



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Efecto del consumo de una dieta alta en grasa en  
combinación con arsénico sobre la composición de la  
microbiota intestinal**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**DANIELA CHÁVEZ HERNÁNDEZ**

**Ciudad Universitaria, Cd. MX., 2024**





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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: GONZALEZ HERNANDEZ ILIANA ELVIRA

**VOCAL:** Profesor: HERNANDEZ PEREZ HUGO ANTONIO

**SECRETARIO:** Profesora: MORAN RAMOS SOFIA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: JIMENEZ REYES GENARO

**2° SUPLENTE:** Profesor: TRAPALA REYNA JONATHAN

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Genómica de Poblaciones aplicada a la Salud, INMEGEN

Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, C.P. 14510, Alcaldía Tlalpan, CDMX,

México

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Sofía Morán Ramos

## **SUSTENTANTE:**

Daniela Chávez Hernández

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	3
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	6
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE APÉNDICES</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>ANTECEDENTES</b> .....	13
Dieta y salud .....	13
Dieta alta en grasa .....	14
Metales pesados y su impacto en la salud .....	17
Arsénico .....	19
Microbiota intestinal .....	23
Dieta y microbiota .....	25
Efecto de los patrones dietarios sobre la microbiota intestinal .....	26
Dieta alta en grasa .....	26
Dietas modernas y su influencia sobre la microbiota intestinal .....	28
Arsénico y microbiota .....	29
Efectos de una dieta alta en grasa y arsénico en la microbiota .....	36
<b>HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	39
General .....	39
Particulares .....	39
<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	40
Ratones y recolección de muestras .....	40
Extracción del ADN .....	42

Preparación de librerías y secuenciación .....	42
Procesamiento de datos .....	44
Análisis estadístico .....	45
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
Diferencias en diversidad alfa y beta de la microbiota de ratones alimentados con una dieta alta en grasa .....	47
Diferencias taxonómicas en la microbiota de ratones alimentados con dieta alta en grasa.....	48
Efecto de la presencia de arsénico sobre la diversidad alfa y beta de la microbiota de ratones alimentados con una dieta control (baja en grasa) y dieta alta en grasa .....	50
Diferencias taxonómicas entre las comunidades bacterianas de ratones expuestos a distintos tipos de dieta .....	51
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>68</b>
<b>APÉNDICES</b> .....	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
As	Arsénico
AS3MT	Arsénico 3 metiltransferasa
As <sup>III</sup>	Arsenito
As <sup>V</sup>	Arsenato
ATP	Trifosfato de adenosina
Conacyt	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DMA	Ácido dimetilarsínico
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
FDR	Tasa de descubrimiento falso
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
LDA	Análisis discriminante lineal (Linear discriminant analysis)
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LEFsE	Análisis discriminante lineal con efecto de tamaño (Linear discriminant analysis effect size)
MAs	Metilarsenito
MMA	Ácido monometil arsénico
OTU	Unidad Taxonómica Operacional (Operational Taxonomic Unit)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RIQ	Rango Intercuartil
Rox	Roxarsona
SHIME	Simulador del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem)
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
UAM	Universidad Autónoma de México
UFC	Unidades formadoras de colonia

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos a través de los cuales una dieta alta en grasa induce a una inflamación metabólica, figura adaptada de Y. Duan et al., 2018. ....	17
<b>Figura 2.</b> Consecuencias de la exposición a metales pesados, figura adaptada de Balali-Mood et al. 2021.....	19
<b>Figura 3.</b> Metabolismo del arsénico propuesto en humanos, figura adaptada de Khairul et al., 2017. Creado en BioRender.com .....	21
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de resistencia para arsénico (verde) presentado en bacterias, figura tomada de Hao et al., 2021. ....	33
<b>Figura 5.</b> Diagrama del diseño del estudio, creado en BioRender.com.....	41
<b>Figura 6.</b> Pasos de la estrategia experimental de la caracterización de la microbiota intestinal, creado en BioRender.com.....	44
<b>Figura 7.</b> Diagrama de coordenadas principales conforme a los índices de diversidad beta Bray Curtis (A) y Jaccard (B) para las muestras de ciego de los grupos de estudio; dieta Control (n=10) y dieta Alta en Grasa (n=12).....	48
<b>Figura 8.</b> Puntuaciones LDA para las diferencias observadas en la microbiota del ciego de ratones alimentados con dieta Control (n=10) y dieta Alta en Grasa (n=12). .....	49
<b>Figura 9.</b> Gráfica de cajas y bigotes de los índices de diversidad alfa significativamente diferentes entre los grupos de estudio (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11). .....	50
<b>Figura 10.</b> Diagrama de coordenadas principales conforme a los índices de diversidad beta; Bray-Curtis (A) y Jaccard (B) de las muestras de ciego de los grupos de estudio (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11).....	51
<b>Figura 11.</b> Gráfica de cajas y bigotes de abundancias relativas para filos que presentaron diferencias significativas (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11). ....	53
<b>Figura 12.</b> Gráfica de cajas y bigotes de las abundancias relativas para familias diferenciadas (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11). ....	54

<b>Figura 13.</b> Gráfica de cajas y bigotes de las abundancias relativas para géneros diferenciados (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11). .....	56
--	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Índices de diversidad alfa de las muestras de ciego, de los dos grupos de estudio; dieta control y dieta alta en grasa. ....	47
--	----

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Tabla A1.</b> Índices de diversidad alfa para muestras de ciego, diferencias entre dieta control, dieta control con arsénico, dieta alta en grasa y dieta alta en grasa con arsénico.....	77
<b>Tabla A2.</b> Ingredientes y composición de dietas utilizadas en el estudio. ....	77
<b>Tabla A3.</b> Consumo de agua en mililitros por ratón al día para grupos que estuvieron expuestos a arsénico. ....	78
<b>Figura A4.</b> Acomodo de placa de PCR.....	79
<b>Figura A5.</b> Carta de aceptación del estudio por parte del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAM Xochimilco. ....	80

## RESUMEN

**Antecedentes:** La microbiota intestinal es la primera línea de defensa en contra de los efectos tóxicos de metales pesados. Particularmente, existe evidencia de que las bacterias intestinales contienen genes que pueden ayudar a su biotransformación. Sin embargo, las dietas altas en grasa pueden modificar la microbiota intestinal y se piensa que esto repercute directamente en los procesos de detoxificación de metales pesados como arsénico, cadmio y plomo. De forma recíproca, la exposición a metales pesados puede causar una disbiosis en la microbiota intestinal y este podría ser uno de los mecanismos por los cuales los efectos tóxicos se presentan de una forma exacerbada. En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que personas con obesidad, que en su mayoría llevaban una dieta alta en grasa, acumulan más metales pesados en comparación con personas con normopeso. Por ende, se parte de la hipótesis de que la exposición a arsénico exacerbará la disbiosis en la microbiota intestinal, característica de una dieta alta en grasa.

**Objetivo:** Estudiar el efecto de una dieta alta en grasa junto con la exposición al arsénico como contaminante ambiental sobre la estructura de la microbiota intestinal.

**Procedimiento Experimental:** Este estudio fue realizado con 48 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 7 a 8 semanas de edad que estuvieron expuestos por 8 semanas a una dieta alta en grasa o a una dieta control. Posteriormente, se subdividieron los grupos de cada dieta, de manera que a uno de ellos se les agregara arsenito de sodio en una concentración de 100  $\mu\text{g/L}$  en el agua de bebida por 8 semanas más. En total se trabajó con 4 grupos de ratones (dieta control, dieta control-As, dieta alta en grasa, dieta alta en grasa-As). Tras las 16 semanas de duración del estudio se realizó la eutanasia, obteniendo las muestras del contenido del ciego. Las muestras se procesaron para obtener el ADN y evaluar la microbiota intestinal de los distintos grupos a través de la secuenciación de la región V4 del gen 16S del ARNr con ayuda de la plataforma Illumina MiSeq. Se obtuvieron las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) correspondientes, se estimó la diversidad alfa a través de los índices OTUs observadas, Chao1, ACE, Shannon, Simpson y su inverso, y Fisher. Además, se obtuvieron las matrices de distancia de Bray-Curtis y Jaccard para evaluar la diversidad beta. La clasificación taxonómica se realizó contra la base de

datos Greengenes v13-8 para generar las matrices de composición desde filo hasta género. El tratamiento estadístico de datos se realizó a través del programa RStudio y la herramienta LEFSE.

**Resultados:** El presente proyecto identificó que la comunidad bacteriana de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa presentó mayor diversidad en comparación con aquellos alimentados con la dieta control. Además, el tipo de dieta influyó de forma significativa sobre la composición global de la microbiota. En cuanto a las diferencias taxonómicas, la microbiota de ratones alimentados con dieta alta en grasa presentó un aumento significativo en la abundancia de familias como *Peptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Lactobacillaceae*, *Deferribacteraceae*, *Rikenellaceae* y *Bifidobacteriaceae* y una disminución de *Bacteroidaceae*, *Staphylococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Bacillales*.

Al considerar el efecto del arsénico, se observó que, el consumo de la dieta control en conjunto con la exposición al metal pesado aumentó la diversidad alfa con un efecto similar al que causaba la dieta alta en grasa. En condiciones de una dieta alta en grasa, la presencia de arsénico causó una disminución que fue cercana a la significancia. Las diferencias taxonómicas observadas en las comunidades bacterianas fueron, en primer lugar, un aumento significativo de *Deferribacteres*, específicamente el género *Mucispirillum* bajo condiciones de dieta control con la presencia de arsénico. En segundo lugar, una disminución significativa de *Verrucomicrobia*, particularmente el género *Akkermansia* bajo las mismas condiciones y ambos comportamientos fueron similares al perfil de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa sin la presencia del arsénico. Por el contrario, en presencia de una dieta alta en grasa, la adición del arsénico, en algunos casos revirtió los cambios en la abundancia observados con la dieta alta en grasa aunque no todos resultaron significativos.

**Conclusiones:** La dieta alta en grasa indujo una mayor diversidad de la microbiota intestinal, lo cual pudo deberse al tipo de ingredientes de la dieta. Particularmente la presencia de componentes como la inulina que podrían modular la respuesta de las comunidades. El perfil taxonómico similar entre el grupo control-As, y aquel con dieta alta en grasa puede deberse a que se ha reportado que las familias diferenciadas

contienen genes para el metabolismo del arsénico lo cual pudiese tratarse de una respuesta adaptativa a la exposición al metal. A su vez, la disminución de *Akkermansia* podría estar relacionada con la sensibilidad de este género a la dieta alta en grasa y arsénico que además pudiera relacionarse con una menor integridad de la barrera intestinal. Llama la atención que al añadir la exposición al metal pesado a una dieta alta en grasa no se observó un efecto significativo, lo cual podría sugerir que, bajo condiciones establecidas, el arsénico no parece exacerbar los efectos de una dieta alta en grasa sobre la microbiota intestinal.

## INTRODUCCIÓN

La obesidad es un desorden metabólico que involucra un exceso en la cantidad de grasa corporal. Aunque se considera que es causado por un desequilibrio en el balance de energía producido por un bajo gasto energético y un aumento en el consumo calórico, existe evidencia que sugiere que la obesidad también se asocia con alteraciones en la microbiota intestinal conocida como disbiosis (DeGruttola et al., 2016). En México, el 70% de los adultos mexicanos padecen sobrepeso y casi una tercera parte sufre de obesidad, lo cual se asocia con el desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares pero también con trastornos óseos, musculares y algunos tipos de cáncer (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2016).

Además de los hábitos alimenticios poco saludables y la falta de ejercicio, existen factores ambientales como la exposición a los metales pesados, que al ser disruptores endocrinos del metabolismo, pueden influenciar el desarrollo de la obesidad y por consecuencia, de otras enfermedades. Este tipo de disruptores endocrinos hoy en día se encuentran presentes a nivel global, por lo que es una realidad que podemos estar expuestos a ellos ya sea a través del agua de bebida o inclusive a través de los alimentos.

En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que personas con obesidad, que en su mayoría llevaban una dieta alta en grasa, acumulan más metales pesados en el cuerpo en comparación con personas sanas (Liu et al., 2020). La microbiota intestinal es la primera línea de defensa en contra de los efectos tóxicos de los metales pesados y, existe evidencia de que contienen genes que pueden ayudar a su biotransformación y con ello disminuir su toxicidad. Sin embargo, las dietas altas en grasa pueden modificar la composición de la microbiota intestinal y se piensa que esto puede repercutir directamente en su respuesta y efectos de detoxificación ante metales pesados como arsénico, cadmio y plomo. De forma recíproca, la exposición a metales pesados puede contribuir a una disbiosis en la microbiota intestinal y este podría ser uno de los mecanismos por los cuales los efectos tóxicos de los metales pesados se presentan de forma exacerbada en presencia de la obesidad.

Debido a los hábitos alimenticios adquiridos en las últimas décadas y a la exposición a metales pesados en bajas concentraciones que se presenta hoy en día, resulta necesario estudiar el efecto en conjunto de la dieta alta en grasa con la exposición a arsénico sobre la microbiota intestinal para evaluar si la disbiosis que causa este tipo de alimentación podría ser exacerbada al añadir la exposición a este metal.

# ANTECEDENTES

## Dieta y salud

La dieta es el término utilizado para referirse a la suma de todos los alimentos que son consumidos por una persona u organismo durante un periodo de 24 horas. Los alimentos contienen distintos nutrientes que resultan necesarios para las funciones del organismo donde se incluyen: lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y agua. Los tres primeros (lípidos, carbohidratos y proteínas) nombrados macronutrientes, dentro de sus diversas funciones, cumplen con proveer energía. Los micronutrientes consideran a las vitaminas y minerales, los cuales suelen encontrarse en pequeñas cantidades y debido a que el cuerpo no puede producirlos en cantidades suficientes también resultan indispensables en la dieta. Todos los componentes anteriormente mencionados, dependiendo del alimento se encuentran en distintas proporciones (Velásquez, 2006).

Por otro lado, cuando se tiene una regularidad en cuanto a la composición, frecuencia y cantidad de alimentos y bebidas que se consumen se denomina patrón de alimentación. Las características de estos patrones o de la dieta en general dependerán de varios factores como la cultura, el ambiente, estatus económico, geográfico, disponibilidad de los alimentos, y factores del mismo individuo como sexo, edad, estado fisiológico y composición corporal, entre otros (Del Razo, 2020).

A su vez, el tipo de dieta que consumimos tendrá un efecto directo sobre nuestro estado de salud, de ahí la importancia de consumir los nutrientes en cantidades y proporciones adecuadas para satisfacer las necesidades energéticas y fisiológicas sin llegar a una ingesta excesiva (Cena & Calder, 2020). En este sentido, se sabe que el consumo de ciertos alimentos o patrones de alimentación pueden influir negativamente en la salud promoviendo el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (Del Razo, 2020). Este tipo de patrones, se consideran dietas inadecuadas y suelen caracterizarse por deficiencias o excesos en la ingesta de algún nutrimento, causando un desbalance que puede llevar a un mal estado de nutrición (WHO, 2020).

Las variaciones climáticas extremas, los conflictos humanos, los costos de alimentos saludables, los hábitos alimenticios adquiridos en las últimas décadas, así como los sistemas alimenticios, han propiciado que muchas de las dietas que hoy en día se consumen sean inadecuadas o inclusive se encuentren expuestas a contaminantes ambientales (FAO, 2021). Particularmente, las dietas altas en grasa pueden promover el desarrollo de enfermedades crónicas como la obesidad, la cual es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo (Cena & Calder, 2020).

## **Dieta alta en grasa**

En las últimas décadas, se ha encontrado que el consumo energético elevado de forma crónica a través del consumo de dietas altas en grasa puede ser un factor de riesgo modificable para el desarrollo de obesidad y otras enfermedades como la diabetes, entre otras (Y. Duan et al., 2018). Este tipo de dietas están caracterizadas por una alta densidad energética y palatabilidad que se considera pueden incrementar la ingesta de energía.

La primera vez que se describió que una “dieta alta en grasa” inducía obesidad fue en un estudio de intervención nutricional del año 1959 realizada por Masek y Fabry. Posteriormente, otros estudios demostraron que una dieta alta en grasa puede, además, promover hiperglucemia y resistencia a la insulina (Buettner et al., 2006). No obstante, debido a que mucha de la literatura ha resumido la composición de los ácidos grasos al término “dieta alta en grasa”, a lo largo de los años se han obtenido resultados contrastantes.

Actualmente se conoce que dependiendo de la cantidad y calidad de las grasas consumidas será el efecto metabólico que produzca. Un claro ejemplo, es el estudio de Buettner y colaboradores (2006), en el que los autores describieron que ratas alimentadas con una dieta con grasa de lardo, que usualmente se compone mayoritariamente por ácidos grasos saturados, causó un mayor aumento de peso y, de niveles de glucosa en sangre, además de que indujo esteatosis hepática, en comparación con ratas alimentadas con dietas donde se utilizó aceite de pescado (compuesto principalmente por ácidos grasos poliinsaturados).

De forma consistente en estudios epidemiológicos, el consumo de grasa insaturadas se ha asociado con una reducción en el riesgo cardiovascular y de la mortalidad, mientras que el consumo de grasas *trans* y en menor medida las grasas saturadas, se asocian con impactos negativos en la salud, incluyendo mayor riesgo de mortalidad (Cena & Calder, 2020).

Los mecanismos bajo los que este tipo de dietas muestran efectos adversos en la salud aún no son entendidos del todo. Duan y colaboradores (2018) mencionan que, tras la ingesta de una dieta alta en grasa, en especial aquellas compuestas mayormente por ácidos grasos saturados, se desarrolla una inflamación en el sistema nervioso central incluyendo al hipotálamo, así como en tejidos periféricos como el hígado, tejido adiposo, músculo esquelético e intestino.

Tal y como se muestra en la **Figura 1**, esta inflamación puede inducirse porque los ácidos grasos saturados libres activan distintos receptores de tipo Toll, que a su vez activarán a los macrófagos o la liberación de citoquinas a la circulación sistémica. En el cerebro, específicamente en el hipotálamo, se activan cinasas y factores nucleares causando más activación de receptores tipo Toll localizados en la superficie celular. Además, se puede inducir estrés oxidativo y, ambos procesos causan la activación de complejos proteicos como IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B interrumpiendo la señalización de hormonas como la leptina y la insulina, y así inicia la expresión de genes de respuesta a la inflamación en el hipotálamo (Y. Duan et al., 2018).

Por otro lado, en el tejido adiposo se da una acumulación de células CD8+, inducida por la presencia de citoquinas inflamatorias, lo que contribuye aún más al reclutamiento de macrófagos inflamatorios activados (M1) y que pueden alcanzar distintos tejidos. Adicionalmente, debido al estrés por la ingesta de una dieta alta en grasa, este tejido pierde la capacidad de almacenar los lípidos en exceso y éstos comienzan a depositarse en tejidos como el hígado, páncreas, músculo y vasos sanguíneos. Esta deposición, contribuye al reclutamiento de macrófagos y a mayor expresión de mediadores proinflamatorios lo cual sólo empeora la inflamación ya presente (Y. Duan et al., 2018).

