

**UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
PUEBLA**



Departamento de ciencias en la salud
Maestría en Nutrición Clínica

**Asociación del viroma intestinal con la diabetes tipo 2 en un
modelo murino.**

TESIS QUE, PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

Presenta:

Lic. En Nutrición Elisa Morales Montes
elisa.morales01@upaep.edu.mx

ASESOR PRINCIPAL (EXPERTO Y METODOLÓGICO)
López Guerrero Delia Vanessa / Profesor investigador de tiempo completo de la
Facultad de Nutrición UAEM / Doctor
vannylpzgro@gmail.com

Firma

FACULTAD DE NUTRICIÓN UAEM



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Asociación del viroma intestinal con la diabetes tipo 2 en un modelo murino.

Tesis

Lic. Elisa Morales Montes

Asesora: Dra. Delia Vanessa López Guerrero



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS





Dedicatoria.

A la persona que me animó a hacer un posgrado, una mujer de ciencia que me inculcó el amor por la investigación, estuvo presente cada día de mi posgrado para escucharme y aconsejarme. Pero sobretodo, por creer en mí y enseñarme a ser fuerte. Maryan Azucena Anaya Moreno.

Agradecimientos.

Agradezco a todas las personas que contribuyeron a que la realización de este proyecto fuera posible.

A mis padres Cesareo Atenógenes Morales Tress y Norma Adriana Montes Quintana, por su apoyo incondicional en el aspecto emocional, moral, espiritual y económico, por su amor y confianza a lo largo de toda mi trayectoria académica.

A la Dra. María del Rocío Baños Lara por su confianza y por brindarme la oportunidad de obtener una beca de investigación y guiarme hacia el lugar de realización del proyecto.

A la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla por brindarme una beca de investigación.

A la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, mi asesora experta, por su excelente disposición para trabajar y transmitir su amplio conocimiento, por su acompañamiento a lo largo de mi estancia en Morelos y su apoyo en momentos críticos de salud.

Al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, encargado del laboratorio de inmunología viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por brindarme la oportunidad de trabajar en un laboratorio en óptimas condiciones, además de su excelente trato y disposición para transmitir su amplio conocimiento en ciencia e inmunología.

A la Dra. Elizabeth Mata, encargada del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por su disponibilidad y excelente servicio en la provision de ratones de experimentación y alimento, además del mantenimiento del Bioterio en condiciones óptimas de bioseguridad y ambiente para los animales de experimentación.

Al Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, profesor investigador de la Facultad de Farmacia de la UAEM, por su apoyo en la inducción de diabetes por fármaco a los ratones de experimentación, además de su excelente trato y cordialidad.

Al Dr. Elix Alberto Domínguez Mendoza, por su disponibilidad para trabajar y compartir su conocimiento en farmacia, por su apoyo para la obtención de heces fecales a partir de ratones diabéticos, además de su excelente trato y cordialidad.

Al Mtro. José de Jesús Carreño Torres, encargado del laboratorio Diclim, por su apoyo en la provisión de los reactivos y equipo para la realización del perfil de lípidos en un



laboratorio en excelentes condiciones, además de su disposición para transmitir su conocimiento.

A Luis Alberto Caltempa Sierra, Karla Abigail García Trejo y Ricardo Abad Balbuena Sánchez, pasantes de la Licenciatura en Nutrición de la UAEM, por su contribución en el desarrollo de los procedimientos experimentales.

A la Mtra. Nora Albores, mi psicóloga, por su acompañamiento terapéutico durante la realización del proyecto, particularmente en momentos críticos de salud.

A mi tía, Teresa Esperanza Morales Tress, por su ejemplo, calidez y apoyo moral y económico.

A mi prima, la Dra. Karla Adriana Morales Vázquez, por su ejemplo como investigadora y su apoyo moral.

Al Instituto Suizo y a mis alumnas, por su disponibilidad para ajustar sus horarios para permanecer aprendiendo conmigo y por su interés en el proyecto.

Agradezco infinitamente a Dios, por permitirme esta experiencia de vida, cumplir mis sueños y poner a las personas indicadas en mi camino para la realización de este proyecto.

