Alazizi A, Burns MB, Findley A, Messina F, Gould TJ, Cascardo C, Pique-Regi R, Blekhman R, Luca F. 2019. Gut microbiota has a widespread and modifiable effect on host gene regulation. *mSystems* 4: e00323-18

Remely M, Lovrecic L, De La Garza AL, Migliore L, Peterlin B, Milagro FI, Martinez AJ & Haslberger AG. (2015). Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. *Brit J Pharmacol* 172(11):2756–2768.

Remely M, Hippe B, Zanner J, Aumeller E, Brath & Hasbelger A. (2016). Gut Microbiota of Obese, Type 2 Diabetic Individuals is Enriched in *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* and *Peptostreptococcus anaerobius* after Weight Loss. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*;16(2):99-106.

Rescigno M., Urbano M., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P. & Ricciardi-Castagnoli (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* volume 2, 361–367.

Rochlani Y., Venkata N., Kovelamudi S. & Mehta J. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Adv. Cardiovascular Dis.* 11(8):215-225.

Rohr Michael, Chandrakala A Narasimhulu, Trina A Rudeski-Rohr & Sampath Parthasarathy (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr*; 11:77–91.

Round June & Mazmanian Sarkis. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease ;9(5):313-23.

Rowan D., Benjamin J., Mylonakis E. & Belenky P. (2019). Cross-Domain and Viral Interactions in the microbiome. *Microbiology and molecular biology reviews.* Vol. 83 No1.

Rowland Ian, Glenn Gibson, Almut Heineken, Karen Scott, Jonathan Swann, Ines Thiele & Kieran Touhy (2017). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*; 57 (1): 1-24.

Saad Antonio, Joshua Dickerson, Talar Kechichian, Huaizhi Yin, Phyllis Gamble, Ashley Salazar, Igor Patrikeev, Massoud Motamedi, George R. Saade Maged M. & Constantine M.D. (2016). High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 215:378. e1–6.

Saitoh Yasunri, Hiroshi Suzuki, Kazutoshi Tani, Kouki Nishikawa, Katsumasa Irie, Yuki Ogura, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita & Yoshinori Fujiyoshi (2015). Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science* 347 (6223): 775–778 Odenwald MA.

Salazar AM, Sordo M, Navarrete E, Díaz- Villaseñor A, Pánico P, Montúfar-Chaveznava R, Caldelas I, Ostrosky-Wegman P. Maternal overnutrition before and during pregnancy induces DNA damage in the offspring: a rabbit model. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 865: 503324.

Sender, S. Fuchs & R. Milo, "Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans," *Cell*, vol. 164, no. 3, pp. 337–340.

Shapira Michael (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends Ecol Evol* 31 (7): 539–549.

Smitka K, Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Papezova H, Hill M, Pokomy J, Kittnar O, Bilej & Tlaskalova-Hogenova H. (2021). Current Aspects of the Role of Autoantibodies Directed Against Appetite-Regulating Hormones and the Gut Microbiome in Eating Disorders. *Front. Endocrinol.* 12:613983

Stahl Martin, Butcher James & Stintzi Alain (2012). Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Vol 2; 5.

Stinson F., Boyce C., Payne S. & Keelan A. (2019). The Not-so-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. *Front. Microbiol.* 10:1124.

Stroup PE (1962). Amniotic fluid infection and the intact fetal membrane. *Obstet Gynecol*; 19:736–9.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N & Yu XN. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*;558(Pt 1):263-75.

Tamboli C.P., Neut C, Desreumaux P & Colombel J.F. (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53(1):1–4.

Tremaroli V. Backhed F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* Vol 489: 242-249.

Thompson J. A., Itskovitz J. E., Sander S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. & Jones J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, Vol. 282; 1145-1147.

Thornburg K, Shannon J, Thuillier P & Mitchell S. (2010). In Utero Life and Epigenetic Predisposition for Disease. *Genetic* 71: 57-78.