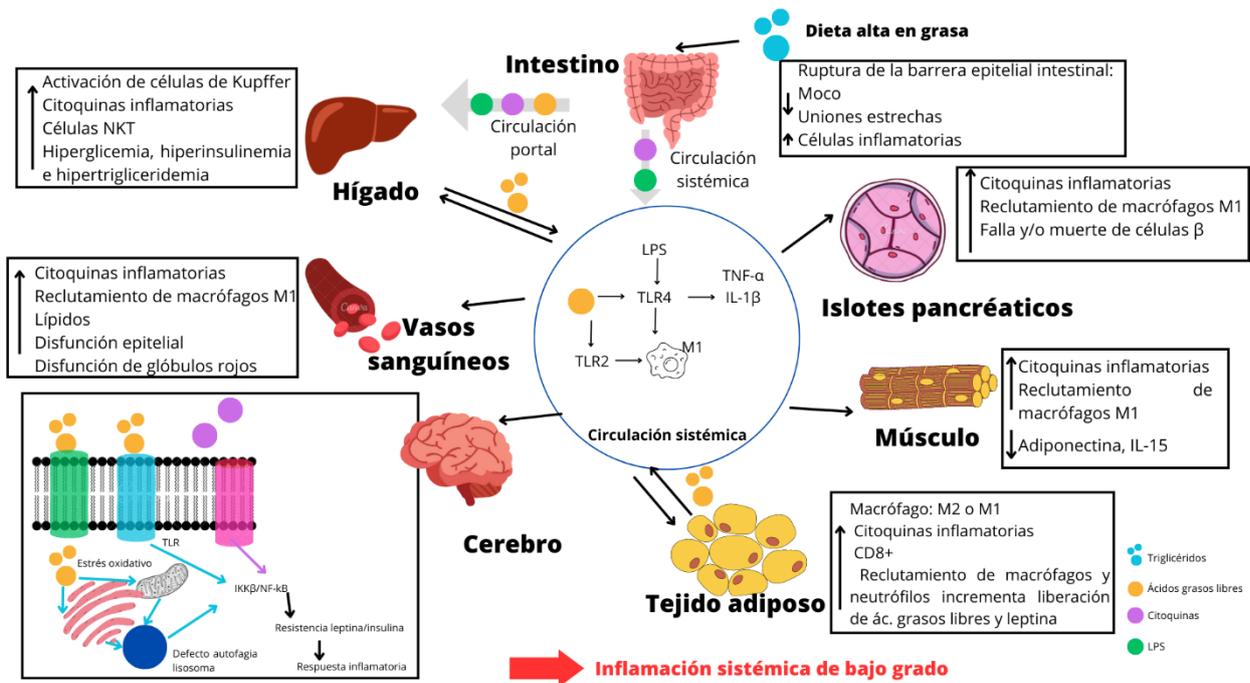
En el intestino, las grasas saturadas pueden inducir inflamación y disminuir la expresión de las uniones estrechas de manera directa o indirecta. Por ello, también se afecta la permeabilidad de la barrera intestinal comprometiendo su integridad y con ello los mecanismos protectores ante toxinas externas, antígenos y sustancias potencialmente peligrosas (Rohr et al., 2020).

En consecuencia, el hígado se ve expuesto a altas concentraciones de distintos mediadores del sistema inmune que son liberados por el tracto gastrointestinal (citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ ), lo cual promueve la acumulación de células natural killer y la activación de las células de Kupffer contribuyendo a la inflamación sistémica y hepática. Además, el hígado se enfrenta a condiciones como hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia causadas también por las alteraciones metabólicas que se presentan (Y. Duan et al., 2018).

En otros órganos como el páncreas y el músculo se presenta el mismo comportamiento, donde se sigue el reclutamiento de más macrófagos, el aumento de citoquinas proinflamatorias y las fallas o disfunciones del mismo órgano. Todo esto, en conjunto, lleva a una inflamación sistémica de bajo grado.

De forma interesante se ha postulado que dentro de los primeros pasos para el desarrollo de la inflamación crónica de bajo grado podrían encontrarse alteraciones en la microbiota intestinal (Y. Duan et al., 2018). Por ello, este mecanismo se vuelve complejo, ya que bajo condiciones de una dieta alta en grasa, se forma una red complicada de señales que promueven la inflamación a diferentes niveles y en diferentes tejidos.

Es importante mencionar que la exposición a ciertos aditivos y/o contaminantes dentro de los alimentos podría exacerbar los efectos que causa una dieta alta en grasa. Por ejemplo, ciertos aditivos como algunos conservadores, pueden disminuir hormonas como la leptina y además tienen potencial de inducir citoquinas inflamatorias (Simmons et al., 2014). Por otro lado, contaminantes como los metales pesados pueden alterar la integridad de la barrera intestinal además de propiciar una respuesta proinflamatoria (Chiocchetti et al., 2019).



**Figura 1.** Mecanismos a través de los cuales una dieta alta en grasa induce a una inflamación metabólica, figura adaptada de Y. Duan et al., 2018.

## Metales pesados y su impacto en la salud

La exposición a metales pesados en concentraciones bajas es un problema de salud global, ya que se pueden encontrar en el aire contaminado, el agua y la tierra. Esta contaminación puede extenderse a productos animales y vegetales de nuestra dieta, los cuales entran y se acumulan gradualmente en el cuerpo humano (Liu et al., 2020).

En México, la contaminación por metales pesados es un problema en aumento debido a actividad antrópicas como la minería, la metalurgia, la agricultura, los vehículos automotores y el aporte natural en ciertos mantos acuíferos. Existen reportes de la presencia de metales pesados en ríos, lagos, cultivos, suelos y aires de zonas urbanas e incluso en ambientes costeros y marinos donde se ha detectado esta acumulación en tejidos de peces y moluscos destinados a consumo humano (Covarrubias & Peña Cabriales, 2017).

Dentro de los metales contaminantes más importantes debido a su toxicidad y abundancia se encuentran el mercurio, el arsénico, el plomo y el cromo. Los sitios más afectados por las altas concentraciones en el suelo son los estados de

Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí (Covarrubias & Peña Cabriales, 2017).

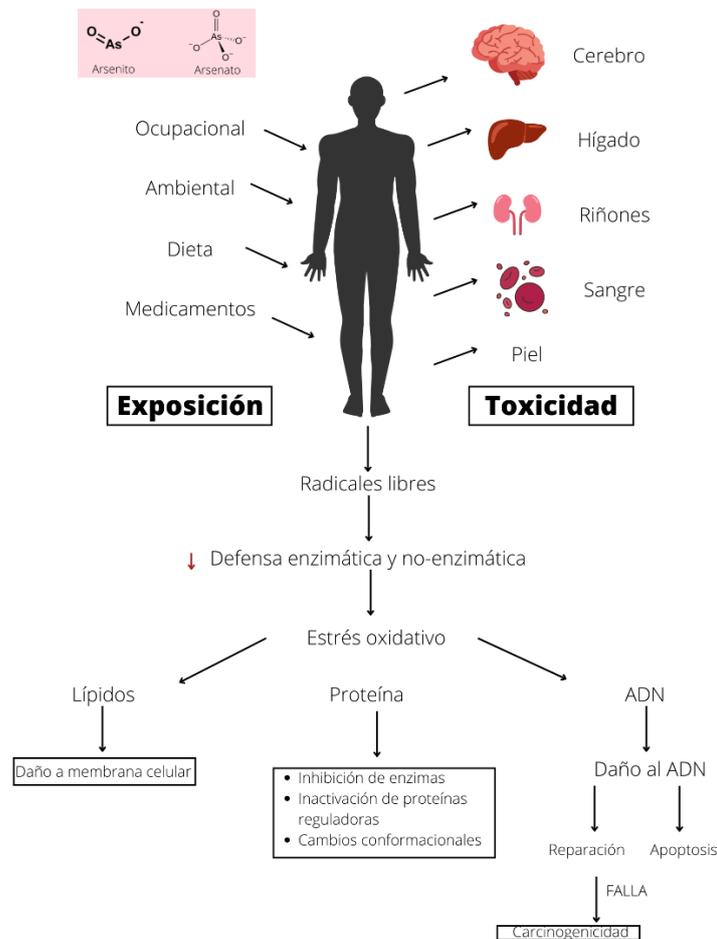
La manera en la que estos metales pueden reaccionar con los sistemas biológicos radica en la pérdida de uno o más electrones, lo cual forma cationes metálicos que tienen afinidad por sitios nucleofílicos de macromoléculas vitales. Más específicamente, pueden unirse a grupos sulfhidrilos o generar radicales libres, lo cual a su vez causa una perturbación en los procesos enzimáticos (por ejemplo, reduciendo la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa) y genera estrés oxidativo el cual puede dañar diversas macromoléculas (**figura 2**). Por ejemplo, pueden unirse a los lípidos dañando membranas celulares, a las proteínas (principalmente por la interacción con grupos tiol) inhibiendo enzimas y causando cambios conformacionales, y, en el caso de los ácidos nucleicos pueden afectar la síntesis de ADN y su reparación (Balali-Mood et al., 2021).

Por lo anterior, la toxicidad de metales pesados, tanto de forma aguda como crónica, afecta a diferentes órganos causando disfunción gastrointestinal y hepática, desórdenes en el sistema nervioso, lesiones de piel, daño vascular, disfunción del sistema inmune, defectos de nacimiento y cáncer, por mencionar algunos (Balali-Mood et al., 2021).

Aunque la exposición en muchos de los casos es baja, de forma crónica resulta ser una amenaza escondida pues puede inducir desórdenes neuropsiquiátricos incluyendo fatiga, ansiedad e impactos perjudiciales en el coeficiente intelectual en población infantil (Balali-Mood et al, 2021).

De forma interesante, la exposición a metales pesados como cadmio, plomo y arsénico también se ha asociado con la prevalencia de enfermedades metabólicas. El cadmio puede alterar el metabolismo de lípidos y carbohidratos en adipocitos, mientras que los niveles de plomo se relacionan con alteraciones en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal que puede contribuir al desarrollo de obesidad, además de que ambos generan estrés oxidativo (Ghaedrahmat et al., 2021).

Para el caso del arsénico, se ha visto que después de exposición a dosis altas (mayores a 400  $\mu\text{g/L}$ ) los niveles de HDL en plasma disminuyen mientras que los niveles de LDL incrementan, lo cual está asociado con el desarrollo de aterosclerosis. Además, se ha reportado en la literatura que puede tener efectos sobre los adipocitos y su diferenciación (Zhao et al., 2021).



**Figura 2.** Consecuencias de la exposición a metales pesados, figura adaptada de Balali-Mood et al. 2021.

### Arsénico

El arsénico es uno de los metales pesados cuya exposición por actividades ocupacionales o por el agua de bebida, alimentos y ambientes contaminados presenta riesgos para la salud pública (Balali-Mood et al., 2021).

En general, la contaminación del agua con arsénico se da en aguas profundas, pero en las zonas áridas y semiáridas de México, el agua subterránea resulta ser la única disponible para habitantes de comunidades rurales y aunque ésta se hierva, con este

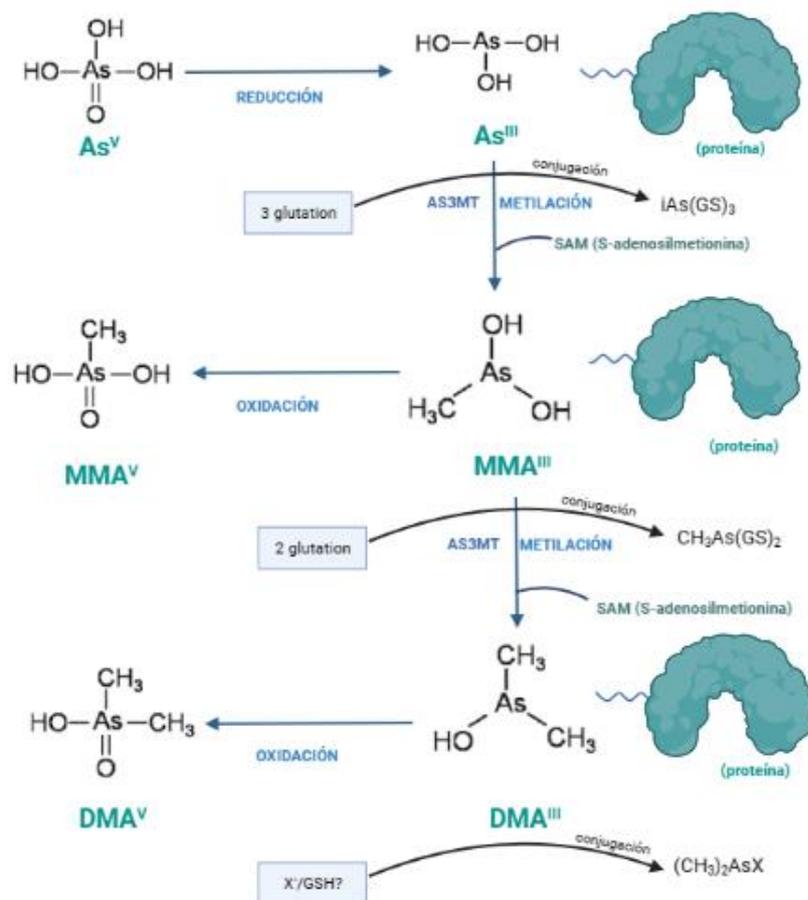
proceso sólo se logra concentrar el contenido de arsénico (Nava, 2019). De acuerdo con el Conacyt (Nava, 2019), se calcula que hay cerca de dos millones de personas expuestas al consumo de agua con concentraciones de arsénico mayores a los límites máximos permisibles en agua destinada a consumo humano (25 µg/L que deberá disminuir a 10 µg/L en 2024 en México). Para empeorar la situación, muchos de los habitantes suelen estar desinformados de las consecuencias de consumir este tipo de agua.

Una de las zonas que registra una importante contaminación por arsénico en agua potable, es la Comarca Lagunera ubicada en Coahuila y Durango, en donde las áreas con mayor problema son San Pedro de las Colonias, Tlahualilo y Francisco I. Madero. En 2011 se comenzaron a instalar filtros a pie de pozo que ayudaban a que las concentraciones de arsénico cumplieran con el límite permitido que establece la norma nacional (25 µg/L). No obstante, debido a una baja eficiencia, la mitad del agua que se extrae se fuga, por lo cual las comunidades rurales al no contar con agua de las redes acuden a tomar líquido de las norias cuyas concentraciones llegan hasta los 500 µg/L (Alcalá, 2021).

Este metal existe como metaloide ( $As^0$ ), de forma inorgánica ( $As^{3+}$  y  $As^{5+}$ ), orgánica y arsino/hidruro de arsénico ( $ASH^3$ ) y el orden de toxicidad se define de la siguiente manera: arsénicos orgánicos <  $As^0$  < especies inorgánicas < arsina (Balali-Mood et al., 2021). Su absorción primaria se da en el intestino delgado, aunque otras rutas de exposición se dan a través del contacto por piel o inhalación. Su distribución a lo largo de los tejidos y órganos incluye a los pulmones, corazón, riñones, hígado, músculos y tejido neural (Balali-Mood et al., 2021).

En el hígado, el arsénico inorgánico se biotransforma con la participación del glutatión para su reducción y después, con ayuda de una enzima llamada arsénico 3 metiltransferasa (AS3MT) se produce ácido monometil arsénico (MMA) el cual posteriormente es reducido a ácido monometil arsenoso y finalmente puede ser metilado por la AS3MT con ayuda del glutatión para generar ácido dimetilarsínico (DMA), que es la forma orgánica predominante en la excreción urinaria y es, además, la forma menos citotóxica (**figura 3**) (D. Li et al., 2021). La toxicidad aguda y crónica, dependiendo de la concentración del arsénico, se relaciona con disfunciones en

diversas enzimas vitales, ya que puede inhibir grupos sulfhidrilos y con ello su función. Por otra parte, inhibe la piruvato deshidrogenasa al unirse a la fracción lipolítica de la enzima. Esta inhibición puede llevar a un bloqueo en el ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa induciendo una disminución en la producción de ATP, que, además, resulta en daño celular. Por otro lado, el daño del endotelio capilar aumenta la permeabilidad vascular lo cual conduce a vasodilatación y colapso circulatorio (Balali-Mood et al., 2021).



**Figura 3.** Metabolismo del arsénico propuesto en humanos, figura adaptada de Khairul et al., 2017. Creado en BioRender.com

En modelos animales, la exposición crónica a arsénico en dosis de 3 ppm de arsenito de sodio tiene un efecto en el metabolismo de los lípidos; por un lado, incrementa los niveles de lisofosfatidilcolina, y por otro incrementa la oxidación de los lípidos, lo que podría asociarse con procesos inflamatorios que lleven a enfermedades crónicas. De manera similar, la exposición en útero y a temprana edad causa disrupción en el metabolismo y eleva el riesgo de desarrollar hígado graso en ratones que, además, son mantenidos con una dieta alta en grasa (Rivas-Santiago et al., 2019).

En estudios *in vitro* que se han enfocado en estudiar la sensibilidad a la insulina de los adipocitos, se ha encontrado que, a concentraciones bajas de arsenito y de formas orgánicas, se inhibe la captura de glucosa estimulada por insulina y esto es dependiente de la dosis. En el páncreas el arsénico también causa alteraciones en la secreción de la insulina y además se asocia con estrés y daño oxidativo (Díaz-Villaseñor et al., 2008).

Por su parte, Srisuporn y colegas (2023) mencionan que la exposición al arsénico suprime la adipogénesis tanto en humanos como en modelos animales y este proceso involucra cambios en la expresión de genes que regulan la diferenciación de los adipocitos, lo cual, a su vez, podría llevar a una inadecuada diferenciación de las células. De manera interesante, distintos estudios preclínicos y clínicos han mostrado que la inflamación del tejido adiposo suele ser iniciada y sostenida a lo largo del tiempo por adipocitos disfuncionales provenientes de una inadecuada diferenciación, que secretan adipocinas inflamatorias. Esto puede repercutir en un desbalance en el perfil de adipocinas, que se presenta en una inflamación crónica, lo cual es un componente mayoritario de la patogénesis de enfermedades metabólicas. Es por eso que el efecto que puede tener el arsénico sobre estas células resulta importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas.

Para el caso de los humanos, en estudios con niños de Bangladesh y adolescentes en Chile, se ha demostrado que la exposición al arsénico en útero o en las primeras etapas de vida a través de agua contaminada en concentraciones de hasta 100  $\mu\text{g/L}$ , se asocia con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Srisuporn et al., 2023). Además, estudios en distintas regiones del mundo como Taiwán, México y los Estados Unidos, han mencionado que la exposición crónica de este metal pesado en dosis mayores a 50  $\mu\text{g/L}$  en agua de bebida altera distintos parámetros cardiometabólicos aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas en la adultez (Srisuporn et al., 2023).

Asimismo, aunque la toxicidad es compleja y afecta a distintos órganos, se ha visto que recién nacidos y niños que fueron continuamente expuestos a arsénico desde el útero muestran un incremento en la expresión de genes inflamatorios, lo cual podría

estar ligado a la inflamación crónica inducida por arsénico que se presenta después en su vida adulta (Srisuporn et al., 2023).

Es importante resaltar que, en ratones, la exposición a largo plazo (6 meses) a concentraciones altas de arsénico (a partir de 50 ppm), causa necrosis y desprendimiento de la mucosa del colon y el ciego. Además, se da un adelgazamiento de las capas de músculo del intestino, lo cual es crítico debido a que la exposición tiene efectos negativos en la barrera intestinal llevando a una pérdida de las microvellosidades (D. Li et al., 2021).

En los últimos años, el estudio de la microbiota intestinal ha cobrado interés debido a que se ha descubierto que está involucrada en el metabolismo del arsénico y aunque puede proteger al cuerpo de la toxicidad aguda, su perturbación o ausencia puede incrementar la bioacumulación y toxicidad del arsénico en el hospedero (Coryell et al., 2018).

## **Microbiota intestinal**

A los microorganismos que tienen la capacidad de colonizar un ambiente o nicho biológico particular, incluyendo hongos, virus y bacterias se les conoce con el término microbiota (Gil, 2017). Existe una relación recíproca entre hospedador y la microbiota, ya que ésta puede tener un impacto sobre el organismo que lo aloja teniendo efectos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la salud.

El intestino humano es el hábitat natural para una comunidad bacteriana amplia y dinámica, la cual es muy diversa comparada a la de otras partes del cuerpo (Shreiner, 2016). Desde el duodeno en adelante, la composición es escasa y consta de alrededor  $10^5$  UFC. Conforme se avanza a través del tracto gastrointestinal aumenta la cantidad de microorganismos presentes y, en yeyuno e íleon se aprecia el incremento continuo a  $>10^8$  UFC. En la porción distal del intestino delgado la microbiota suele ser más densa ( $>10^9$  UFC) y se asemeja a la del ciego teniendo una gran cantidad de bacterias anaerobias estrictas (Gil, 2017).