Lista de abreviaturas

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADP:** adenosina-5-difosfato
- AgRP:** proteína R-agouti
- ARN:** ácido ribonucleico
- ATP:** adenosín trifosfato
- Célula NK:** célula natural killer (asesina natural)
- CHE:** colesterol esterasa
- CHOD:** colesterol oxidasa
- CTLs:** linfocitos T citotóxicos
- EII:** enfermedad inflamatoria intestinal
- ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- ENSA:** Encuesta Nacional de Salud
- ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
- GALT:** tejido linfoide asociado a mucosas
- GK:** glicerol quinasa
- GPO:** glicerolfosfato deshidrogenasa
- G3P:** glicerol-3-fosfato
- HDL:** lipoproteínas de alta densidad
- HMP:** Human Microbiome Project (Proyecto de Microbioma Humano)
- HRP:** horseradish peroxidase. Enzima peroxidasa utilizada en pruebas ELISA.
- IgA:** inmunoglobulina A
- IL:** interleucina
- IL-6:** interleucina 6
- IMC:** índice de masa corporal
- IRCD:** infección recurrente por *clostridium difficile*
- LDL:** lipoproteínas de baja densidad
- LPL:** lipoproteinlipasa
- LPS:** lipopolisacáridos
- METAHIT:** Metagenomics of the Human Intestinal Tract (Metagenómica del Tracto Intestinal Humano)
- NAD:** dinucleótido de nicotinamida



NOM-015: Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus

NPY: neuropéptido Y

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMPs: patrón molecular asociado a patógenos

PCR: proteína C reactiva

PCR: reacción en cadena de polimerasa

PMN: polimorfonucleares

POD: enzima peroxidasa

POMP: proopiomelanocortina

SII: síndrome de intestino irritable

STZ: estreptozotocina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TMF: trasplante de microbiota fecal

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

4-AF: 4-aminofenazona

1. Resumen.....	11
2. Introducción.....	12
2.1 Antecedentes generales.....	12
2.1.1 El microbioma humano.....	12
2.1.2 Microbiota del tracto gastrointestinal.....	13
2.1.3 Funciones principales de la microbiota intestinal.....	13
2.1.4 Factores que afectan la composición de la microbiota.....	14
2.1.5 Una aproximación a los virus.....	14
2.1.6 Definición y características de los virus.....	15
2.1.7 Composición de los virus.....	16
2.1.8 Clasificación de los virus.....	17
2.1.9 Bacteriófagos.....	18
2.1.10 Análisis de los virus.....	19
2.1.11 Proyectos de estudio del microbioma y viroma humano.....	20
2.1.12 El viroma humano.....	20
2.1.12.1 El viroma intestinal.....	20
2.1.12.2 El viroma intestinal en la salud y la enfermedad.....	22
2.1.12.3 Avances en el conocimiento del viroma intestinal.....	23
2.1.12.4 Efectos metabólicos del viroma.....	25
2.1.12.5 El viroma y la inflamación.....	25
2.1.13 Diabetes.....	26
2.1.13.1 Epidemiología de la diabetes.....	27
2.1.13.2 Diagnóstico de diabetes en humanos.....	27
2.1.13.3 Diabetes tipo 2.....	27
2.1.13.4 Dislipidemias en diabetes tipo 2.....	28
2.1.13.5 Modelos animales de diabetes tipo 2.....	29
2.1.13.5.1 Clasificación de los modelos animales de diabetes tipo 2.....	29
2.1.13.5.2 Inducción de diabetes a través de fármacos.....	29
2.1.13.5.3 Niveles de referencia de glucosa y lípidos en ratón.....	30
2.1.13.6 Inflamación en diabetes.....	31
2.1.13.6.1 Mediadores de la inflamación.....	32
2.1.13.6.2 IL-6	33
2.1.13.6.2.1 IL-6 y diabetes tipo 2.....	33