Van Hul M, Tiphaine Le Roy, Edi Prifti, Maria Carlota Dao, Adrien Paquot, Jean-Daniel Zucker, Nathalie M. Delzenne, Giulio G. Muccioli, Karine Clément & Patrice D. Cani (2020) From correlation to causality: the case of Subdoligranulum, *Gut Microbes*, 12:1.

Vermuri Ravichandra, Rohit Gundamaraju, Madjur Shastri, Shakti Shukla, Krishnakumar Kalpurath, Madeleine Ball, Stephen Tristram, Esaki Shankar, Kiran Ahuja & Rajaraman Eri (2018). Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *BioMed Research International*. Volume 2018, Article ID 4178607, 13 p.

Visiedo F, Bugatto F & Sánchez V. High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305: E205eE212.

Wassenaar & Panigrahi, (2014). Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol*: 59; 572-9.

Wu Gary, Jun Chen, Christian Hoffman, Kyle Bittinger, Ying-Yu Chen, Sue A. Keilbaugh, Meenakshi Bewtra, Dan Knights, William A. Walters, Rob Knight, Rohini Sinha, Erin Gilroy, Kernika Gupta, Robert Baldassano, Lisa Nessel, Hongzhe Li, Frederic D. Bushman & James D. Lewis (2011). Linking long term dietary pattern with gut microbiota enterotypes. *Science* Vol 334, Issue 6052: 105-108.

Yang, Q., Huang, X., Zhao, S., Sun, W., Yan, Z., Wang, P., ... Gun, S. (2017). Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets. *Frontiers in Microbiology*, 8, 502.

Yu, Weiwei; Wang, Zhen; Zhang, Kailian; Chi, Zhexu; Xu, Ting; Jiang, Danlu; Chen, Sheng; Li, Wenxin; Yang, Xuyan; Zhang, Xue; Wu, Yingliang; Wang, Di (2019). One-Carbon Metabolism Supports S-Adenosylmethionine and Histone Methylation to Drive Inflammatory Macrophages. *Molecular Cell*, S1097276519304964.

Yuille, S., Reichardt, N., Panda, S., Dunbar, H., & Mulder, I. E. (2018). Human gut bacteria as potent class I histone deacetylase inhibitors in vitro through production of butyric acid and valeric acid. *PLoS One* 13 (7).

Zambrano E, Ibáñez C, Martínez-Samayoa PM, Lomas-Soria C, Durand-Carbajal M, Rodríguez-González GL. 2016. Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. 47.

Zeldovich Varvara, Casper Clausen, Emily Bradfor, Daniel Fletcher, Emin Maltepe, Jennifer Robbins & Anna Bakardjiev (2013). Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. *Plos Pathog*. 9: e1003821.

Zhao J., Zhang X., Liu H., Brown A. & Qiao S. (2019). Dietary protein and gut microbiota composition and function. *Current Protein and Peptide Science*, 20, 145-154.

Zhang C, Zheng H, Yu Q, Yang P, Li Y, Cheng F, Fan J, Liu E. A Practical Method for Quantifying Atherosclerotic Lesions in Rabbits. *J Comp Pathol* 2010;142:122– 8.

Zheng D., Liwinski T. Elinav E., (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell research*. 30: 492-506.

Zho L. & Xiao X. (2018). The role of gut microbiota in the effects of maternal obesity during pregnancy on offspring metabolism. *Biosc. Report*. 38(2).

Zhu Ziqiang, Fang Cao & Xiaozhong Li (2019). Epigenetic programming and fetal metabolic programming. *Frontier in endocrinology*. Vol. 10, núm. 7.