En la actualidad, se conoce más sobre la microbiota humana gracias a los enfoques moleculares y microbiológicos que se utilizan para su identificación. El más conocido es el uso del gen 16S del ARN ribosomal como herramienta para conocer los diferentes tipos de bacterias, ya que el gen está presente universalmente en todas ellas y se puede obtener una caracterización taxonómica desde los niveles de dominio y *phylum* hasta el de género aproximadamente (Gil, 2017). Para lograr esto, se hace uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y más específicamente, se busca utilizar una región hipervariable de este gen (ejemplo: región V4) para tener regiones con diferencias suficientes y así distinguir las especies presentes en una muestra.

A pesar del uso de esta herramienta, aún se desconoce la imagen completa de la microbiota humana. No obstante, los *phylum* de bacterias dominantes en el intestino son: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. Particularmente, en el intestino delgado dominan las familias *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae* y finalmente, en el colon sobresalen *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*.

La abundancia de estos *phylum* suele estar influenciada por el lugar de origen, residencia y tipo de alimentación del individuo. Además, variaciones de pH, secreciones (inmunoglobulinas, bilis, enzimas), la motilidad intestinal, tejido exudado, mucinas, el uso de medicamentos como antibióticos, antiácidos y modificadores de la motilidad intestinal, son diversos factores que pueden llegar a impactar a la microbiota intestinal. También se dan interacciones microbianas como sinergia, cooperación metabólica, antagonismo/estimulación, presencia de ácidos grasos de cadena corta y/o componentes antimicrobianos que afectan la composición de la microbiota intestinal (Gil, 2017).

Entre las funciones principales de la microbiota intestinal se distinguen:

- barrera de defensa natural frente a microorganismos patógenos
- actividad metabólica adaptable (recuperación de energía y sustratos absorbibles)
- modular el desarrollo y actividad del sistema inmune

En condiciones normales, existe una comunicación y regulación entre el hospedador y la microbiota lo cual ayuda a crear un balance homeostático para que así ambas partes se beneficien y se observen efectos positivos tanto a nivel del tracto gastrointestinal como en general en la salud del hospedador. Cuando este equilibrio se ve afectado, se conoce como disbiosis intestinal (DeGruttola et al., 2016). Este mismo término, ha sido definido como la perturbación en la homeostasis de la microbiota, que conduce a cambios en su composición y/o actividades metabólicas así como en su distribución local que son perjudiciales para la salud del hospedador (DeGruttola et al., 2016). Estos autores sugieren que la disbiosis puede categorizarse en tres diferentes tipos y no son mutuamente excluyentes:

- 1) Pérdida de organismos beneficiosos
- 2) Crecimiento excesivo de organismos potencialmente dañinos
- 3) Pérdida general de la diversidad de la microbiota

La disbiosis ha sido relacionada con distintas enfermedades como la obesidad, las alergias, la diabetes mellitus, la enfermedad del colon irritable, el autismo y el cáncer colorrectal (Gil, 2017).

En varios estudios, tanto en humanos como en modelos animales, la obesidad parece estar asociada con una relación alterada entre *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, en donde la abundancia de *Bacteroidetes* muestra una disminución mientras que se da un aumento en la proporción de *Firmicutes* (DeGruttola et al., 2016). Además, se ha planteado que no solo la microbiota sino también sus metabolitos se relacionan con el estado de salud y la presencia de algunas enfermedades. De manera interesante, la dieta resulta ser uno de los factores más importantes dentro de esta causalidad, ya que los microorganismos dependen de los recursos proporcionados por el hospedador (Johnson et al., 2020).

### [Dieta y microbiota](#)

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores más importantes que pueden afectar a la microbiota intestinal es la dieta. Cada especie microbiana tiene un medio metabólico óptimo, compatible para su crecimiento, por lo que los alimentos que se consumen influyen en el tipo de microorganismos que colonizan el intestino. Por

ejemplo, la alimentación con leche materna en los lactantes, la composición de los alimentos, la presencia de fibras no digeribles y los compuestos no nitrogenados, entre otros, influyen en la composición de la microbiota intestinal. Es por eso que una dieta rica en fibra promueve una microbiota intestinal considerablemente diferente de aquellas que se desarrollan con una dieta rica en grasas de origen animal (Gil, 2017).

A partir de esto, se ha propuesto que la dieta puede interactuar de dos maneras con la microbiota intestinal y con ello inducir efectos en el hospedero. La primera es a través de dietas específicas, patrones alimenticios y/o componentes de los alimentos que cambien la composición de la microbiota de una manera predecible y con ello la fisiología del hospedador. La segunda manera es a través de metabolitos bacterianos derivados de componentes dietarios, como los ácidos grasos de cadena corta y productos de fermentación proteolítica que podrían influenciar la fisiología del hospedador (Johnson et al., 2020).

Llama la atención que, parte de la literatura sugiere que las respuestas microbianas a los alimentos son personalizadas. Por ejemplo, posterior a la ingesta de alimentos ricos en fibra la persona puede presentar una respuesta o no y esto puede ser derivado de los grados de fermentación que presenta la microbiota de cada persona (Johnson et al., 2020).

### *Efecto de los patrones dietarios sobre la microbiota intestinal*

En los últimos años ha sido de interés estudiar distintos tipos de dieta y su habilidad para modular la microbiota intestinal, enfocándose en los componentes principales que suelen caracterizar a cada dieta.

#### *Dieta alta en grasa*

Aunque el término dieta alta en grasa es muy amplio, en modelos animales suele considerarse que una dieta alta en grasa es aquella donde el 40% de energía proviene de la grasa (Schrauwen & Westerterp, 2000). Sin embargo, varios autores toman en consideración un rango entre 45-60%.

Los estudios en modelos animales han utilizado la dieta alta en grasa para poder estudiar los mecanismos relacionados con distintas enfermedades, no obstante, en

muchos de ellos se suelen utilizar distintos tipos de grasa, por lo que el efecto que puede causar la grasa depende principalmente del tipo de ácidos grasos que la conforman. A pesar de esto, se ha observado que el consumo excesivo de grasas cuya composición mayoritaria consiste en ácidos grasos saturados, lardo o el aceite de palma, afecta significativamente tanto a la microbiota intestinal como al peso corporal (An et al., 2022). Por otro lado, a pesar de que no existe un estándar para una dieta alta en grasa, hay efectos en la microbiota intestinal que suelen permanecer constantes como lo es el aumento en la abundancia del filo *Firmicutes* y la disminución en las cuentas de *Bacteroidetes* (Singh et al., 2017). Además, se ha observado una disminución en la abundancia de *Proteobacteria* (B. Wang et al., 2020).

Otra observación consistente es la disminución significativa de la abundancia de *Akkermansia muciniphila*, después de una exposición a una dieta alta en grasa, por lo que se considera como un taxón sensible a estas condiciones (Araújo et al., 2017). Asimismo, la dieta alta en grasa produce un decremento de la abundancia de géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* así como el aumento de taxones como *Clostridiales* y *Enterobacteriaceae* (Araújo et al., 2017).

En contraste, en distintos estudios en ratones se ha observado un incremento de la familia *Helicobacteraceae* después del consumo de dietas ricas en grasas saturadas de origen animal (An et al., 2022). Por su parte, Walker y colaboradores reportaron que, en el mismo modelo animal, la familia *Erysipelotrichaceae* puede llegar a ser predominante bajo una dieta alta en grasa, y también suele darse un aumento en la abundancia de la familia *Ruminococcaceae* y del filo *Deferribacteres* (Walker et al., 2014).

Es importante resaltar que algunos de estos comportamientos pueden variar dependiendo de la especie bacteriana. Un claro ejemplo de esto es lo que sucede dentro del género *Lactobacillus* donde, en ratas, se ha llegado a observar que tras una alimentación con una dieta alta en grasa se provoca una disminución de la abundancia de *Lactobacillus intestinalis*, que correlaciona negativamente con la masa grasa y el peso corporal (Singh et al., 2017). En contraste, otros autores han observado, en ratones, un incremento de la abundancia de este género debido a una alimentación alta en grasa (Xiao et al., 2017).

Por otro lado, aunque una dieta alta en grasa suele provocar una reducción en la diversidad de la microbiota y en la producción de ácidos grasos de cadena corta, la elección del grupo control y así como diferencias en el consumo de otros nutrientes son capaces de alterar lo comúnmente observado (B. Wang et al., 2020).

En humanos, a través de la comparación de la microbiota de individuos con obesidad y delgados, se observó que aquellos con mayor riqueza de bacterias presentaban una menor adiposidad e inflamación que los sujetos con poca riqueza bacteriana, lo cual se alinea con la inflamación y el decremento en diversidad bacteriana inducidos por una dieta alta en grasa (Y. Duan et al., 2018).

Por lo anterior, en los últimos años ha habido interés por el estudio de la disrupción que presenta la microbiota intestinal debido al consumo de una dieta alta en grasa, además del efecto de los ácidos grasos libres sobre las células intestinales, ya que se sugiere como el primer paso para presentar una inflamación sistémica de bajo grado.

#### *Dietas modernas y su influencia sobre la microbiota intestinal*

La dieta Mediterránea ha sido vista como una dieta balanceada y sana que se distingue por incluir ácidos grasos beneficiosos (monoinsaturados y poliinsaturados) así como por contener altos niveles de polifenoles y otros antioxidantes, fibra y mayor presencia de vegetales que de alimentos de origen animal. A este respecto, distintos estudios han detectado que una mayor adherencia a este tipo de dieta mejora el perfil de lípidos y se asocia con una menor inflamación lo cual podría estar mediado por incrementos en géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* y una disminución de *Clostridium* (Singh et al., 2017).

En contraste, algunos estudios que han evaluado la influencia de dietas veganas y vegetarianas (ricas en alimentos fermentables provenientes de plantas) sobre la microbiota muestran discrepancias. Algunos han encontrado menores cuentas de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, mientras que otros apenas y logran percibir diferencias taxonómicas con respecto a sujetos que llevan una dieta omnívora; no obstante, son dietas en las que hace falta aún más investigación al respecto (Singh et al., 2017).

Otra de las dietas populares que ha sido ampliamente estudiada es la dieta Occidental, la cual se caracteriza por el consumo de productos industrializados ultra-procesados, cuyas formulaciones pueden derivar de constituyentes como grasas hidrogenadas, almidones modificados, así como de aditivos sintéticos (potenciadores de sabor, colorantes, emulsificantes y otros) para mejorar las características de los alimentos (Zinöcker & Lindseth, 2018). Esta dieta comúnmente introduce una alta cantidad de energía proveída por nutrientes acelulares. Es decir, nutrientes que ya no están contenidos en células de origen animal o vegetal y que por lo tanto proveen sustratos más fáciles de metabolizar, y que pueden modificar el crecimiento bacteriano. Para ejemplificar, posterior al procesamiento de los alimentos, puede haber quiebre de las paredes celulares que afecta la disponibilidad de nutrientes en el intestino delgado, lo cual puede modificar la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal (Zinöcker & Lindseth, 2018).

En diversos estudios, la dieta Occidental (alta en proteína animal y grasa, baja en fibra) ha sido ligada a un decremento en la cuenta total de bacterias y sobre todo en bacterias benéficas, como *Bifidobacterium* y *Eubacterium*, además de que se ha asociado con la producción de nitrosaminas que podrían promover el cáncer (Singh et al., 2017).

Por otro lado, se ha reportado que la presencia de ciertos emulsificantes pueden incrementar los factores de virulencia y por ende aumentar el potencial proinflamatorio de la microbiota intestinal. De una forma parecida, algunos edulcorantes no calóricos alteran la composición del microbioma provocando un deterioro en la tolerancia a la glucosa y un incremento en el potencial proinflamatorio (Zinöcker & Lindseth, 2018).

Es importante recordar que, debido al estilo de vida y rapidez adaptadas en los últimos años, hoy en día las dietas también están expuestas a distintos tipos de contaminantes.

### Arsénico y microbiota

Como se mencionó anteriormente, la exposición a metales pesados a través del agua de bebida o de los alimentos representa un problema de salud pública.

Ambientalmente, se ha observado que el estrés causado por metales pesados suele disminuir la diversidad y actividad de las poblaciones microbianas en la tierra, alterando el equilibrio de las interacciones de poblaciones dentro de la comunidad (F. Wang et al., 2010). El efecto tóxico de los metales pesados proviene principalmente de la interacción del metal con las proteínas y la inhibición de procesos metabólicos (F. Wang et al., 2010).

El efecto de la exposición a arsénico se ha estudiado mayormente en la microbiota ambiental, sin embargo, las observaciones de estos estudios pudieran ayudar a entender lo que está sucediendo en el ambiente intestinal. No obstante, no debe perderse de vista que las condiciones fisicoquímicas del intestino son muy distintas a las condiciones presentadas en el medio ambiente, principalmente con condiciones anaeróbicas, distintos valores de pH e interacciones complejas.

A diferencia de los animales y de las plantas presentes en un ambiente, los microorganismos son altamente sensibles a los metales/metaloides pesados, debido a que, en términos de biomasa, actividad y diversidad son más vulnerables ante este tipo de contaminación. Es por eso que, durante los últimos años, también se ha estudiado cómo los microorganismos han evolucionado con mecanismos de adaptación y resistencia como respuesta ante la toxicidad por metales pesados (Hao et al., 2021).

Un ejemplo de esto es el operón *ars* que confiere propiedades para la biotransformación del arsénico y su transporte. Este operón junto con sus distintas variantes se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los microorganismos para hacer frente al arsénico del medio ambiente (Hao et al., 2021).

En una revisión sobre la microbiota resistente y su patrón de distribución en el medio ambiente, se encontró que *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Desulfobacterota*, *Myxococcota* y *Firmicutes* son los filos persistentes identificados en distintos estudios con una variedad de ambientes contaminados con metales o metaloides pesados (Hao et al., 2021).

En específico, *Proteobacteria* fue el grupo más ampliamente distribuido en este tipo de ambientes con una fuerte capacidad de adaptación y tolerancia. Dentro de este filo se ha identificado la mayor variedad y abundancia de genes que confieren resistencia a metales/metaloideos pesados, seguido por *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Hao et al., 2021). No obstante, los mismos autores resaltan que otros factores ambientales o intrínsecos pueden tener un efecto sobre la composición de la microbiota, mayor que la concentración o el tipo de metal pesado. Esto debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas del ambiente como el pH, materia orgánica y, estatus aerobio-anaerobio, entre otros.

Por ejemplo, anteriormente se ha demostrado que en tierra con bajo pH se favorecen genes que codifican a funciones involucradas con los sistemas de flujo de múltiples metales pesados (Hao et al., 2021). Además, se conoce que a nivel de intestino, tanto el metabolismo como la competencia bacteriana depende de las condiciones de oxígeno, pH, concentración de ciertos metabolitos y tiempo de tránsito intestinal (Louis et al., 2007).

Por otro lado, la diversidad suele ser utilizada como índice para ambientes contaminados por metales o metaloideos pesados. La manera en la que se comporta la diversidad depende mucho de las condiciones bajo las que se realizan los estudios, ya que en ambientes altamente contaminados o exposición a corto plazo en laboratorios se ha observado una reducción de la diversidad, mientras que en otros casos donde se da una exposición a una concentración baja (en especial a metales esenciales como cobre o zinc) se ve una promoción de crecimiento de varias bacterias lo cual lleva a un incremento en la diversidad (Hao et al, 2021).

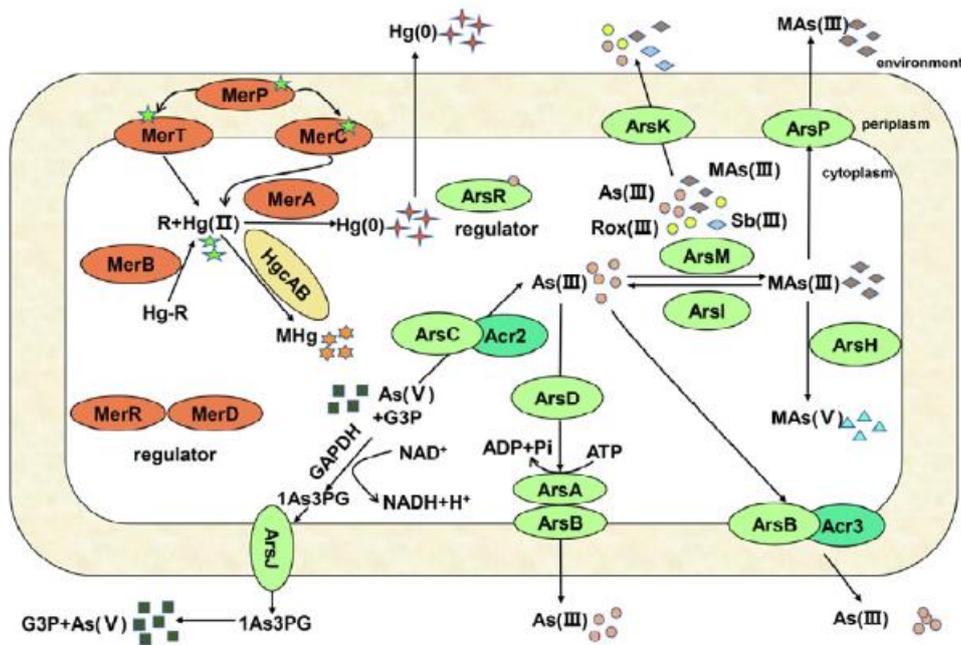
Otro factor importante por resaltar con respecto a la resistencia a metales pesados, es la transferencia vertical y horizontal de genes, así como la duplicación y la mutación, ya que son mecanismos primordiales involucrados en el desarrollo de resistencia a metales pesados en ambientes contaminados. Inclusive, Hao y colaboradores resaltan que otro aspecto que ha sido ignorado son las interacciones entre microorganismos, en especial la competencia (Hao et al, 2021).

Todo esto resulta importante, ya que podría ayudar a plantear hipótesis sobre lo que podría estar sucediendo en un ambiente intestinal, cuando las comunidades comienzan a ser expuestas a metales pesados. De hecho, a pesar de que el arsénico puede ser biotransformado en el hígado como se describió anteriormente, diversos estudios han reportado que pueden quedar restos de este metal en el intestino o bien pueden ser excretados a través de los ácidos biliares al intestino (J. Wang et al., 2020).

Aunque mucho de lo que se conoce de las interacciones microbiota-arsénico provienen principalmente de la microbiología ambiental, algunos principios pueden ser aplicados a lo que sucede en nuestra microbiota intestinal (Coryell et al., 2019). Por ello, las interacciones se pueden resumir en tres comportamientos:

1. Sin efecto notable
2. Alteraciones farmacológicas y/o toxicológicas de las propiedades de los tóxicos
3. Perturbación de la taxonomía microbiana y su función

La microbiota intestinal es la primera línea de defensa en contra de los efectos tóxicos de metales pesados, ya que tiene la capacidad de modificar estos contaminantes. Particularmente se ha sugerido que la microbiota intestinal podría ser un factor importante en la transformación del arsénico. J. Wang y colaboradores (2020) llevaron a cabo experimentos *in vitro* con heces humanas incubadas con  $As^V$  y encontraron que la comunidad microbiana presente en las muestras, logró metilar el  $As^V$  a  $MMA^{III}$  y  $MMA^V$ . Por otro lado, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, que es una bacteria común presente en la microbiota intestinal, ha mostrado una alta resistencia al arsénico inorgánico penta y trivalente al igual que a los metilarsénicos. Esto es debido a que presenta los genes *arsR*, que le permiten regular la expresión de otros genes como *ArsB/Acr3* y *ArsC* que constituyen la respuesta básica de resistencia al arsénico (Rawle et al., 2021), así como *arsDABC* que son genes bien caracterizados y que cumplen con un rol de detoxificación al reducir el metal pesado (**Figura 4**) (J. Li et al., 2016).



**Figura 4.** Mecanismo de resistencia para arsénico (verde) presentado en bacterias, figura tomada de Hao et al., 2021.

Como se observa en la **figura 4**, los mecanismos de resistencia al arsénico que pueden presentar algunas bacterias pueden ser divididos entre sistemas de detoxificación de arsénico orgánico o inorgánico. El mecanismo de detoxificación de arsénico inorgánico incluye al operón *arsRDABC* y *acr3*. Por ejemplo, si el As (III) se combina con la proteína represora *ArsR*, se desencadena la expresión del operón *ars* el cual contribuye a la resistencia bacteriana ante el arsénico como anteriormente se describió. El As (V) puede ser reducido a As (III) por la reductasa de arsenato *ArsC/Acr2* y el As (III) resultante puede ser expulsado directamente vía *ArsB/Acr3/ArsK* o unirse a la chaperona *ArsD* que lo entrega a la bomba de flujo dependiente de ATP *ArsAB*. Por su parte, *ArsM* y *ArsI* son responsables de la metilación de As (III). Para el caso del arsénico orgánico, el sistema de detoxificación se compone de *ArsP* que es responsable del flujo de ácido monometilarsenoso (MMA (III)) y roxarsona (Rox (III)), compuesto organoarsénico), de *ArsJ* que es responsable del flujo de 1-arseno-3-fosfoglicerato (1As3PG) y enzimas responsables de biotransformación de arsénico orgánico como *arsM*, *arsH* y *arsI*. Finalmente, el transportador *ArsK* es el responsable para resistir As (III), metilarsenito (MAs (III)) y roxarsona (Hao et al., 2021).

Llama la atención que en modelos murinos se ha observado que aquellos animales con una microbiota desbalanceada excretan menos arsénico a través de las heces y en cambio se acumula más en sus órganos (J. Wang et al, 2020). De acuerdo con Coryell y colaboradores (2019), los ratones tratados con antibióticos para disminuir la biomasa de microorganismos presentes, y que son posteriormente expuestos a arsénico, mostraron una reducción de la excreción de arsénico en heces y un incremento en la acumulación dentro del hospedador principalmente en hígado y pulmón.

Se ha propuesto que el arsénico puede ser absorbido por la microbiota a través de canales iónicos en sus membranas celulares, lo que reduce el arsénico total disponible. Además, la microbiota puede influenciar la absorción del arsénico al cambiar el ambiente físico y químico en el tracto gastrointestinal; no obstante, aún no se dilucida por completo el mecanismo a través del cual la microbiota intestinal disminuye la carga de arsénico (Chi et al., 2019).

En conjunto, la exposición al arsénico puede alterar la composición y perfil metabólico de la microbiota y, ésta puede proporcionar efectos beneficiosos para el hospedador al alterar la absorción y el metabolismo de los metales pesados. Particularmente, puede actuar como una barrera física para absorberlos, alterar el pH y el balance oxidativo del tracto gastrointestinal así como modificar la expresión de enzimas y proteínas de detoxificación involucradas en la biotransformación de los metales pesados (H. Duan et al., 2020).

Debido a lo observado a nivel ambiental y en modelos murinos, distintos autores han investigado el efecto del arsénico sobre la microbiota intestinal. Algunos de ellos han encontrado modificaciones de las abundancias relativas dependiendo principalmente tanto del periodo de exposición como de la concentración de arsénico utilizada.

Li y colaboradores (2021), notaron que una exposición a largo plazo en concentraciones altas de arsénico (50 ppm) causó un incremento en la abundancia de *Firmicutes* mientras que *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* disminuyeron. Gokulan y colaboradores en 2018 al investigar el potencial de toxicidad a corto plazo de la exposición a arsénico, en la microbiota intestinal de ratones, encontraron que los

taxones pertenecientes al filo de *Deferribacteres* aumentaban significativamente. Este último filo resulta importante ya que dentro de él se encuentran especies que son conocidas por contar con genes de resistencia al arsénico. Además, encontraron que con la exposición a una dosis baja (0.05 mg/kg p.c.) se daba la aparición de *Clostridium sulfatireducens* la cual al ser una bacteria reductora de sulfato podría estar involucrada en la tiolación del arsénico.

Finalmente, en una revisión llevada a cabo por H. Duan y colaboradores en 2020, los autores resaltaron a las especies *Mucispirillum schaedleri* y *Lactobacillus johnsonii* como taxones involucrados en la detoxificación.

En algunos casos, estos hallazgos han sido consistentes con lo que se ha observado en humanos. Por ejemplo, en una cohorte de niños estadounidenses con exposición baja-media al arsénico, 8 géneros pertenecientes al filo de *Firmicutes* se asociaron positivamente con excreción urinaria de arsénico, mientras que 15 géneros incluidos *Bacteroides* y *Bifidobacterium* se asociaban negativamente (Coryell et al., 2019). Por otro lado, en niños de Bangladesh expuestos a niveles altos de arsénico en agua de bebida, se observó mayor abundancia de *Gammaproteobacteria* con miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Coryell et al., 2019).

A pesar de que varios estudios se centran en formas de arsénico presentes en el agua por contaminación, las formas orgánicas como el MMA y DMA presentes en los alimentos como el arroz, también podrían afectar el estado de salud, además de que podrían biotransformarse en mayor grado por los microorganismos. Aunado a esto, Wang y colaboradores (2020) resaltan la importancia de tomar en cuenta también la presencia de ciertos hongos ya que pueden tener también un rol importante en la detoxificación debido a que la mayoría contiene genes de resistencia al arsénico como *arsM*.

De manera interesante, Coryell y colaboradores (2019) resaltan que pocos estudios han discutido que el metabolismo del hospedador puede llegar a ser igual de importante o quizás más que el metabolismo del mismo microbioma con respecto a la biotransformación y toxicidad del arsénico, ya que las alteraciones en la estructura

y función de la microbiota intestinal son casi siempre parte de la respuesta fisiológica del cuerpo.

### Efectos de una dieta alta en grasa y arsénico en la microbiota

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que personas con obesidad, que en su mayoría llevan una alimentación basada en una dieta alta en grasa, acumulan más metales pesados en el organismo en comparación con personas sanas (T. Liu et al., 2020).

De forma interesante, y hasta nuestro conocimiento, el estudio realizado por T. Liu y colaboradores (2020) es el único que ha investigado el efecto que tiene una dieta alta en grasa en combinación con la exposición a metales pesados. Estos autores encontraron que con una dieta alta en grasa, el contenido de arsénico, cadmio y plomo que se acumulaba en hígado y riñones era significativamente mayor que en ratones alimentados con una dieta control. Además, la excreción de estos metales a través de las heces era significativamente menor que en los ratones alimentados con la dieta control.

Dentro del estudio anterior además se expone que la microbiota intestinal asociada a la dieta control vs la alta en grasa, presenta características y efectos de detoxificación distintos ante los metales pesados. Particularmente, proponen que la microbiota perteneciente a una dieta alta en grasa puede presentar debilidades al momento de eliminar o detoxificar metales pesados en comparación con la microbiota de una dieta control. Por ello, los autores sugieren que una dieta alta en grasa puede incrementar el riesgo de enfermedad por exposición a metales pesados.

Es de importancia resaltar que una dieta alta en grasa suele aumentar la presencia de *Firmicutes*, que es un filo donde se pueden encontrar distintos microorganismos asociados a la inflamación como *Clostridium*, *Lachnospiraceae* y *Erysipelotrichaceae*, que pueden causar un desbalance inicial. Si a esta disbiosis, además se le añade la exposición al arsénico, el daño a la barrera intestinal podría exacerbarse y a su vez incrementar los riesgos a la salud por la exposición a metales pesados (Wang et al, 2020).

En cuanto a los cambios en los taxones, Liu y colaboradores (2020) encontraron que la combinación de dieta alta en grasa y exposición a arsénico provocó una disminución significativa de las abundancias del filo *Actinobacteria* específicamente la familia *Coriobacteriaceae* y del filo *Verrucomicrobia* el género *Akkermansia*, aunque no se observaron aumentos que alcanzaran la significancia (T. Liu et al., 2020).

Por lo anterior es claro que la relación entre la exposición al arsénico y la microbiota intestinal es bidireccional. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no se ha estudiado si los efectos que causa una dieta alta en grasa sobre la comunidad bacteriana a la que posteriormente se añade el arsénico tendrá un efecto similar a lo que en su momento reportaron T. Liu y colaboradores en 2020. Esto resulta interesante ya que una disbiosis antes de la exposición podría representar un factor de riesgo hacia los efectos tóxicos del metal pesado (H. Duan et al., 2020).

Por ello, resulta de interés estudiar como la combinación de una dieta alta en grasa junto con exposición al arsénico influye en la composición de la microbiota intestinal. Esto nos permitirá entender si los cambios de la microbiota intestinal, asociados con este tipo de dieta, podrían ser uno de los mecanismos involucrados en el efecto tóxico de metales pesados como el arsénico, además de que se contaría con más resultados para este tipo de condiciones (dieta alta en grasa en conjunto con arsénico).

## **HIPÓTESIS**

La exposición a arsénico exacerbará la disbiosis en la microbiota intestinal, característica de una dieta alta en grasa.

# OBJETIVOS

## General

Estudiar el efecto de una dieta alta en grasa junto con la exposición al arsénico como contaminante ambiental sobre la estructura de la microbiota intestinal.

## Particulares

- Caracterizar la microbiota intestinal de ratones que estuvieron expuestos a una dieta alta en grasa en comparación con una dieta control.
- Comparar la microbiota intestinal en presencia o ausencia de arsénico bajo los diferentes tipos de dieta.

# PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

## Ratones y recolección de muestras

El estudio incluyó 48 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 7 a 8 semanas de edad y se realizó en el Bioterio de la UAM Xochimilco. Este tipo de cepa es una de las más utilizadas en investigación, la cual al ser isogénica permite reducir la variabilidad entre individuos, además una de sus características por la cual suele ser elegida para este tipo de estudio es que es susceptible a desarrollar obesidad inducida por dieta, así como a presentar resistencia a la insulina (Charles River, 2023).

Los animales fueron alimentados por un periodo de 8 semanas con dietas comerciales; la dieta control (low fat diet, Test Diet #5TJS) (n=18) en la que la energía estuvo compuesta de 12% de grasa, 72.2% de carbohidratos y 16% de proteína o con dieta alta en grasa (Western diet, Test Diet #5TJN) cuya distribución energética fue 39.9 % de grasa, 44.1% de carbohidratos y 16.3% de proteína en Kcal, (n=18) y de beber se les dio agua acidificada del bioterio de la UAM. A partir de la octava semana del estudio, los animales de los grupos dieta Control y dieta Alta en Grasa se dividieron para añadir 100  $\mu\text{g/L}$  de arsenito de sodio en el agua, quedando cuatro grupos que fueron denominados: dieta Control-As y dieta Alta en Grasa-As y se continuó el estudio por 8 semanas más. Los ratones fueron colocados en 16 cajas, cada una con 3 ratones con un promedio de peso similar entre ratones, dependiendo de la dieta bajo la cual estarían expuestos.

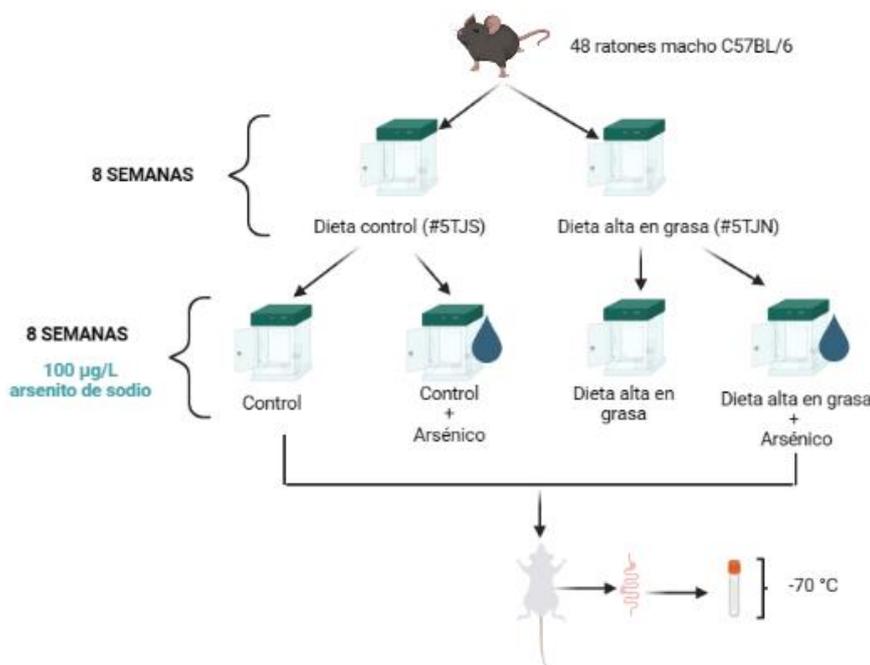
Para el presente estudio se decidió utilizar una dosis de 100  $\mu\text{g/L}$  de arsenito de sodio por un lado porque investigaciones anteriores han llegado a utilizar dosis muy altas (25-50 mg/L) que a pesar de que los modelos murinos pueden biotransformar el arsénico de manera más rápida y eficiente que un ser humano, resultan ser desproporcionadas de los niveles actuales de exposición. Por otro lado, este estudio forma parte de un proyecto de investigación más amplio cuyo objetivo incluye evaluar si los efectos del arsénico sobre el metabolismo del tejido adiposo blanco están asociados con una disbiosis de la microbiota intestinal (Calderón-DuPont et al., 2023). En ese estudio se ha trabajado previamente con la dosis mencionada que además

buscó asemejar un grado de exposición similar a lo que las poblaciones hoy en día pueden estar expuestas a nivel ambiental (Calderón-DuPont et al., 2023).

Una vez que se comenzó con la exposición a arsénico en el agua, el cambio de botellas se realizó dos días por semana para evitar la oxidación del arsenito de sodio. Además, en estos días se realizó la cuantificación de agua restante para estimar la cantidad ingerida por ratón con una prueba de Wilcox, con la cual se determinó que no hubo diferencia en la cantidad de agua consumida lo cual sugiere que todos los ratones estuvieron expuestos a la misma concentración de arsénico (**Anexo Tabla A3**).

Durante la eutanasia se realizó la colección del intestino y se extrajo el contenido del ciego y del colon. Todas las muestras obtenidas se colocaron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Para el presente estudio se decidió utilizar las muestras del contenido del ciego debido a que en esta zona ocurre la mayor actividad biológica (Anders et al., 2021).



**Figura 5.** Diagrama del diseño del estudio, creado en BioRender.com

## Extracción del ADN

La extracción del ADN del contenido intestinal, se hizo a través del kit QIAamp PowerFecal Pro DNA el cual permite obtener el ADN a partir de muestras que suelen contener distintas sustancias que pueden ser inhibidores durante una PCR, como polisacáridos, componentes hemo y sales biliares. Este kit permitió dispersar la muestra, homogeneizarla, provocar lisis celular por medio de métodos tanto químicos como mecánicos para así poder obtener el material genético, el cual posteriormente se lavó y se eluyó en columna (QIAGEN, 2020). Se continuó con la medición de concentración del ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), al igual que la determinación de las relaciones 260/280 y 260/230, a través del espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c, con las cuales se pudo evaluar la pureza del ADN y así determinar si no había presencia tanto de proteínas y/o residuos del proceso de extracción restantes en cantidades significativas en las muestras aisladas (Desjardins, 2010). Este espectrofotómetro tiene la ventaja de que permite realizar mediciones a partir de micro volúmenes de las muestras (Thermo Scientific, 2020).

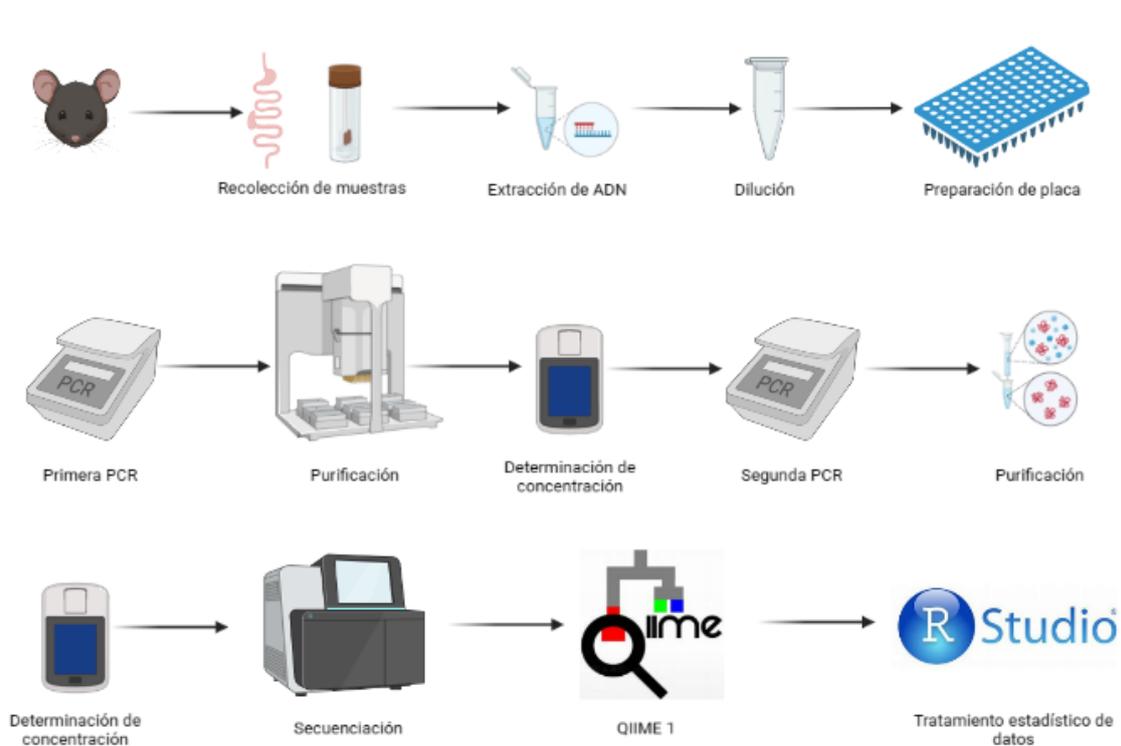
Con estas mediciones se pudo conocer qué muestras necesitarían de una dilución antes de realizar la reacción en cadena de la polimerasa, debido a que se necesita una concentración de  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .

## Preparación de librerías y secuenciación

La PCR se realizó en una placa de 96 pozos acomodando las muestras de manera tal que se evitara un sesgo en las muestras, es decir, evitar que la mayoría de las muestras de cierta condición quedaran ubicadas en una misma parte de la placa (**Anexo Figura A4**). En la realización de la PCR la estrategia radicó en amplificar la región V4 del gen 16 S del ARN ribosomal, haciendo uso de los primers 515f y 806r, basando el diseño en el utilizado por el Earth Microbiome Project (Thompson, 2018). Además, se trabajó en total con 24 primers reverse, de manera tal que se tuviera un “código de barras” distinto para cada muestra por bloque (cada bloque constaba de 24 pozos) y a su vez poder delimitar la secuencia de interés a amplificar, también se agregó la mezcla maestra conformada de la enzima Taq Polimerasa y el forward.

Posterior a la PCR, se realizó una electroforesis (65 V por 45 minutos) para comprobar la amplificación de las muestras. Se continuó con la purificación de los amplicones resultantes haciendo uso de perlas AMPure XP con ayuda del robot Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform para asegurarse de eliminar cualquier contaminante restante, nucleótidos y fragmentos muy pequeños. Después de la purificación del material genético, se realizó su cuantificación a través del fluorómetro Qubit para calcular el volumen necesario de cada muestra para contar con 25 ng de cada una. Posterior a esto se realizó la preparación de pools para continuar con la segunda PCR, la cual tiene como objetivo añadir una segunda secuencia de códigos de barras así como las secuencias que se unirán a los adaptadores de Illumina necesarios para el proceso de secuenciación. Por ello, se obtuvieron cuatro conjuntos (24 muestras por cada uno) a los que se les adicionó la mezcla de la enzima Taq polimerasa, el forward y los 4 primers reverse con diferentes códigos de barras. De nuevo, tras la obtención de los amplicones se realizó una purificación con ayuda de las perlas AMPure XP y se determinaron las nuevas concentraciones a través de Qubit (ng/ $\mu$ L).