Anexo 1

Composición nutrimental de las dietas

Tabla 1. Contenido nutrimental de las dietas utilizadas en el presente proyecto		
Composición	Dieta estándar (SD)	Dieta suplementada (HFCD)
Humedad	5.61%	12.80%
Proteína	15.73%	11.22%
Lípidos	3.83%	5.58%
Carbohidratos	47.87%	52.61%
Fibra cruda	15.39%	10.21%
Minerales totales	11.56%	7.58%
Energía Kcal/Kg	2542.57	2609.15

Anexo 2

Descripción de los oligos forward y reverse en la primer PCR

Tabla 3. Lista de oligo forward para la primera PCR. Tomado de Martínez, 2020.			
No.	Oligonucleótidos	Secuencia de oligonucleótidos	Código de Barras
1	FWD_MB_MHIT	TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT CTG TGC CAG CMG CCG CGG TAA	GAT CT
Lista de oligos reverse en la			
1ra PCR			
1	REV_BC1_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG TGA TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGTGAT
2	REV_BC2_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAC ATC GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ACATCG
3	REV_BC3_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGC CTA AGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GCCTAA
4	REV_BC4_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTG GTC AGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TGGTCA
5	REV_BC5_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCA CTG TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CACTGT
6	REV_BC6_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAT TGG CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ATTGGC
7	REV_BC7_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGA TCT GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GATCTG
8	REV_BC8_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTC AAG TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TCAAGT
9	REV_BC9_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCT GAT CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CTGATC
10	REV_BC10_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAA GCT AGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	AAGCTA
11	REV_BC11_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGT AGC CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GTAGC C
12	REV_BC12_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTA CAA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TACAAG
13	REV_BC13_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTT GAC TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TTGACT
14	REV_BC14_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG AAC TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGAACT
15	REV_BC15_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTG ACA TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TGACAT
16	REV_BC16_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG ACG GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGACG G
17	REV_BC18_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGC GGA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GCGGA C
18	REV_BC19_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTT TCA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	TTTCAC
19	REV_BC20_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG CCA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	GGCCA C
20	REV_BC21_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG AAA CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGAAAC
21	REV_BC22_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCG TAC GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CGTAC G
22	REV_BC23_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCC ACT CGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	CCACTC
23	REV_BC25_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAT CAG TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	ATCAGT
24	REV_BC27_MB_MHIT	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAG GAA TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT	AGGAAT

Anexo 3
 Descripción de los oligos forward y reverse en la segunda PCR

Tabla 4. Lista de oligo forward para la segunda PCR. Tomado de Martínez, 2020.			
No.	Oligonucleótidos	Secuencia de oligonucleótidos	Código de barras
1	UNIV_ILLUMINA_F	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T	
Lista de oligos reverse en la 2da PCR			
1	REV_BC27_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAAGGA ATG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	AGGAAT
2	REV_BC25_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAA TCA GTG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	ATCAGT
3	REV_BC23_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAC CAC TCG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CCACTC
4	REV_BC22_ILLUM	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AACGTA CGG TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	CGTACG

Anexo 4
Condición de los conejos europeos

Tabla 2. Metada. Relación del número de animal con variables bajo estudio			
# ANIMAL	CONDICIÓN	SEXO	Horario
132	SN-CON	H	9 am
134	SN-SN	H	9 am
137	CON-CON	H	9 am
141	SN-SN	H	9 am
148	CON-SN	H	9 am
151	CON-SN	H	9 am
153	CON-CON	H	9 am
156	SN-CON	H	9 am
109	SN-SN	M	9 am
111	SN-CON	M	9 am
112	SN-SN	M	9 am
115	CON-SN	M	9 am
116	CON-CON	M	9 am
118	CON-SN	M	9 am
120	SN-SN	M	9 am
121	SN-CON	M	9 am
123	SN-SN	M	9 am
128	CON-CON	M	9 am
131	SN-SN	M	9 am
133	SN-CON	M	9 am
140	CON-CON	M	9 am
146	SN-CON	M	9 am
149	CON-CON	M	9 am
150	CON-SN	M	9 am

Anexo 5

Análisis Metagenómico

Los avances tecnológicos de biología molecular aplicada en la secuenciación de genes, ha ayudado en el estudio de la microbiota intestinal tanto en animales como en humanos. El estudio de la metagenómica puede brindarnos información acerca de la diversidad α y β , la abundancia relativa y la correlación del perfil bacteriano intestinal con analitos energético, así como el estado de salud y la enfermedad del huésped. Actualmente Vaultot y colaboradores en 2017 explica el uso de la biblioteca Phyloseq en el programa R para analizar datos de secuenciación de genes. En este apartado se resumen los scripts utilizados para analizar la microbiota del contenido cecal de los conejos europeos.