Se continuó con la realización de la mezcla final en un tubo (los 4 conjuntos en un solo tubo) para llevarla a la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica en donde se utilizó la plataforma de Illumina Miseq. La secuenciación a través de esta plataforma se basa en que utiliza nucleótidos que emiten una fluorescencia específica al formar los enlaces con las bases complementarias, esta iluminación característica de cada base es identificada y así se genera un archivo con las secuencias encontradas. Este proceso es aleatorio y exponencial por lo cual también registra el número de lecturas que se tuvo para cada muestra y qué tantas especies se encontraron (Illumina, 2016).



**Figura 6.** Pasos de la estrategia experimental de la caracterización de la microbiota intestinal, creado en BioRender.com

## Procesamiento de datos

Al obtener las secuencias se realizó el procesamiento de los datos con ayuda del algoritmo QIIME1.9. Brevemente, se aplicaron filtros de calidad, se realizó la demultiplexación (para así reconocer de qué muestra provenían) y se detectaron posibles quimeras con USearch61 para ser excluidas del análisis. Posteriormente, se agruparon las secuencias que tuvieran un 97% de similitud y se generaron las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) correspondientes.

Además, se llevó a cabo un submuestreo a una profundidad determinada conocido como rarefacción, el cual consiste en un paso importante debido a que ayuda a homogeneizar el número de lecturas y así llevar a cabo un corte en donde se asegure que se visualicen todas las muestras y no se dé preferencia a aquellas con mayor número de lecturas o lleguen a eclipsar aquellas que tuvieron un número de lecturas menor en la secuenciación, para este caso se realizó un corte en las 50,000 lecturas.

Para poder determinar la diversidad alfa que incluye tanto riqueza (el número de OTUs presentes dentro de las muestras) como diversidad la cual toma en cuenta su equidad, se hizo uso de los índices: OTUs observadas, Chao1, ACE, Shannon, Simpson y su inverso, y Fisher.

En cuanto a la medida de las diferencias entre las comunidades con respecto a otras, se hizo uso de la diversidad beta. Se obtuvieron las matrices de distancia de Bray-Curtis para conocer qué tan diferentes eran las comunidades entre sí tomando en cuenta las OTUs presentes y su abundancia, y también la distancia de Jaccard para visualizar la diferencia considerando presencia o ausencia de las OTUs sin importar su abundancia. Los comportamientos se ordenaron a través de análisis de coordenadas principales.

La clasificación taxonómica se realizó contra la base de datos Greengenes v13-8 para generar las matrices de composición desde filo hasta género. Aquellos géneros que no coincidieran con la base de datos fueron nombrados como: no asignados, pero incluyendo el nivel anterior clasificado.

Finalmente, se aplicó un filtro, de manera tal que los taxones analizados estuvieran presentes por lo menos en un 5% de las muestras.

## **Análisis estadístico**

Para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos se trabajó con el programa RStudio versión 2022.07.2+576.

Se evaluó la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos con distribución normal, se obtuvieron las medias y las desviaciones estándar, y las medianas y los rangos intercuartiles cuando no se presentaba la normalidad.

Para la comparación de los distintos índices de diversidad alfa obtenidos, se hizo uso de una prueba ANOVA, en el caso de que se siguiera la normalidad; y para los datos no paramétricos se hizo uso de una prueba de Kruskal-Wallis. Como tratamiento post hoc, se utilizó la prueba de Dunn con significancia estadística con  $p < 0.05$ .

Para la diversidad beta, se hizo uso del análisis de PERMANOVA para realizar las comparaciones correspondientes y conocer la influencia de las dietas sobre las comunidades bacterianas.

La herramienta LEFSE (Linear discriminant analysis effect size) se utilizó para comparar los dos tipos de dieta (control y alta en grasa) bajo las que estuvieron expuestas los ratones y así encontrar taxones con diferencias significativas en cuanto a su abundancia de acuerdo con la condición. Este método lleva a cabo un análisis discriminante lineal que toma en cuenta el efecto del tamaño de muestra y es utilizado para descubrir biomarcadores enfatizando la diferencia significativa y la relevancia biológica (Segata et al., 2011). A partir del análisis realizado en LEFSE, se obtuvieron las puntuaciones LDA (análisis discriminante lineal) y cladogramas. Se consideró una  $p < 0.05$  dentro de la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) entre clases realizada por LEFSE y una puntuación LDA mayor a 2 como el umbral en la escala logarítmica para características discriminantes.

Para la comparación de los cuatro grupos se hizo uso de la prueba Kruskal-Wallis. Además, se aplicó la corrección por tasa de descubrimiento falso (FDR) para así descartar el número esperado de falsos positivos considerando una  $p < 0.05$ , y para conocer entre qué grupos de dietas existían diferencias se realizó la prueba post hoc de Dunn considerando diferencia estadística con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

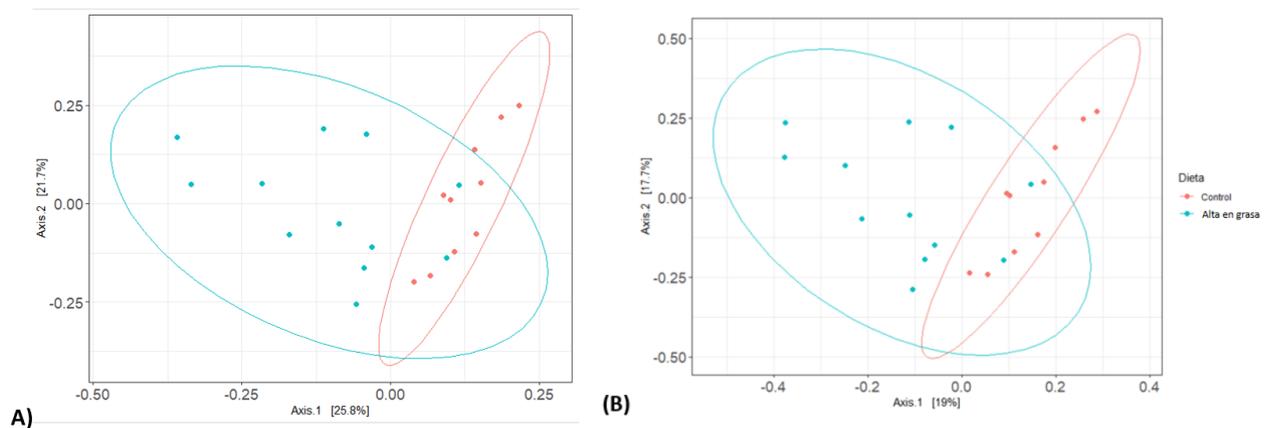
### Diferencias en diversidad alfa y beta de la microbiota de ratones alimentados con una dieta alta en grasa

Con el propósito de identificar si el tipo de dieta modificaba la diversidad de la microbiota, se realizaron comparaciones de los distintos índices de diversidad alfa entre los ratones alimentados con la dieta control y la dieta alta en grasa (**Tabla 1**). Se observó que la microbiota de los ratones alimentados con la dieta alta en grasa presentó mayor diversidad al ser evaluada por el índice de Shannon, Simpson, así como por InvSimpson. Sin embargo, para los índices de riqueza (Observadas, Chao1, ACE y Fisher) no se encontraron diferencias significativas.

**Tabla 1.** Índices de diversidad alfa de las muestras de ciego, de los dos grupos de estudio; dieta control y dieta alta en grasa.

	Control (n=10)	Alta en Grasa (n=12)	p
<b>Observadas</b>	656.4 ± 31.28	681.17 ± 50.50	0.18
<b>Chao1</b>	852.83 ± 52.90	864.29 ± 100.86	0.74
<b>ACE</b>	847.98 ± 45.40	873.77 ± 90.06	0.40
<b>Shannon</b>	3.80 ± 0.23	4.03 ± 0.27	<b>0.04</b>
<b>Simpson</b>	0.93 (0.03)	0.96 (0.02)	<b>0.02</b>
<b>InvSimpson</b>	15.25 ± 5.99	23.35 ± 7.58	<b>0.01</b>
<b>Fisher</b>	106.73 ± 6.08	111.60 ± 9.85	0.17

Posteriormente, para evaluar el efecto de la dieta alta en grasa sobre la composición global de la microbiota se analizó la diversidad beta a través de los índices: Bray-Curtis y Jaccard. Como se puede visualizar en la **Figura 7**, las muestras de los ratones alimentados con la dieta alta en grasa se segregan de aquellas con la dieta control pero no del todo. Para ambos índices, el análisis de PERMANOVA arrojó un valor de  $p=5 \times 10^{-5}$  lo cual indica que el tipo de dieta explica una proporción significativa de la composición global de la microbiota donde los porcentajes de variación que son explicados por la dieta son del 16% para el caso del índice de Bray-Curtis y de un 12% para el índice de Jaccard.



**Figura 7.** Diagrama de coordenadas principales conforme a los índices de diversidad beta Bray Curtis (A) y Jaccard (B) para las muestras de ciego de los grupos de estudio; dieta Control (n=10) y dieta Alta en Grasa (n=12).

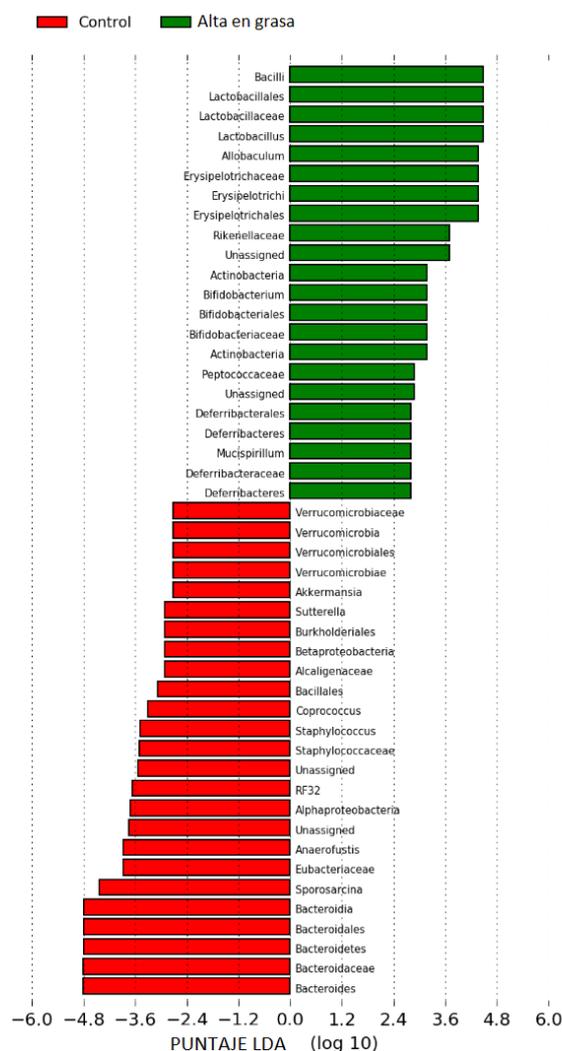
## Diferencias taxonómicas en la microbiota de ratones alimentados con dieta alta en grasa

Para identificar los taxones diferenciados debido al tipo de dieta se hizo uso de la herramienta LEFSE (**Figura 8**).

A nivel de filo, los animales que siguieron una dieta alta en grasa durante 16 semanas, mostraron una menor abundancia de *Bacteroidetes* (Mediana dieta control: 32.796% (RIQ: 15.122) vs dieta alta en grasa: 20.773% (RIQ: 6.551)) y *Verrucomicrobia* (Mediana dieta control: 0.004% (RIQ: 0.029) vs dieta alta en grasa: 0.000% (RIQ: 0.001)). En contraste la microbiota de estos animales mostró mayor abundancia de *Actinobacteria* (Mediana dieta control: 0.053% (RIQ: 0.037) vs dieta alta en grasa: 0.224% (RIQ: 0.198)) y *Deferribacteres* (Mediana dieta control: 0.002% (RIQ: 0.004) vs dieta alta en grasa: 0.060% (RIQ: 0.125)) (**Figura 11**).

A niveles más específicos, la microbiota intestinal de los animales con dieta alta en grasa presentó mayor abundancia de varias familias pertenecientes al filo *Firmicutes* de las cuales las que resultaron ser significativas fueron: *Peptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae* y *Lactobacillaceae*. De igual forma aumentaron las abundancias de *Mucispirillum* perteneciente a *Deferribacteres*, la familia *Rikenellaceae*, perteneciente al filo *Bacteroidetes* y finalmente la familia *Bifidobacteriaceae* del filo *Actinobacteria*.

Por otro lado, aquellos taxones que se vieron disminuidos posterior al consumo de una dieta alta en grasa, fueron el filo de *Bacteroidetes* y específicamente la familia *Bacteroidaceae*. Además, ciertas familias de *Firmicutes*, como *Staphylococcaceae* y *Bacillales*, algunos integrantes del filo de *Proteobacteria* como *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alcaligenaceae*, *Burkholderiales* y *Sutterella*, así como el filo *Verrucomicrobia* y su género *Akkermansia* disminuyeron en la microbiota de los ratones alimentados con dieta alta en grasa.



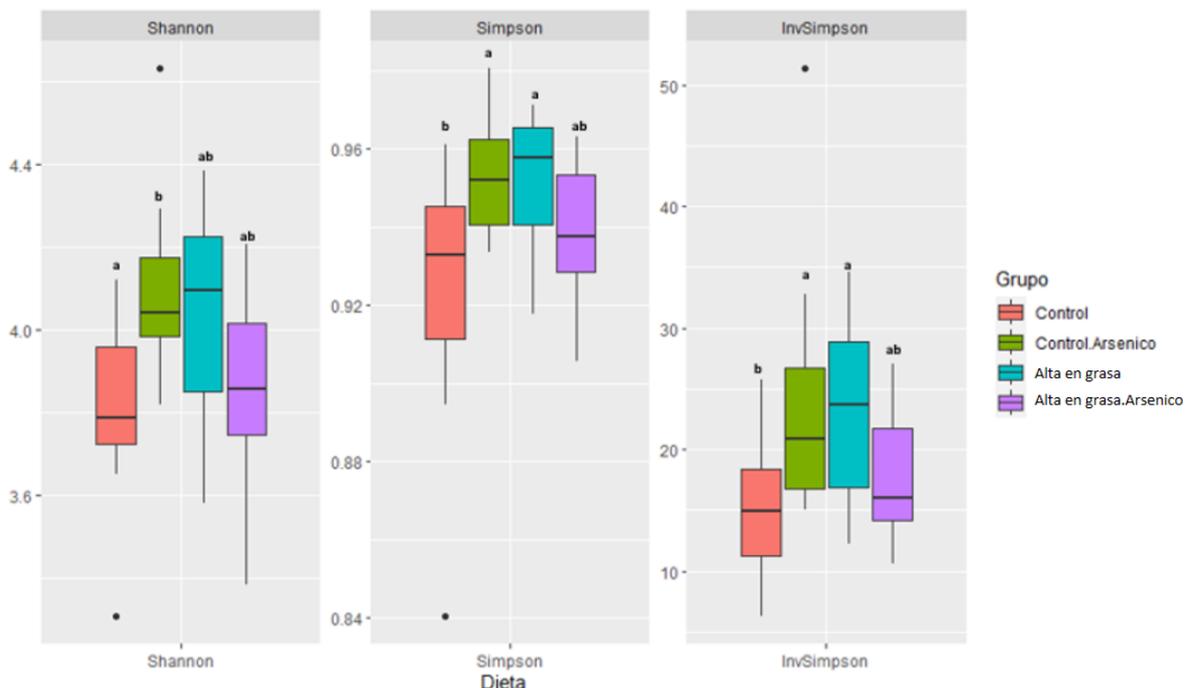
**Figura 8.** Puntuaciones LDA para las diferencias observadas en la microbiota del ciego de ratones alimentados con dieta Control (n=10) y dieta Alta en Grasa (n=12).

## Efecto de la presencia de arsénico sobre la diversidad alfa y beta de la microbiota de ratones alimentados con una dieta control (baja en grasa) y dieta alta en grasa

Conforme al segundo objetivo, se estudió si la adición del arsénico a las dietas modificaba la riqueza y diversidad presente en las muestras.

Los índices de diversidad en los que se encontró una diferencia significativa fueron: el índice de Shannon, el índice de Simpson y el índice InvSimpson. Para el caso de la dieta control, se observó que la presencia del arsénico aumentó la diversidad alfa, con un efecto similar al de solo la dieta alta en grasa que tendía a la significancia ( $p < 0.1$ , **Figura 9**).

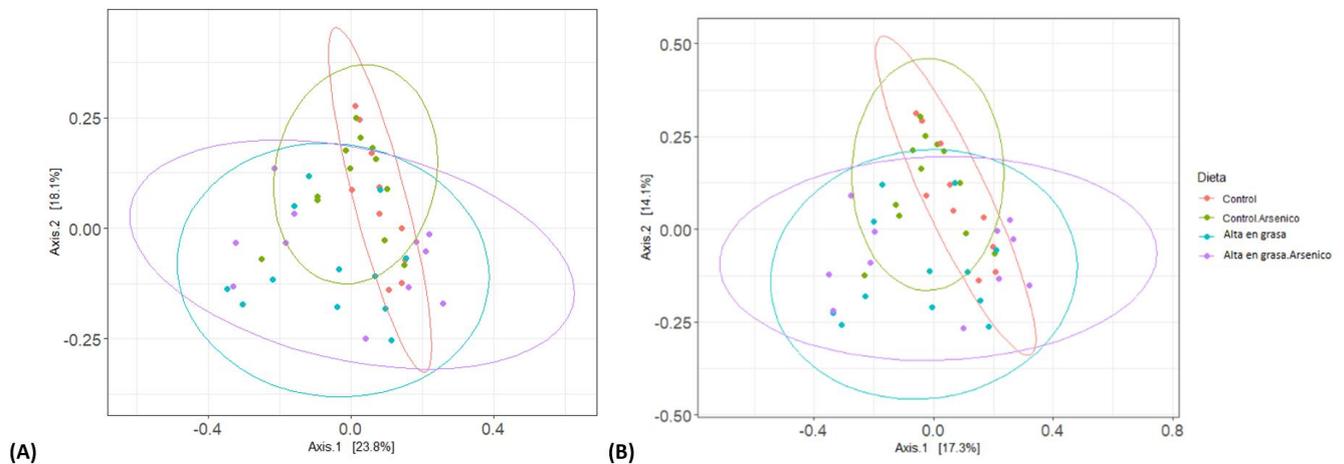
En contraste, bajo condiciones de una dieta alta en grasa, la adición de este metal pesado en el agua de bebida causó una disminución en los tres índices de diversidad bacteriana (Shannon, Simpson e InvSimpson) pero que resultó ser sólo cercana a la significancia ( $p < 0.1$ ). Para el resto de los índices de diversidad alfa (OTUs Observadas, Chao1, ACE y Fisher) no se observaron diferencias significativas (**Anexo Tabla 1**).



**Figura 9.** Gráfica de cajas y bigotes de los índices de diversidad alfa significativamente diferentes entre los grupos de estudio (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11).

Para el caso de la diversidad beta, al llevar a cabo el análisis de coordenadas principales para los índices de Bray Curtis y Jaccard (**Figura 10**), se observó que en el contexto de una dieta alta en grasa, la adición de arsénico parece no segregar las comunidades, mientras que para la dieta control (baja en grasa) la segregación es más notoria pero no es completa del todo.

A pesar de que las dietas parecen traslaparse, el análisis de PERMANOVA mostró que la presencia de arsénico en combinación con la dieta influyó en la composición global de la microbiota con un efecto del 3.6% para el índice de Bray-Curtis ( $p= 0.062$ ) y del 3.37% para el índice de Jaccard ( $p=0.056$ ), aunque los valores de  $p$  quedaron sólo cercanos a la significancia.



**Figura 10.** Diagrama de coordenadas principales conforme a los índices de diversidad beta; Bray-Curtis (A) y Jaccard (B) de las muestras de ciego de los grupos de estudio (dieta control  $n=10$ , dieta control y arsénico  $n=12$ , dieta alta en grasa  $n=12$ , dieta alta en grasa y arsénico  $n=11$ ).

## Diferencias taxonómicas entre las comunidades bacterianas de ratones expuestos a distintos tipos de dieta

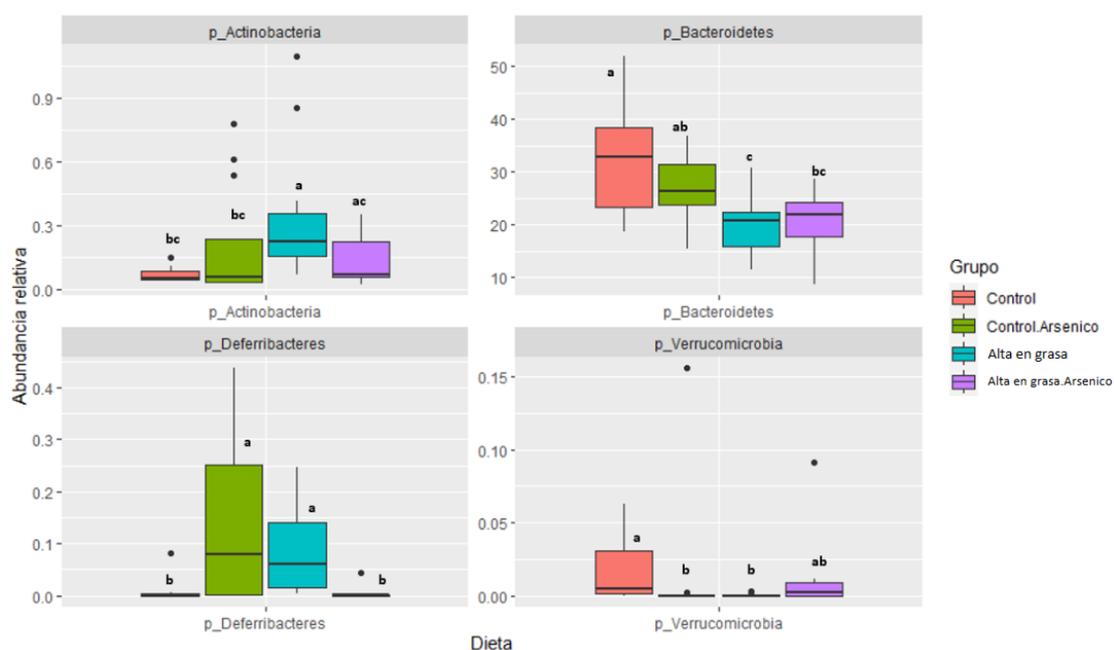
Después de conocer tanto las diferencias en los indicadores de diversidad alfa y beta entre las distintas dietas (control, control + arsénico, alta en grasa, alta en grasa + arsénico), se trabajó a distintos niveles taxonómicos (filo, familia y género) para determinar qué taxones resultaron significativamente diferentes entre las dietas.

De forma consistente con los análisis previos, la mayoría de los taxones que resultaron ser significativos para este análisis, estuvieron determinados por el tipo de dieta más que por la exposición a arsénico.

Es decir, a nivel de *phylum* de los cuatro filos diferenciados sólo dos de ellos presentaron diferencias significativas por la adición de arsénico: *Deferribacteres* y *Verrucomicrobia*. Para el caso de *Deferribacteres* se observó que la presencia de arsénico en el agua de bebida bajo la dieta control, indujo un aumento de su abundancia relativa ( $p < 0.05$ ), el cual fue similar al aumento que se presentó bajo condiciones de una dieta alta en grasa. En contraste, la exposición al metal durante un régimen de dieta alta en grasa, provocó una disminución de este filo, provocando que la abundancia fuera similar a la que se presentaba en la dieta control. El comportamiento descrito anteriormente, pareciera observarse para el filo *Actinobacteria* pero no resulta significativo.

En contraste, para *Verrucomicrobia* la adición de arsénico a una dieta control indujo una disminución en su abundancia, igualando la abundancia a aquella presentada en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa. No obstante, en presencia de una dieta alta en grasa, la exposición al arsénico parece inducir un aumento en su abundancia relativa, sin embargo, este no fue significativo.

De este primer acercamiento a través del filo, comienza a observarse que en ciertos casos la adición de arsénico a una dieta control asemeja el efecto de la exposición a una dieta alta en grasa. En contraste, la presencia del metal en conjunto con una dieta alta en grasa pareciera en algunos casos revertir este efecto, mientras que en otros no hay un cambio significativo.

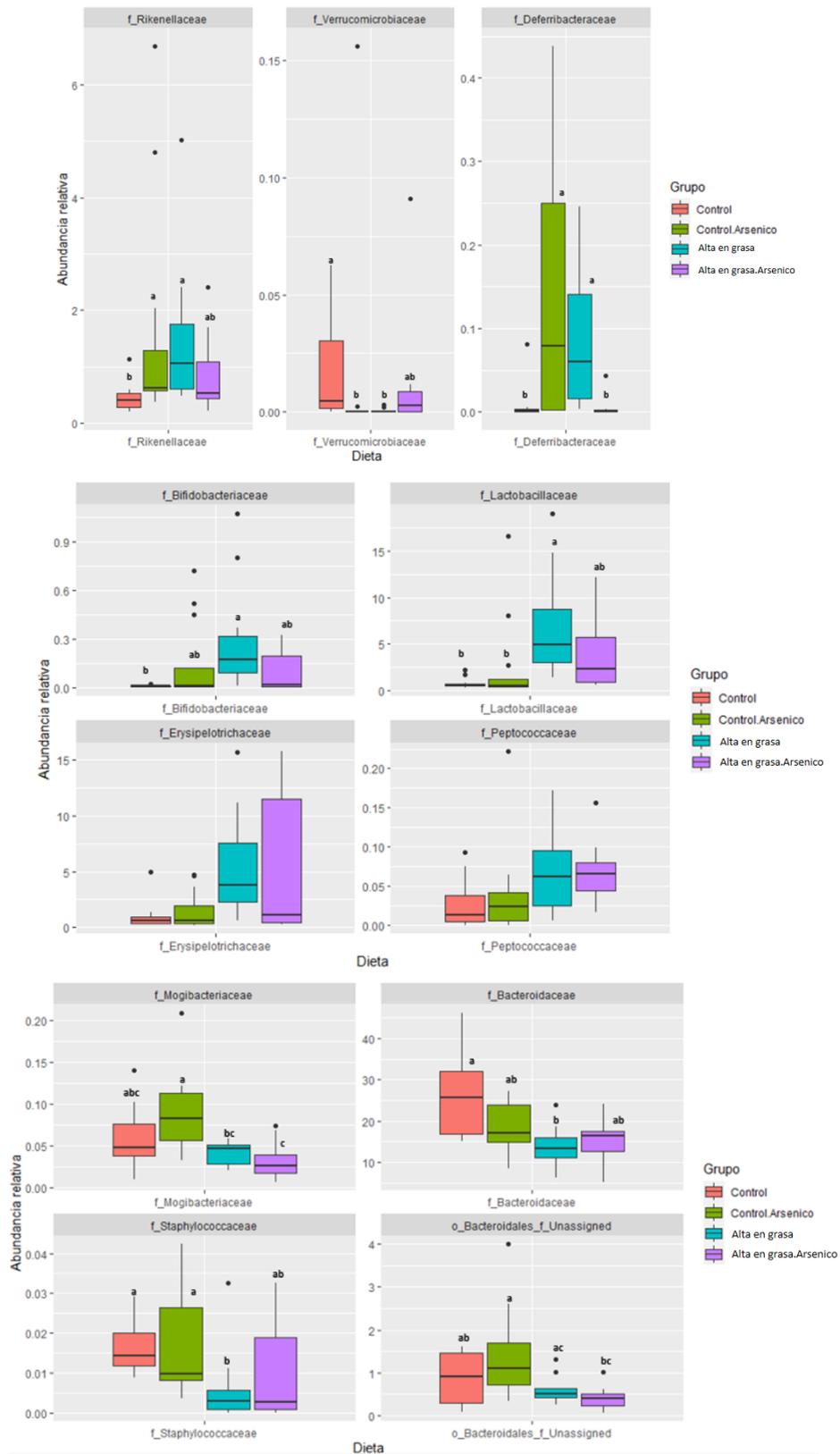


**Figura 11.** Gráfica de cajas y bigotes de abundancias relativas para filas que presentaron diferencias significativas (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11).

A nivel de familia, a pesar de que once familias resultaron ser significativamente distintas entre los cuatro grupos, sólo tres de ellas: *Rikenellaceae*, *Deferribacteriaceae* y *Verrucomicrobiaceae* presentaron diferencias significativas por la adición del arsénico. Particularmente presentaron un comportamiento donde la exposición al arsénico en una dieta control provocó un perfil similar al que se adquiere por a una dieta alta en grasa (**Figura 12**).

De manera similar se observó este comportamiento para el caso de *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Erysipelotrichaceae* y *Peptococcaceae* pero el aumento en la abundancia es ligero y resultó ser no significativo (**Figura 12**).

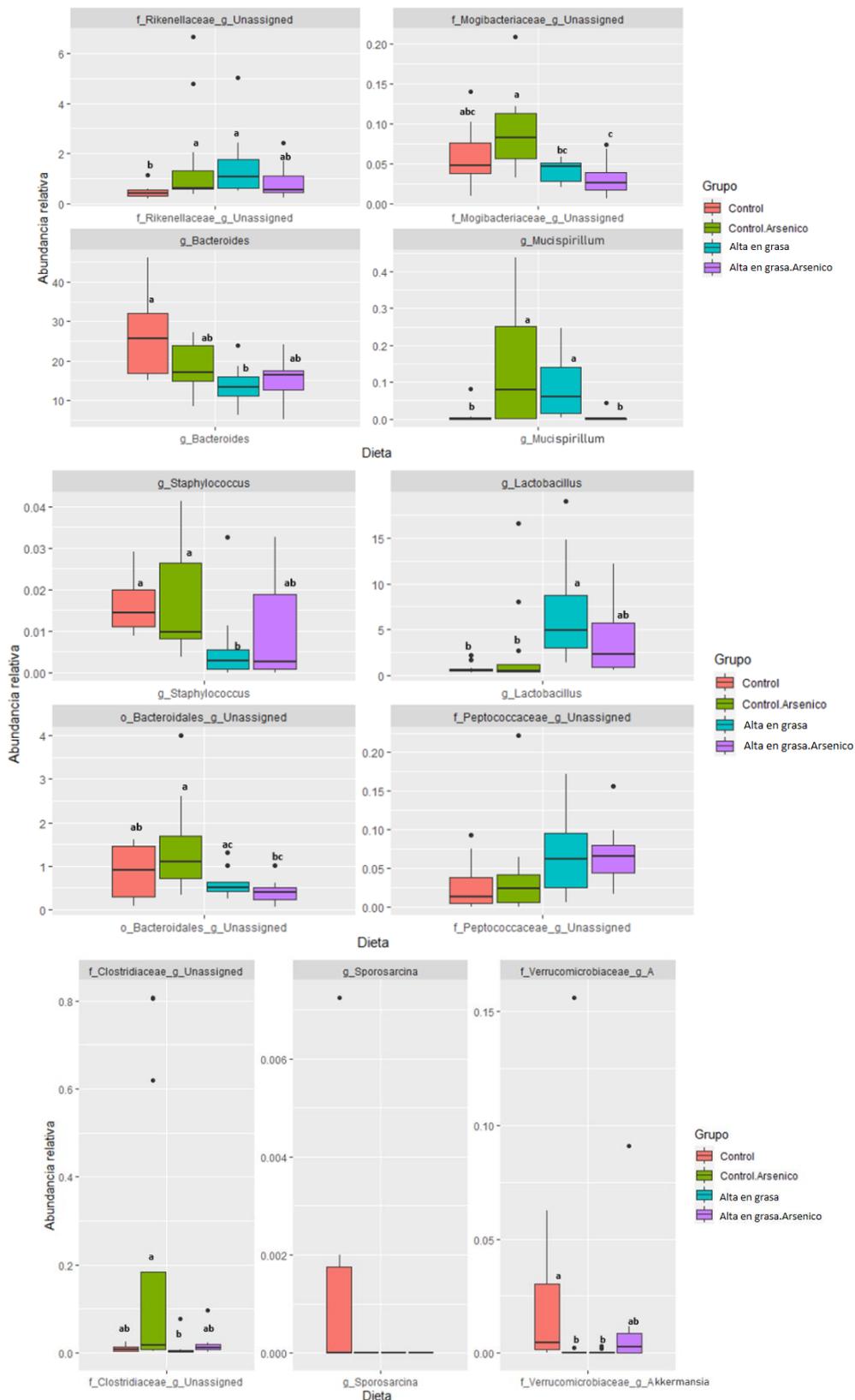
Cuando se observan las familias desde el punto de vista de la dieta alta en grasa, pareciera que la adición del arsénico a esta dieta revierte el aumento en la abundancia que se había presentado, pero este comportamiento no alcanza significancia para la mayoría de las familias, con excepción de *Deferribacteraceae*, donde esta disminución sí es significativa e iguala a la que se tenía bajo condiciones de una dieta control (**Figura 12**).



**Figura 12.** Gráfica de cajas y bigotes de las abundancias relativas para familias diferenciadas (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11).

A nivel de género, se muestra que para *Bacteroides*, *Mucispirillum*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Akkermansia* y los géneros no asignados de la familia *Peptococcaceae*, de la familia *Rikenellaceae*, del orden *Bacteroidales* y la familia *Mogibacteriaceae*, los comportamientos resaltados con anterioridad persisten (**Figura 13**). Sin embargo, las diferencias por la adición de arsénico sólo fueron significativas para géneros de baja abundancia como *Mucispirillum*, *Akkermansia* y la familia no asignada de *Rikenellaceae*.

Además, aparecen dos géneros no descritos anteriormente los cuales son *Sporosarcina* y un género no asignado de la familia *Clostridiaceae* (**Figura 13**). Para *Sporosarcina*, las abundancias son muy pequeñas y aunque no alcanzaron significancia se visualiza una disminución tanto con la dieta alta en grasa como al incluir arsénico en ambas dietas. Para el género no asignado de la familia *Clostridiaceae* se indujo un aumento no significativo con la adición de arsénico en la dieta control, mientras que en comparación con los otros grupos no se observó un efecto claro.



**Figura 13.** Gráfica de cajas y bigotes de las abundancias relativas para géneros diferenciados (dieta control n=10, dieta control y arsénico n=12, dieta alta en grasa n=12, dieta alta en grasa y arsénico n=11).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio tras caracterizar la microbiota intestinal, se encontró mayor diversidad en las comunidades de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, además se observó que el tipo de dieta influye de manera significativa sobre la composición global de la microbiota. Al analizar los efectos del arsénico en conjunto con el tipo de dieta, se identificó que al agregar el metal pesado a una dieta control el perfil resultante se asemeja al que se adquiere debido a una dieta alta en grasa. En contra parte, en el contexto de una dieta alta en grasa, la adición de arsénico en el agua de bebida parece revertir en algunos casos los cambios en la abundancia relativa inducidos por este tipo de dieta.

Anteriormente, se ha reportado que una dieta alta en grasa reduce la diversidad de la microbiota intestinal y esto a su vez se relaciona con el desarrollo de distintas enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad. No obstante, en este estudio se visualizó un aumento en los indicadores de diversidad alfa de la microbiota intestinal de los ratones que estuvieron alimentados bajo una dieta alta en grasa (39.9% grasa). A pesar de que la literatura menciona que los ácidos grasos saturados suelen provocar una disminución en la diversidad de las comunidades bacterianas, el comportamiento percibido en este estudio pudo deberse principalmente a otros componentes presentes en las dietas (**Anexo Tabla 2**). Específicamente, otros autores han encontrado que las diferencias en el consumo de nutrientes o incluso el tipo de ingredientes son capaces de alterar el comportamiento (B. Wang et al., 2020).

De acuerdo con B. Wang y colaboradores (2020), si el consumo de fibra en ratones alimentados con una dieta alta en grasa es significativo, se puede llegar a visualizar un aumento en la diversidad alfa. En el presente estudio, ambas dietas estaban formuladas con cantidades similares de fibra. Además, se utilizaron como fuente de fibra ingredientes como celulosa e inulina las cuales, al ser carbohidratos no digeribles, pueden ser utilizados por la microbiota intestinal y con ello pueden incrementar la diversidad y riqueza de una comunidad (B. Wang et al., 2020). Inclusive, algunos autores, sugieren que las alteraciones que pueden darse en la composición de la microbiota intestinal de ratones alimentados con dietas altas en

grasa, son mayormente impulsadas por la falta de fibra soluble en las típicas dietas refinadas, que por la proporción de grasa (Morrison et al., 2020).

En este sentido, en ratas Wistar alimentadas con dietas altas en grasa pero a su vez incluyendo cebada o malta de cebada, se observó una mayor diversidad alfa en comparación con un grupo control. Los autores de este estudio mencionan que prebióticos de bajo peso molecular como la inulina (la cual es parte de las dietas utilizadas en el estudio) contribuyen al efecto sobre la microbiota intestinal (Zhong et al., 2015).

De forma interesante, con la exposición al arsénico en una dieta control, se observó un aumento significativo en la diversidad alfa de las comunidades, el cual asemeja al perfil que se adquiere bajo una dieta alta en grasa. Este resultado coincide con lo reportado por J. Wang y colaboradores (2020) quienes notaron un incremento en la diversidad de la microbiota de ratones después de 60 días de exposición al arsénico, en una dosis de 30 ppm. Sin embargo, al parecer este comportamiento depende del tiempo de exposición y de la dosis utilizada, ya que hay estudios como el de Chi y colaboradores (2017) donde se observó que, tras 13 semanas de exposición al arsénico con una concentración de 100 ppb, la diversidad alfa fue menor en comparación con el control.

En contraste, el comportamiento de la diversidad alfa de las comunidades expuestas a una dieta alta en grasa, en conjunto con la exposición al metal pesado mostró una disminución que no resultó ser significativa. Esta aparente disminución ya ha sido vista por otros investigadores; Liu y otros (2020) indicaron que la microbiota intestinal de ratones alimentados con una dieta alta en grasa (45%) sufre más perturbaciones bajo una exposición al arsénico que la de ratones tratados con una dieta control. En este caso, puede ser posible que la disminución apenas percibida no haya resultado significativa debido al tiempo de exposición, ya que en el estudio de Liu y colaboradores (2020) los ratones se mantuvieron expuestos a las condiciones de estudio durante 10 semanas, mientras que en el presente estudio sólo fueron 8.

En conjunto, estos cambios en las comunidades reflejan que tanto la dosis como el tiempo de exposición son factores importantes. Es posible que a bajas

concentraciones o periodos cortos de exposición la magnitud del efecto no sea suficiente para identificar diferencias significativas en la abundancia y riqueza de la microbiota intestinal.

A nivel taxonómico, diversos estudios han encontrado un incremento de *Firmicutes* sobre *Bacteroidetes* debido al consumo de dietas altas en grasa. El comportamiento observado en este proyecto coincide con estudios previos (Murphy et al., 2015). Además, en un estudio realizado por Turnbaugh y colaboradores (2009) con ratones colonizados con una comunidad microbiana de un humano saludable y expuestos a una dieta Occidental, se observó un incremento en la abundancia relativa de *Erysipelotrichi* y *Bacilli*, mientras que el filo de *Bacteroidetes* presentó una disminución significativa. De forma similar, en el presente estudio, las familias que se vieron enriquecidas con la dieta alta en grasa fueron *Erysipelotrichaceae*, *Peptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Deferribacteraceae*, además de *Rikenellaceae* y *Bifidobacteriaceae*. Llama la atención que algunas de estas familias han sido relacionadas con enfermedades, así como con la inflamación del tracto gastrointestinal (Kaakoush, 2015; Villaseñor-Aranguren et al., 2022; Walker et al., 2014; Daniel et al., 2014).