Diversidad α

```
#Agregar librerías "phyloseq", "ggplot2", "dplyr", "ggpubr", "Matrix",
#"reshape2", "vegan", "readxl"
library("phyloseq") # Paquete de R que hace análisis metagenómicos
library("ggplot2") # Realizar gráficos
library("readxl") # Necesario para importar archivos Excel a R
library("dplyr") # Filtrar y reajustar data frame
library("tibble") # Necesario para convertir columnas a renglones
library("ggpubr")
library("rlang")
library("vegan")
library("reshape2")

# Programa 1 phyloseq (Fijar el directorio)

# Importar y leer archivos
otu_mat<- read_excel("OTU.xls")
tax_mat<- read_excel("TAX.xls")
samples_df <- read_excel("metadata.xlsx", sheet = "Bacterias")

# Leer datos abundancia
otu_mat <- otu_mat %>%
tibble::column_to_rownames("otu")
otu_mat <- as.matrix(otu_mat)

# Leer datos taxonomicos
tax_mat <- tax_mat %>%
tibble::column_to_rownames("otu")
tax_mat <- as.matrix(tax_mat)
samples_df <- samples_df %>%
tibble::column_to_rownames("sample")

#Objetos individuales para phyloseq
TAX = tax_table(tax_mat)
```

```

OTU = otu_table(otu_mat, taxa_are_rows = TRUE)
samples = sample_data(samples_df)
alfa_div <- phyloseq(OTU, TAX, samples)

# visualizar
sample_names(alfa_div)
rank_names(alfa_div)
sample_variables(alfa_div)
### Rarificar a una profundidad de 4000 reads
alfa_div.rarefied=rarefy_even_depth(alfa_div, rngseed=1, sample.size=0.95*min(sa
mple_sums(alfa_div)), replace=F)

# Graficar
plot_richness_estimates(alfa_div.rarefied, x="condicion", measures=c("Observed",
"Simpson", "Shannon"), color = "condicion") + geom_boxplot(alpha=0.6) +
theme(legend.position="none",
axis.text.x=element_text(angle=45,hjust=1,vjust=1,size=12))
stat_compare_means(method = "kruskal.test")