*Erysipelotrichaceae* ha sido asociada al fenotipo de obesidad y se ha encontrado enriquecida en ratones alimentados con dietas occidentales (Kaakoush, 2015). Por otro lado, varios miembros de la familia *Peptococcaceae* se encontraron más prevalentes en niños chinos con diagnóstico de obesidad (Villaseñor-Aranguren et al., 2022). De manera similar, *Deferribacteres* y en específico el género *Mucispirillum*, son taxones que, en modelos animales, se han visto enriquecidos en obesidad inducida por dieta alta en grasa, incluso se ha reportado que la especie *Mucispirillum schaedleri*, bajo estas condiciones es capaz de colonizar la capa de moco del íleon, colon y tejido hepático por lo cual es capaz de moverse del tracto gastrointestinal hasta el sistema hepatobiliar (Walker et al., 2014). Asimismo, la presencia de ciertos miembros de la familia *Rikenellaceae* como *Alistipes* han llegado a ser correlacionados con la presencia de diabetes tipo 2 en humanos (Daniel et al., 2014).

Llama la atención el enriquecimiento de la familia *Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae* tras una alimentación con dieta alta en grasa, ya que en ambas

familias muchos de sus miembros han sido considerados como probióticos como es el caso de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium*. Además, para el caso de *Lactobacillus*, se ha estudiado ampliamente cómo la administración de ciertas especies puede atenuar el incremento de peso debido a una dieta alta en grasa y también modular la composición de la microbiota intestinal (Nagano & Yano, 2020). Por su parte *Bifidobacterium*, se ha relacionado positivamente con mejoras en la tolerancia a glucosa, con la secreción de insulina inducida por glucosa y un mejor tono inflamatorio (Murphy et al., 2015). Sin embargo, así como se ha estudiado el papel benéfico de miembros de ambas familias, otros autores han notado el incremento de ciertas especies de *Lactobacillus* debido a una alimentación alta en grasa (Xiao et al., 2017). Además, debido a que dentro de esta familia hay distintos taxones involucrados en la biotransformación de ácidos biliares secundarios, se ha llegado a observar que una dieta alta en grasa no sólo incrementa estos ácidos biliares secundarios, sino que también promueve a las bacterias productoras de los mismos (Zeng et al., 2020). Por otro lado, en un estudio en humanos se encontró que *Bifidobacterium longum* mostró una correlación positiva con la grasa visceral (Yan et al., 2022). Por lo anterior sería interesante analizar si, en el presente estudio, la abundancia de estas familias en efecto se asocia con el fenotipo metabólico.

Es importante mencionar que en el presente proyecto, a través de la secuenciación del gen 16S, no se logró obtener la resolución hasta nivel de especie. Por ello, es posible que los resultados contrastantes puedan deberse a diferencias en las especies que representan a cada familia y que se han identificado para ciertas patologías.

En contraparte, aquellas familias cuya abundancia fue menor en presencia de una dieta alta en grasa pertenecen principalmente al filo de *Bacteroidetes*, lo cual coincide con lo reportado por la literatura para este taxon (Singh et al., 2017), así como para el filo *Verrucomicrobia* (Araújo et al., 2017). No obstante, resalta la disminución de miembros del filo *Proteobacteria*, además de la disminución de algunos taxones pertenecientes a *Firmicutes* como *Bacillales*.

Para el caso de *Verrucomicrobia* y *Bacillales*, estos han sido estudiados con anterioridad por sus efectos benéficos. Específicamente el género *Akkermansia* es

una de las bacterias más frecuentemente descritas en la literatura como parte de aquellas que tienen propiedades antiinflamatorias y que, además, puede mejorar la integridad de la barrera intestinal al promover la producción de moco de las células caliciformes (Malesza et al., 2021). De manera parecida, algunos *Bacillales* son considerados probióticos ya que pueden atenuar la ganancia de peso, al igual que la intolerancia a la glucosa en ratones con obesidad (Xu et al., 2020). Por ello, su reducción con una dieta alta en grasa podría indicar que la integridad de la barrera intestinal podría verse afectada al igual que el estado de salud del hospedador, no obstante, se necesitan de más análisis para corroborarlo.

Como parte del segundo objetivo, tras caracterizar las comunidades de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa y con la dieta control, se buscó conocer el efecto de la adición del arsénico a las dietas.

Como primer comportamiento, se visualizó un aumento de la abundancia relativa de ciertos taxones, cuando se adicionaba el metal pesado a una dieta control, que asemejaba al perfil que genera la alimentación con dieta alta en grasa. Como sugieren Coryell y colaboradores (2019), esta perturbación de la taxonomía microbiana podría estar relacionada también con su función.

A nivel de filo, *Deferribacteres* presentó un aumento significativo y de acuerdo con lo que Gokulan y colaboradores (2018) reportaron, hay distintos miembros de este filo que son conocidos por contar con genes de resistencia ante el arsénico. De hecho, en su estudio también observaron un incremento de la abundancia, por lo que especulan que podría considerarse como un mecanismo adoptado por las comunidades de los animales expuestos al arsenito para poder sobrevivir a los efectos tóxicos. En nuestro caso, se vio este comportamiento de forma particular para la familia *Deferribacteraceae* y el género *Mucispirillum* dentro del cual se ha identificado a *Mucispirillum schaedleri* como un taxón involucrado en la detoxificación ante la exposición al arsénico (H. Duan et al., 2020).

De acuerdo con Hao y colaboradores (2021), lo que se ha visto a nivel ambiental, es que uno de los determinantes que mantiene la homeostasis ante metales pesados es la reducción de éstos. Para el caso de *Deferribacteraceae* se ha reportado que

distintos miembros son capaces de conservar la energía de la reducción del  $As^V$  a  $As^{III}$  (Mumford et al., 2013), ya que cuentan con el gen *arrA* que codifica para una reductasa (Malasarn et al., 2004). Además, para *Mucispirillum schaedleri*, se han encontrado diversos genes para lidiar con el estrés oxidativo que generan los metales pesados (Loy et al., 2017).

En este caso, el aumento de este género puede deberse tanto a su resistencia al arsénico, como a los mecanismos con los que cuenta para soportar las condiciones que genera el metal pesado dentro del organismo. Sería de interés conocer si esto se trata de una respuesta protectora por parte de la comunidad o si se está presentando una respuesta competitiva por parte de este miembro que esté siendo perjudicial tanto para la comunidad como para el hospedador, ya que, a nivel ambiental, se ha reportado con anterioridad que la contaminación por metales pesados puede alterar las interacciones entre distintos miembros (Hao et al., 2021).

Dentro de la familia *Rikenellaceae* se observó un aumento significativo para un género no identificado. *Alistipes*, otro miembro de esta familia es reconocida como una bacteria ubicua que tiene un potencial antitumoral y muestra protección ante la colitis (J. Wang et al., 2020). Además, en un estudio *in vitro* usando el simulador del ecosistema humano intestinal microbiano (SHIME por sus siglas en inglés), se demostró que es resistente a ciertas especies del arsénico, además de que tiene una relación positiva con los niveles de metilación del arsénico (J. Wang et al., 2020). Aunque en nuestro estudio, no se observaron diferencias en la abundancia de *Alistipes*, sería interesante revisar si el aumento en la abundancia del género no identificado de *Rikenellaceae*, en nuestro estudio, responde a una respuesta adaptativa que pudiera tener efectos benéficos.

Llama la atención que el incremento similar a lo observado con una dieta alta en grasa también se vio reflejado parcialmente para las familias: *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae* y *Erysipelotrichaceae* pero no resultó ser significativo. Dentro de la familia *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus* ha sido reconocido por varios autores como un taxón con habilidades para transformar el arsénico (X. Liu et al., 2020; T. Liu et al., 2020). Este género además de actuar como probiótico promoviendo una comunidad estable, también ha sido identificado como un taxón que es característico después de

la recuperación a la exposición a arsénico. De acuerdo con Du y sus colaboradores (2021), en estudios *in vitro* se ha observado que puede revertir parcialmente el estrés oxidativo, la respuesta ante citoquinas proinflamatorias y el aumento de la permeabilidad de las células causada por arsénico inorgánico. Asimismo, X. Liu y colaboradores (2022) demostraron que puede absorber y acumular el arsenito, aunque no necesariamente se visualice un aumento significativo de su abundancia frente a la exposición. En ratones, inclusive se ha correlacionado positivamente la abundancia de *Lactobacillus* con la excreción de arsénico en heces (T. Liu et al., 2020). Más concretamente, H. Duan y colegas (2020) identificaron a *Lactobacillus johnsonii* como un miembro involucrado en la detoxificación debido a la exposición al arsénico.

*Bifidobacterium*, también ha sido reconocido como un taxón que puede ayudar ante la toxicidad del arsénico debido a que es el principal género productor de vitaminas. Algunos autores han mencionado que tras una exposición al arsénico hay un incremento en los genes de biosíntesis de vitaminas lo cual se ha llegado a considerar como un mecanismo de protección de la microbiota intestinal ante la toxicidad inducida, debido al efecto protector que pueden presentar estas vitaminas ante el estrés oxidativo causado por el arsénico (H. Duan et al., 2020). Por ello, y aunque no se identificaron cambios significativos para algún género de *Bifidobacteriaceae*, sería de interés evaluar en nuestro estudio si esta familia pudiera tener un papel protector contra los efectos tóxicos del arsénico.

En conjunto, de acuerdo con las habilidades de ciertas familias descritas con anterioridad, el perfil observado en las comunidades bacterianas de los ratones alimentados bajo una dieta control pero que fueron expuestos al arsénico, pudiera representar un mecanismo de defensa para proteger y/o reaccionar ante la toxicidad del arsénico. Sin embargo, su influencia sobre la fisiología del hospedero aún requiere más estudios.

Llama la atención que, de manera inversa, se visualizó una disminución significativa de ciertos miembros que asemeja también al perfil que se tiene dentro de una dieta alta en grasa como lo es el caso de la familia *Verrucomicrobiaceae* y su género *Akkermansia*. Lo reportado por la literatura resulta contrastante ya que algunos

autores han observado que *Verrucomicrobia* aumenta ante una exposición al arsénico (Wu et al., 2022; Chi et al., 2017; Chiocchetti et al., 2019). No obstante, su comportamiento puede llegar a fluctuar dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición. T. Liu y colegas (2020), mencionan que la disminución del género *Akkermansia* se ha visualizado en varias enfermedades como la obesidad y la enfermedad de colon irritable. De esta manera, la disminución en la abundancia observada por la exposición al arsénico, también podría estar relacionada con el desarrollo de las enfermedades resultantes de la exposición a este metal.

Como se presentó anteriormente, esta bacteria contribuye al mantenimiento de la capa de mucosa en el intestino y puede proveer protección a la barrera intestinal, reduciendo su permeabilidad (H. Duan et al., 2020). Por ello, su decremento podría significar alteraciones en la integridad de la barrera intestinal, vulnerando al intestino ante los efectos tóxicos del arsénico. De hecho, en estudios anteriores se ha observado que el arsénico afecta la permeabilidad del intestino en dosis a partir de 50 ppm (Chiocchetti et al., 2019). Dado que en el presente estudio se utilizó una dosis de 100 ppb con el fin de que representara una concentración similar a la que está expuesta el ser humano, sería interesante estudiar si la disminución observada de *Akkermansia* está relacionada con daños a la barrera intestinal.

Finalmente, como tercer comportamiento se encontró que, al añadir el metal pesado en el agua de bebida a ratones que habían sido alimentados con dieta alta en grasa, no se indujo un efecto significativo sobre la mayoría de las abundancias de los taxones.

Esto es contrario a lo que se esperaba en un principio, además de que no es congruente con el estudio de T. Liu y colaboradores (2020) donde se observó que, después de una exposición a metales pesados como arsénico, cadmio y plomo, la microbiota intestinal de ratones alimentados con dieta alta en grasa cambiaba más que la de aquellos que siguieron una dieta control, lo cual se proponía como un indicador de que la microbiota de ratones alimentados con dieta alta en grasa sufría mayores perturbaciones ante la exposición de los metales pesados. Sin embargo es importante considerar que, en este estudio el diseño experimental fue distinto ya que

los animales fueron expuestos a la dieta alta en grasa 8 semanas antes de que se añadiera la exposición al arsénico.

Cabe resaltar que para la familia *Deferribacteraceae* se encontró que la exposición al arsénico parecía revertir el aumento significativo que se había presentado debido a la dieta alta en grasa. Esto resulta sumamente interesante ya que, como se ha tratado anteriormente, dentro de esta familia hay distintos miembros que cuentan con genes de resistencia hacia el arsénico, por lo que su disminución podría vulnerar la barrera intestinal ante este metal.

Debido a esto, se puede tener como primera suposición que el perfil que tomó la comunidad bacteriana de los ratones alimentados bajo una dieta control al estar expuesta al arsenito de sodio pudiera tratarse de una respuesta adaptativa por parte de la comunidad, y aunque esta respuesta asemeje a lo que se visualizó para aquellos animales que consumieron la dieta alta en grasa, sería interesante investigar si la funcionalidad de éstos es la misma bajo distintas dietas (dieta control vs dieta alta en grasa) (Zinöcker & Lindseth, 2018).

Para otro tipo de metales pesados, se han encontrado comportamientos similares con respecto al aumento de familias como *Rikenellaceae* debido a exposición al plomo, de *Erysipelotrichaceae* tanto para presencia de plomo como de cadmio y de *Bifidobacteriaceae* en presencia de cadmio. Mientras que *Verrucomicrobia*, de forma similar a lo que se percibió en el presente estudio, se ha visto disminuida también por exposición a cadmio y plomo (H. Duan et al., 2020). Por lo anterior, es posible que esto sea parte de una respuesta de las comunidades bacterianas, en donde aumentan aquellos miembros que son más resistentes y/o que pueden transformar el metal, mientras que se da una disminución de aquellos que son sensibles. Esta observación ha sido reportada anteriormente para estudios de exposición continua o repetida al arsenito, pero sin la presencia de una dieta alta en grasa (Gokulan et al., 2023).

Es importante mencionar que tanto la dieta alta en grasa como la exposición al metal pesado podrían estar condicionando comunidades muy similares debido al efecto que tienen sobre la fisiología y funcionalidad de la barrera intestinal (H. Duan et al., 2020).

Con anterioridad se ha investigado si los cambios sobre la composición de la microbiota intestinal que se producen por una dieta alta en grasa pueden acompañarse de cambios en los péptidos antimicrobianos producidos por las células de Paneth (Guo et al., 2017). En específico, en el estudio realizado por Guo y colaboradores en 2017, los autores encontraron que la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 son potenciadas significativamente en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Estas citoquinas proinflamatorias se suelen ver incrementadas tanto en animales como en humanos con un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado (Coppack, 2001). De forma interesante, Calatayud y colaboradores en 2014, reportaron que, en modelos murinos, las formas trivalentes del arsénico como As<sup>III</sup>, MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>, junto con el tiempo de exposición, aumentan de manera importante la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6. Estos mismos autores resaltan que, humanos expuestos de manera crónica al arsénico inorgánico, presentan una sobre expresión de TNF- $\alpha$  y IL-6 en muestras de linfocitos y plasma.

En conjunto, tanto el arsénico como la dieta alta en grasa saturada pueden provocar respuestas proinflamatorias similares en la barrera intestinal. Es posible que esto condicione a que la comunidad bacteriana de aquellos ratones alimentados con dieta control, pero expuestos a arsénico haya adquirido un perfil similar al que se visualizó para los ratones alimentados con dieta alta en grasa. Sin embargo, debido a que la exposición a estos dos componentes ha sido poco estudiada y podrían estarse llevando a cabo muchas interacciones, es necesario indagar más acerca de los efectos que se observan sobre la fisiología del hospedero.

## **CONCLUSIONES**

La comunidad bacteriana de ratones alimentados con una dieta alta en grasa mostró una mayor diversidad la cual pudo deberse principalmente a la composición de las dietas utilizadas, ya que tanto la dieta control como la dieta alta en grasa contaron con cantidades similares de fibra, además de que se incluyeron componentes como la inulina que son capaces de modular la respuesta de la microbiota intestinal como *Bifidobacterium*.

La adición del arsénico a la dieta control indujo un perfil de microbiota intestinal similar al que provocó la dieta alta en grasa promoviendo familias como *Rikenellaceae* y *Deferribacteraceae*. Esto puede representar una respuesta adaptativa de la comunidad, ya que algunos miembros de estas familias cuentan con genes de resistencia o genes que les permiten biotransformar al arsénico a formas menos tóxicas. Además, la disminución de la familia *Verrucomicrobiaceae*, similar al efecto de una dieta alta en grasa, podría estar relacionada con una vulneración de la integridad de la barrera intestinal debido a la presencia del arsénico.

Finalmente, al analizar la adición de arsénico a la dieta alta en grasa, se refutó la hipótesis planteada, ya que las diferencias observadas no sugieren una exacerbación de los efectos de una dieta alta en grasa sobre la microbiota intestinal.

## **PERSPECTIVAS**

Sería relevante evaluar la excreción del arsénico en heces; es decir, si se presentan las mismas formas de arsénico en las excreciones de los ratones alimentados con distintas dietas, y sobre todo conocer qué nivel de acumulación del metal pesado presentaron en sus tejidos. Esto con el objetivo de entender si las comunidades bacterianas presentadas tuvieron un efecto protector para el hospedero al metabolizar el arsénico a formas menos tóxicas o si solamente se acumuló dentro del cuerpo de los ratones.

De igual modo, sería enriquecedor llevar a cabo estudios para explorar la fisiología de la barrera intestinal y conocer si tanto la grasa como el arsénico alteraron la fisiología de la barrera lo cual podría tener un efecto en la proliferación de ciertos taxones.