```


Anexo 6

Diversidad β

```
#Agregar librerías “phyloseq”, “ggplot2”, “dplyr”, “ggpubr”, “Matrix”,  
#”reshape2”, “vegan”, readxl
```

```
library(“phyloseq”) # Paquete de R que hace análisis metagenómicos  
library(“ggplot2”) # Realizar gráficos  
library(“readxl”) # Necesario para importar archivos Excel a R  
library(“dplyr”) # Filtrar y reajustar data frame  
library(“tibble”) # Necesario para convertir columnas a renglones  
library(“ggpubr”)  
library(“rlang”)  
library(“vegan”)  
library(“reshape2”)
```

```
# Programa 1 phyloseq (Fijar el directorio)
```

```
# Importar y leer archivos
```

```
otu_mat<- read_excel(“OTU.xls”)
```

```
tax_mat<- read_excel(“TAX.xls”)
```

```
samples_df <- read_excel(“metadata.xlsx”, sheet = “Bacterias”)
```

```
# Leer datos abundancia
```

```
otu_mat <- otu_mat %>%
```

```
tibble::column_to_rownames(“otu”)
```

```
otu_mat <- as.matrix(otu_mat)
```

```
# Leer datos taxonomicos
```

```
tax_mat <- tax_mat %>%
```

```
tibble::column_to_rownames(“otu”)
```

```
tax_mat <- as.matrix(tax_mat)
```

```
samples_df <- samples_df %>%
```

```
tibble::column_to_rownames(“sample”)
```

```
#Objetos individuales para phyloseq
```

```
TAX = tax_table(tax_mat)
```

```
OTU = otu_table(otu_mat, taxa_are_rows = TRUE)
```

```
samples = sample_data(samples_df)
```

```
beta_div <- phyloseq(OTU, TAX, samples)
```

```
### Ordenada Bray
```

```
beta_div_ord <- ordinate(beta_div, “PCoA”, “bray”)
```

```
beta_div_ord
```

```
#Graficar condicion
```

```
plot_ordination(beta_div, beta_div_ord, color=“condicion”, shape= “condicion”) +
```

```
geom_point(size=4) +
```

```

stat_ellipse(aes(group=ZT))

##### Graficar sexo
plot_ordination(beta_div, beta_div_ord, color="condicion", shape="sexo") +
geom_point(size=4) +
stat_ellipse(aes(group=ZT))

#### Graficar sexo
plot_ordination(beta_div, beta_div_ord, color="sexo", shape="condicion") +
geom_point(size=4) +
stat_ellipse(aes(group=sexo))

#### Hacer un data frame, antes de sacar diferencia estadística
metadata <- as(sample_data(beta_div), "data.frame")

#Para correr permanovas
beta_div <- as(("PCoA", "bray"), "data.frame")
h = adonis(distance(beta_div, method="bray") ~ CONDICION + SEXO,
  data = metadata)
h$aov.tab

```

Anexo 7

Abundancia relativa

```
#Agregar librerías “phyloseq”, “ggplot2”, “dplyr”, “ggpubr”, “Matrix”,
#”reshape2”, “vegan”, readxl
library(“phyloseq”) # Paquete de R que hace análisis metagenómicos
library(“ggplot2”) # Realizar gráficos
library(“readxl”) # Necesario para importar archivos Excel a R
library(“dplyr”) # Filtrar y reajustar data frame
library(“tibble”) # Necesario para convertir columnas a renglones
library(“ggpubr”)
library(“rlang”)
library(“vegan”)
library(“reshape2”)

# Programa 1 phyloseq (Fijar el directorio). Se importan los datos a R
# Importar y leer archivos
otu_mat<- read_excel(“OTU.xls”)
tax_mat<- read_excel(“TAX.xls”)
samples_df <- read_excel(“metadata.xlsx”, sheet = “Bacterias”)

# Leer datos de abundancia de las bacterias. Se realiza los ajustes necesarios para
que correlacionen los archivos.

otu_mat <- otu_mat %>%
tibble::column_to_rownames(“otu”)
otu_mat <- as.matrix(otu_mat)

# Leer datos taxonomicos
tax_mat <- tax_mat %>%
tibble::column_to_rownames(“otu”)
tax_mat <- as.matrix(tax_mat)
samples_df <- samples_df %>%
tibble::column_to_rownames(“sample”)

#Objetos individuales para phyloseq
TAX = tax_table(tax_mat)
OTU = otu_table(otu_mat, taxa_are_rows = TRUE)
samples = sample_data(samples_df)
# Se crea objeto de phyloseq
abundancia_relativa <- phyloseq(OTU, TAX, samples)

# Relativizar
median(sample_sums(abundancia))
stanf = function(x) round((x / sum(x)))
abundancia = transform_sample_counts(abundancia,stanf)
```

```

##Para exportar el objeto de phyloseq a un data frame
##Para extraer la tabla a nivel de genero
ab_exp <- tax_glom(a, "Genero")
ab_exp##confirmo que se redujeron el numero de taxa contra la base inicial
library("dplyr")

##Luego lo exporto nuevamente a un data frame
sp_tab <- as.data.frame(abundances(ab_exp)) # Obtener asvs/otus
sp_tab$asv_id <- rownames(sp_tab) # Añadir una nueva columna para los ids
tax_tab <- as(ab_exp@tax_table,"matrix") # Obtener la taxonomía como una matrix
tax_tab <- as.data.frame(tax_tab) # Convertir a data frame
tax_tab$asv_id <- rownames(tax_tab) # Añadir una nueva columna para los ids
sp_tax_tab <- tax_tab %>%
left_join(sp_tab, by="asv_id") # Unir la taxonomía con la tabla ASVS/OTUS

head(sp_tax_tab)[,1:10] ##verifico mi data frame
write.table(sp_tax_tab, "Taxonomy_genus_levels.txt", sep="\t") #guardo mi archivo