## REFERENCIAS

1. Alcalá, B. (2021). *Laguneros siguen bebiendo agua con arsénico*. [En línea]. Disponible en: <https://www.milenio.com/ciencia-y-salud/arsenico-en-el-agua-como-detectar-contaminacion-en-la-laguna> [Último acceso el 10 de septiembre del 2022].
2. An, J., Wang, Q., Yi, S., Liu, X., Jin, H., Xu, J., Wen, G., Zhu, J., & Tuo, B. (2022). The source of the fat significantly affects the results of high-fat diet intervention. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08249-2>
3. Anders, J. L., Moustafa, M. A. M., Mohamed, W. M. A., Hayakawa, T., Nakao, R., & Koizumi, I. (2021). Comparing the gut microbiome along the gastrointestinal tract of three sympatric species of wild rodents. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99379-6>
4. Araújo, J. R., Tomas, J., Brenner, C., & Sansonetti, P. J. (2017). Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie* (Vol. 141, pp. 97–106). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.019>
5. Arnold, M. G., Gokulan, K., Doerge, D. R., Vanlandingham, M., Cerniglia, C. E., & Khare, S. (2019). A single or short time repeated arsenic oral exposure in mice impacts mRNA expression for signaling and immunity related genes in the gut. *Food and Chemical Toxicology*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110597>
6. Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>
7. Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 485–501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
8. Calatayud, M., Gimeno-Alcañiz, J. V., Vélez, D., & Devesa, V. (2014). Trivalent arsenic species induce changes in expression and levels of proinflammatory

- cytokines in intestinal epithelial cells. *Toxicology Letters*, 224(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.09.016>
9. Calderón-DuPont, D., Romero-Córdoba, S. L., Tello, J. K., Espinosa, A., Guerrero, B., Contreras, A. v., Morán-Ramos, S., & Díaz-Villaseñor, A. (2023). Impaired white adipose tissue fatty acid metabolism in mice fed a high-fat diet worsened by arsenic exposure, primarily affecting retroperitoneal adipose tissue. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 468. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116428>
  10. Cena, H., & Calder, P. C. (2020). Defining a healthy diet: Evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. *Nutrients* (Vol. 12, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12020334>
  11. Charles River. (2023). *C57BL/6 Mice*. [En línea]. Disponible en: [C57BL/6 Mice | Charles River \(criver.com\)](https://www.criver.com) [Último acceso el 24 de octubre del 2023].
  12. Chi, L., Bian, X., Gao, B., Tu, P., Ru, H., & Lu, K. (2017). The effects of an environmentally relevant level of arsenic on the gut microbiome and its functional metagenome. *Toxicological Sciences*, 160(2), 193–204. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx174>
  13. Chi, L., Xue, J., Tu, P., Lai, Y., Ru, H., & Lu, K. (2019). Gut microbiome disruption altered the biotransformation and liver toxicity of arsenic in mice. *Archives of Toxicology*, 93(1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2332-7>
  14. Chiocchetti, G. M., Domene, A., Kühl, A. A., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., & Monedero, V. (2019). In vivo evaluation of the effect of arsenite on the intestinal epithelium and associated microbiota in mice. *Archives of Toxicology*, 93(8), 2127–2139. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02510-w>
  15. Coppack, S. W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 349–356. <https://doi.org/10.1079/pns2001110>
  16. Coryell, M., McAlpine, M., Pinkham, N. V., McDermott, T. R., & Walk, S. T. (2018). The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07803-9>
  17. Coryell, M., Roggenbeck, B. A., & Walk, S. T. (2019). The Human Gut Microbiome's Influence on Arsenic Toxicity. *Current Pharmacology Reports*

- (Vol. 5, Issue 6, pp. 491–504). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00206-4>
18. Covarrubias, S. A., & Peña Cabriales, J. J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7–21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
  19. Daniel, H., Gholami, A. M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., Böhm, C., Wenning, M., Wagner, M., Blaut, M., Schmitt-Kopplin, P., Kuster, B., Haller, D., & Clavel, T. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME Journal*, 8(2), 295–308. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.155>
  20. DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(5), 1137–1150. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>
  21. Del Razo, F. M. (2020). *Definición de una dieta saludable*. [En línea]. Disponible en: <https://alimentacionysalud.unam.mx/definicion-de-una-dieta-saludable/#:~:text=Una%20dieta%20saludable%20al%20igual,en%20los%20cuales%20se%20utiliza> [Último acceso el 10 de septiembre del 2022].
  22. Desjardins, P. Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. [En línea]. Disponible en: <https://www.jove.com/es/t/2565/nanodrop-microvolume-quantitation-of-nucleic-acids> [Último acceso el 2 de noviembre del 2023].
  23. Díaz-Villaseñor, A., Burns, A. L., Salazar, A. M., Sordo, M., Hiriart, M., Cebrián, M. E., & Ostrosky-Wegman, P. (2008). Arsenite reduces insulin secretion in rat pancreatic  $\beta$ -cells by decreasing the calcium-dependent calpain-10 proteolysis of SNAP-25. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(3), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.018>
  24. Duan, H., Yu, L., Tian, F., Zhai, Q., Fan, L., & Chen, W. (2020). Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *Science of the Total Environment* (Vol. 742). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140429>

25. Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., & Xu, K. (2018). Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02649>
26. FAO. (2021). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. The world is at a critical juncture*. [En línea]. Disponible en: <https://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/2021/en/> [Último acceso el 29 de marzo del 2023].
27. Ghaedrahmat, Z., Cheraghian, B., Jaafarzadeh, N., Takdastan, A., Shahbazian, H. B., & Ahmadi, M. (2021). Relationship between urinary heavy metals with metabolic syndrome and its components in population from Hoveyzeh cohort study: A case-control study in Iran. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 66. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126757>
28. Gil, Á. (2017). *Tratado de Nutrición. Bases moleculares de la nutrición* (3rd ed., Vol. 2). Editorial Médica Panamericana.
29. Gokulan, K., Arnold, M. G., Jensen, J., Vanlandingham, M., Twaddle, N. C., Doerge, D. R., Cerniglia, C. E., Khare, S., Gokulan, C. K., Lefebvre, D., & Canada, H. (2018). Exposure to Arsenite in CD-1 Mice during Juvenile and Adult Stages: Effects on Intestinal Microbiota and Gut-Associated Immune Status. <https://doi.org/10.1128/mBio>
30. Gokulan, K., Mathur, A., Kumar, A., Vanlandingham, M. M., & Khare, S. (2023). Route of Arsenic Exposure Differentially Impacts the Expression of Genes Involved in Gut-Mucosa-Associated Immune Responses and Gastrointestinal Permeability. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076352>
31. Guo, X., Li, J., Tang, R., Zhang, G., Zeng, H., Wood, R. J., & Liu, Z. (2017). High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9474896>
32. Hao, X., Zhu, J., Rensing, C., Liu, Y., Gao, S., Chen, W., Huang, Q., & Liu, Y. R. (2021). Recent advances in exploring the heavy metal(loid) resistant microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 19, pp. 94–109). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.006>

33. Illumina. [Illumina] (2016). *Overview of Illumina Sequencing by Synthesis Workflow*. [Video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>
34. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. (2016). *La Obesidad en México*. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/issste/articulos/la-obesidad-en-mexico> [Último acceso el 10 de septiembre del 2022].
35. Johnson, A. J., Zheng, J. J., Kang, J. W., Saboe, A., Knights, D., & Zivkovic, A. M. (2020). A Guide to Diet-Microbiome Study Design. *Frontiers in Nutrition* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00079>
36. Kaakoush, N. O. (2015). Insights into the role of Erysipelotrichaceae in the human host. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 5, Issue NOV). *Frontiers Research Foundation*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
37. Khairul, I., Wang, Q. Q., Jiang, Y. H., Wang, C., & Naranmandura, H. (2017). Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 14). [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
38. Li, D., Yang, Y., Li, Y., Li, Z., Zhu, X., & Zeng, X. (2021). Changes induced by chronic exposure to high arsenic concentrations in the intestine and its microenvironment. *Toxicology*, 456. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152767>
39. Li, J., Mandal, G., & Rosen, B. P. (2016). Expression of arsenic resistance genes in the obligate anaerobe *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, a gut microbiome bacterium. *Anaerobe*, 39, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.03.012>
40. Liu, T., Liang, X., Lei, C., Huang, Q., Song, W., Fang, R., Li, C., Li, X., Mo, H., Sun, N., Lv, H., & Liu, Z. (2020a). High-Fat Diet Affects Heavy Metal Accumulation and Toxicity to Mice Liver and Kidney Probably via Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01604>
41. Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1197–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x>
42. Loy, A., Pfann, C., Steinberger, M., Hanson, B., Herp, S., Brugiroux, S., Gomes Neto, J. C., Boekschoten, M. V., Schwab, C., Urich, T., Ramer-Tait, A. E.,

- Rattei, T., Stecher, B., & Berry, D. (2017). Lifestyle and Horizontal Gene Transfer-Mediated Evolution of *Mucispirillum schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *MSystems*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00171-16>
43. Malasarn, D., Saltikov, C. W., Campbell, K. M., Santini, J. M., Hering, J. G., & Newman, D. K. (2004). *arrA* Is a Reliable Marker for As(V) Respiration. [www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5695/455/](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5695/455/)
44. Morrison, K. E., Jašarević, E., Howard, C. D., & Bale, T. L. (2020). It's the fiber, not the fat: Significant effects of dietary challenge on the gut microbiome. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-0791-6>
45. Mumford, A. C., Yee, N., & Young, L. Y. (2013). Precipitation of alacranite (As<sub>8</sub>S<sub>9</sub>) by a novel As(V)-respiring anaerobe strain MPA-C3. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2748–2760. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12136>
46. Murphy, E. A., Velazquez, K. T., & Herbert, K. M. (2015). Influence of high-fat diet on gut microbiota: A driving force for chronic disease risk. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 18, Issue 5, pp. 515–520). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000209>
47. Nagano, T., & Yano, H. (2020). Dietary cellulose nanofiber modulates obesity and gut microbiota in high-fat-fed mice. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100214>
48. Nava, F. (2019). *¿Arsénico en agua potable?* [En línea]. Disponible en: <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=54> [Último acceso el 10 de septiembre del 2022].
49. QIAGEN. (Febrero 2020). QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit Handbook.
50. Rawle, R., Saley, T. C., Kang, Y. S., Wang, Q., Walk, S., Bothner, B., & McDermott, T. R. (2021). Introducing the ArsR-Regulated Arsenic Stimulon. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630562>
51. Rivas-Santiago, C., González-Curiel, I., Zarazua, S., Murgu, M., Ruiz Cardona, A., Lazalde, B., Lara-Ramírez, E. E., Vázquez, E., Castañeda-Delgado, J. E., Rivas-Santiago, B., Lopez, J. A., Cervantes-Villagrana, A. R., & López-Hernández, Y. (2019). Lipid Metabolism Alterations in a Rat Model of Chronic and Intergenerational Exposure to Arsenic. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4978018>

52. Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in Nutrition* (Vol. 11, Issue 1, pp. 77–91). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>
53. Schrauwen, P., & Westerterp, K. R. (2000). The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *British Journal of Nutrition*, 84, 417-427. doi: 10.1017/s0007114500001720
54. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
55. Simmons, A. L., Schlezinger, J. J., & Corkey, B. E. (2014). What Are We Putting in Our Food That Is Making Us Fat? Food Additives, Contaminants, and Other Putative Contributors to Obesity. *Current Obesity Reports*, 3(2), 273–285. <https://doi.org/10.1007/s13679-014-0094-y>
56. Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>
57. Srisuporn, P., Navasumrit, P., Ngaotepprutaram, T., Chaisatra, K., Hunsonti, P., & Ruchirawat, M. (2023). Arsenic exposure alters the expression of genes related to metabolic diseases in differentiated adipocytes and in newborns and children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2023.114124>
58. Thermo Scientific. (2020). NanoDrop Product Specifications.
59. Thompson, L. (2018). *16S Illumina Amplicon Protocol*. [En línea]. Disponible en: <https://www.protocols.io/view/emp-16s-illumina-amplicon-protocol-kqdg3dzzi25z/v1> [Último acceso el 21 de agosto del 2023].
60. Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*, 1(6). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>
61. Velásquez, G. (2006). *Fundamentos de alimentación saludable*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.

62. Villaseñor-Aranguren, M., Rosés, C., Riezu-Boj, J. I., López-Yoldi, M., Ramos-Lopez, O., Barceló, A. M., & Milagro, F. I. (2022). Association of the Gut Microbiota with the Host's Health through an Analysis of Biochemical Markers, Dietary Estimation, and Microbial Composition. *Nutrients*, 14(23). <https://doi.org/10.3390/nu14234966>
63. Walker, A., Pfitzner, B., Neschen, S., Kahle, M., Harir, M., Lucio, M., Moritz, F., Tziotis, D., Witting, M., Rothballer, M., Engel, M., Schmid, M., Endesfelder, D., Klingenspor, M., Rattei, T., Castell, W. Z., De Angelis, M. H., Hartmann, A., & Schmitt-Kopplin, P. (2014). Distinct signatures of host-microbial meta-metabolome and gut microbiome in two C57BL/6 strains under high-fat diet. *ISME Journal*, 8(12), 2380–2396. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.79>
64. Wang, B., Kong, Q., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., & Wang, G. (2020). A high-fat diet increases gut microbiota biodiversity and energy expenditure due to nutrient difference. *Nutrients*, 12(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu12103197>
65. Wang, F., Yao, J., Si, Y., Chen, H., Russel, M., Chen, K., Qian, Y., Zaray, G., & Bramanti, E. (2010). Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity. *Journal of Hazardous Materials*, 173(1–3), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.114>
66. Wang, J., Hu, W., Yang, H., Chen, F., Shu, Y., Zhang, G., Liu, J., Liu, Y., Li, H., & Guo, L. (2020). Arsenic concentrations, diversity and co-occurrence patterns of bacterial and fungal communities in the feces of mice under sub-chronic arsenic exposure through food. *Environment International*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105600>
67. WHO. (2020). *WHO Definition of Malnutrition*. [En línea]. Disponible en: <https://www.publichealth.com.ng/who-definition-of-malnutrition/> [Último acceso el 10 de septiembre del 2022].
68. Wu, H., Wu, R., Chen, X., Geng, H., Hu, Y., Gao, L., Fu, J., Pi, J., & Xu, Y. (2022). Developmental arsenic exposure induces dysbiosis of gut microbiota and disruption of plasma metabolites in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 450. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116174>
69. Xiao, L., Sonne, S. B., Feng, Q., Chen, N., Xia, Z., Li, X., Fang, Z., Zhang, D., Fjaere, E., Midtbø, L. K., Derrien, M., Hugenholtz, F., Tang, L., Li, J., Zhang, J., Liu, C., Hao, Q., Vogel, U. B., Mortensen, A., ... Kristiansen, K. (2017). High-

- fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-017-0258-6>
70. Xu, J., Ma, Z., Li, X., Liu, L., & Hu, X. (2020). A more pronounced effect of type III resistant starch: Vs. type II resistant starch on ameliorating hyperlipidemia in high fat diet-fed mice is associated with its supramolecular structural characteristics. *Food and Function*, 11(3), 1982–1995. <https://doi.org/10.1039/c9fo02025j>
71. Yuan, X., Chen, R., Zhang, Y., Lin, X., Yang, X., & McCormick, K. L. (2021). Gut Microbiota of Chinese Obese Children and Adolescents With and Without Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.636272>
72. Zeng, H., Larson, K. J., Cheng, W. H., Bukowski, M. R., Safratowich, B. D., Liu, Z., & Hakkak, R. (2020). Advanced liver steatosis accompanies an increase in hepatic inflammation, colonic, secondary bile acids and Lactobacillaceae/Lachnospiraceae bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108336>
73. Zhao, Y., Li, M., Tian, X., Xie, J., Liu, P., Ying, X., Wang, M., Yuan, J., Gao, Y., Tian, F., & Yan, X. (2021). Effects of arsenic exposure on lipid metabolism: a systematic review and meta-analysis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31(3), 188–196. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1864537>
74. Zhong, Y., Nyman, M., & Fåk, F. (2015). Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(10), 2066–2076. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500187>
75. Zinöcker, M. K., & Lindseth, I. A. (2018). The western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. *Nutrients* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10030365>

## APÉNDICES

**Tabla A1.** Índices de diversidad alfa para muestras de ciego, diferencias entre dieta control, dieta control con arsénico, dieta alta en grasa y dieta alta en grasa con arsénico.

	Control (n=10)	Control. Arsénico (n=12)	Alta en Grasa (n=12)	Alta en Grasa.Arsénico (n=11)	p
<b>Observadas</b>	656.40 ± 31.28	684.75 ± 48	681.17 ± 50.50	645 ± 33.75	0.09
<b>Chao1</b>	852.83 ± 52.90	867.24 ± 67.19	864.29 ± 100.86	813.46 ± 67.92	0.32
<b>ACE</b>	847.98 ± 45.40	867.07 ± 62.52	873.77 ± 90.06	803.51 ± 53.55	0.07
<b>Shannon</b>	3.80 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.09 ± 0.22 <sup>b</sup>	4.03 ± 0.27 <sup>ab</sup>	3.85 ± 0.24 <sup>ab</sup>	<b>0.02</b>
<b>Simpson</b>	0.93 (0.03) <sup>b</sup>	0.95 (0.02) <sup>a</sup>	0.96 (0.02) <sup>a</sup>	0.94 (0.02) <sup>ab</sup>	<b>0.03</b>
<b>InvSimpson</b>	14.93 (7.06) <sup>b</sup>	20.93 (9.86) <sup>a</sup>	23.71 (11.97) <sup>a</sup>	16.05 (7.61) <sup>ab</sup>	<b>0.03</b>
<b>Fisher</b>	106.73 ± 6.08	112.30 ± 9.53	111.60 ± 9.85	104.53 ± 6.50	0.09

**Tabla A2.** Ingredientes y composición de dietas utilizadas en el estudio.

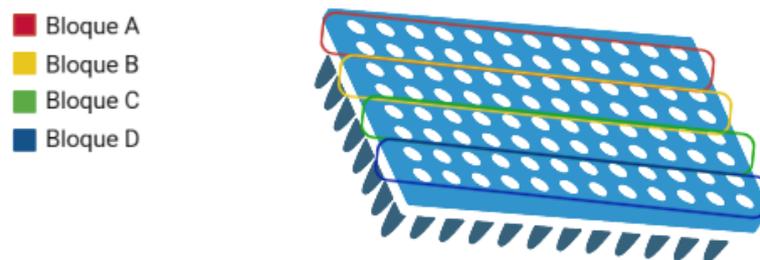
		<b>Dieta Control 5TJS</b>	<b>Dieta Alta en Grasa 5TJN</b>
<b>Ingredientes (%)</b>	Almidón de maíz	43.5091	31.2634
	Caseína	16.8093	19.7495
	Maltodextrina	14.4482	
	Dextrina		10.3819
	Sacarosa	10.9456	7.8651
	AIN-93G Premix de minerales con fibra	3.4045	4.0000
	Inulina	2.1117	2.4811
	Celulosa en polvo	2.1117	2.4811
	Manteca vegetal	1.5536	
	Grasa de leche	1.5536	6.0539
	Lardo	1.5536	6.0539
	Crisco*		6.0539
	AIN-93 Premix de vitaminas con fibra	0.9788	1.1500
	Aceite de soya	0.3263	1.2713
	L-cisteína	0.2521	0.2962
	Bitartrato de colina	0.1689	0.1985
	Aceite de maíz	0.1398	0.5448
	Colesterol	0.1267	0.1489
	Colorantes	0.0050	0.0050
	t-Butilhidroquinona	0.0015	0.0015
<b>Composición (kcal%)</b>	Proteína	15.9	16.3
	Carbohidratos	72.2	44.1
	Grasa	11.9	39.9

\*grasa saturada de origen vegetal generada por hidrogenación.

**Tabla A3.** Consumo de agua en mililitros por ratón al día para grupos que estuvieron expuestos a arsénico.

Dieta/Caja	Control-As		Control-As		Control-As		Alta en Grasa-As		Alta en Grasa-As		Alta en Grasa-As		p
	3	4	7	8	11	12	15	16					
<b>Semana 9</b>	3.29	2.05	2.64	2.00	2.29	2.29	2.05	2.00	0.66				
<b>Semana 10</b>	3.33	2.00	2.64	1.05	2.52	2.29	1.81	1.95	0.69				
<b>Semana 11</b>	3.10	2.19	2.64	1.90	2.38	2.24	2.00	1.81	0.49				
<b>Semana 12</b>	2.95	1.90	2.57	2.10	2.90	2.52	2.43	2.00	1.00				
<b>Semana 13</b>	2.90	2.19	3.07	2.52	2.29	2.10	1.90	1.76	0.06				
<b>Semana 14</b>	2.81	1.86	2.50	2.05	2.10	2.05	2.10	1.76	0.56				
<b>Semana 15</b>	3.52	1.86	2.71	2.10	2.00	1.90	1.76	1.57	0.11				
<b>Semana 16</b>	3.05	1.52	2.71	2.24	2.00	2.19	1.76	1.67	0.34				

mL/Ratón/Día



**Figura A4.** Acomodo de placa de PCR.

UPEAL – Bioterio

DCBS. CICUAL.018.16

26 de octubre del 2016.

**Dra. Sofía Morán Ramos**  
**Dra. Ivonne M. Heuze de Icaza**  
**Producción Agrícola y Animal**  
**Presente.**

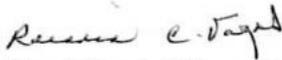
Por este conducto se le informa que de acuerdo con el "Manual de Organización y Procedimientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio".

El CICUAL-UAM-X en su reunión del día 26 de octubre del presente año decidió aprobar su protocolo de **INVESTIGACIÓN No. 162.**

**"EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL ARSENICO EN RATONES OBESOS; IMPLICACIONES METABÓLICAS SOBRE EL INTESTINO Y EL TEJIDO ADIPOSO"**

Este protocolo tendrá una vigencia de un año a partir de la fecha.

Atentamente



M. en C. Rosario C. Vargas Solís  
Representante del Departamento  
El Hombre y su Ambiente  
Presidenta

M. en C. Alejandro Palma Ramos  
Representante del Departamento  
Sistemas Biológicos



Dra. Ivonne M. Heuze de Icaza  
Coordinadora de la UPEAL-Bioterio  
Secretaria



Dr. Jaime Armando Bustos Martínez  
Representante del Departamento  
Atención a la Salud



Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez  
Representante del Departamento  
Sistemas Biológicos



MVZ Luis Pedro Moles y Cervantes  
Representante del Departamento  
Producción Agrícola y Animal



MVZ. E. Heriberto Quintana Flores  
Jefe de Proyecto de la UPEAL-Bioterio



Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, CDMX, 04960  
Tel: 5483-7195 Fax: 5483-7585 e-mail: ymheuze@correo.xoc.uam.mx;ymheuze@gmail.com

**Figura A5.** Carta de aceptación del estudio por parte del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAM Xochimilco.