```

Anexo 8

Correlación de datos

```
library("psych") ##Paquete de R
##Análisis de microbiota y metabolitos
correlacion_df<-read_excel("correlacion.xlsx",sheet= "Bioquimicas")
names(correlacion_df)
#Asociaciones de la abundancia relativa con los analitos energéticos
## Se crea una base (4 x 17, siendo estos últimos las bacterias identificadas)
resultados=array(NA,c(4,7))
colnames(resultados) <- names(correlacion_df[,9:15]) ## poner la columnas de las
  variables metabolicas
row.names(resultados) <- c("rho", "p", "n", "t")
## Se corren la correlaciones para el primer género y las variables metabolicas
temp <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,5]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones segundo género y las variables metabolicas
temp2 <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,6]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones para el tercer género y las variables metabolicas
temp3 <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,7]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones cuarto género y las variables metabolicas
temp4 <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,8]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones quinto género y las variables metabolicas
temp5<-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,5]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones sexto género y las variables metabolicas
temp6 <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,6]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones para el séptimo género y las variables metabolicas
temp7 <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,7]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
## Se corren la correlaciones octavo género y las variables metabolicas
temp8 <-
corr.test(as.data.frame(correlacion_df[,8]),as.data.frame(correlacion_df[,9:15]),
  use= "pairwise", method = "spearman", adjust = "none")
```

```

## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado subdoligranulum
resultados[1,] <- temp$r
resultados[2,] <- temp$p
resultados[3,] <- temp$n
resultados[4,] <- temp$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_subdoligranulum.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado akkermansia
resultados[1,] <- temp2$r
resultados[2,] <- temp2$p
resultados[3,] <- temp2$n
resultados[4,] <- temp2$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_akkermansia.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado hexamastix
resultados[1,] <- temp3$r
resultados[2,] <- temp3$p
resultados[3,] <- temp3$n
resultados[4,] <- temp3$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_Rikenellaceae.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado ventriosum
resultados[1,] <- temp4$r
resultados[2,] <- temp4$p
resultados[3,] <- temp4$n
resultados[4,] <- temp4$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_campylobacter.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado subdoligranulum
resultados[1,] <- temp5$r
resultados[2,] <- temp5$p
resultados[3,] <- temp5$n
resultados[4,] <- temp5$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_frisingicoccus.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado akkermansia
resultados[1,] <- temp6$r
resultados[2,] <- temp6$p
resultados[3,] <- temp6$n
resultados[4,] <- temp6$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_eubacterium.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado hexamastix
resultados[1,] <- temp7$r
resultados[2,] <- temp7$p
resultados[3,] <- temp7$n

```

```
resultados[4,] <- temp7$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_clostridium.txt", sep="\t")
## Se acomodan en la base de datos del género diferenciado ventriosum
resultados[1,] <- temp8$r
resultados[2,] <- temp8$p
resultados[3,] <- temp8$n
resultados[4,] <- temp8$t
## Se mandan a un archivo de texto
write.table(resultados, "correlacion_hexamastix.txt", sep="\t")
```