2.1.13.7	Leptina en diabetes.....	34
2.2	Antecedentes específicos.....	34
2.2.1	La microbiota, la obesidad y la diabetes tipo 2.....	34
2.2.2	La microbiota y el síndrome metabólico.....	36
2.2.3	Trasplante de microbiota fecal.....	36
3.	Justificación.....	38
4.	Definición del problema.....	40
5.	Pregunta de investigación.....	40
6.	Hipótesis de estudio.....	40
7.	Objetivos.....	41
7.1	Objetivo general.....	41
7.2	Objetivos específicos.....	41
8.	Metodología	41
8.1	Tipo y diseño del proyecto.....	41
8.1.1	Tipo de estudio.....	41
8.1.2	Características del estudio (taxonomía de Feinstein).....	42
8.2	Definición del universo de trabajo.....	42
8.2.1	Población fuente.....	42
8.2.2	Población elegible.....	42
8.3	Definición de unidades de observación y del grupo control.....	42
8.3.1	Criterios de inclusión.....	42
8.3.2	Criterios de exclusión.....	43
8.3.3	Criterios de eliminación.....	43
8.4	Estrategia de muestreo.....	43
8.4.1	Cálculo del tamaño de la muestra.....	43
8.4.2	Tipo de muestreo.....	43
8.5	Definición de variables y escalas de medición.....	44
8.5.1	Definición conceptual de variables.....	44
8.5.2	Cuadro de operacionalización de variables.....	45
8.6	Estrategia experimental y procedimientos.....	46
8.7	Diagrama de flujo.....	55
8.8	Recolección de la información.....	56
8.8.1	Instrumentos de medición.....	56
8.8.2	Validez y consistencia.....	56

8.9 Procesamiento y presentación de la información.....	56
8.9.1 Abordaje de análisis estadístico.....	56
9. Lugar de realización del proyecto.....	57
10. Aspectos bioéticos.....	57
11. Resultados.....	58
12. Discusión.....	82
13. Conclusión.....	86
14. Perspectivas.....	86
15. Referencias.....	87
16. Anexos.....	93

1. Resumen

El tracto gastrointestinal se encuentra densamente poblado por una gran cantidad de microorganismos comensales, estableciendo un complejo ecosistema con interacciones entre elementos celulares del hospedero y las poblaciones presentes en la microbiota. Gracias a los estudios de metasecuenciación, se ha podido determinar la composición genética de la microbiota tanto en condiciones de salud como de enfermedad, encontrando diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas, arqueas, hongos y virus, en su mayoría bacteriófagos, virus que infectan y controlan las poblaciones bacterianas. Al conjunto de genes virales presentes en el intestino se le denomina viroma intestinal. Es conocido que la composición bacteriana es un factor asociado al desarrollo de distintas enfermedades metabólicas, incluyendo la diabetes tipo 2; no obstante, se desconoce la participación de los virus. En el presente estudio, se analizó la participación de la fracción no bacteriana de las heces fecales, denominado como viroma en este proyecto, como factor asociado en el desarrollo de diabetes tipo 2. Se determinó el grado de asociación del viroma intestinal de ratones con diabetes tipo 2 transferido a ratones sanos en el desarrollo y mantenimiento de diabetes tipo 2. Para ello, se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 para inducir diabetes tipo 2 mediante el uso del fármaco estreptozotocina, se colectaron sus heces fecales, las cuales fueron disgregadas, sedimentadas y el sobrenadante fue filtrado para eliminar la parte bacteriana. El filtrado obtenido contiene la mayoría de las partículas virales de las heces fecales. El filtrado proveniente de ratones diabéticos fue transferido a ratones sanos de la cepa C57/B6, los cuales fueron monitoreados a los 7, 14, 21, 28 y 36 días posteriores a la transferencia, tomando muestras de sangre periférica y suero para medir glucosa, triglicéridos, colesterol, IL-6 y leptina. Como control se utilizaron filtrados provenientes de ratones sanos, así como ratones transferidos con homogeneizados de heces de ambas condiciones sin filtrar, es decir con microbiota completa. Para el abordaje estadístico se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis, utilizando el programa STATA SE, versión 12. Encontramos que la transferencia de la fracción no bacteriana de las heces de ratones con diabetes tipo 2 a ratones sanos eleva la glucosa en ayuno de manera significativa ($X^2(3) = 13.256$, $p = 0.0041$) y transitoria a los 21 días posteriores a la transferencia, lo que sugiere que las partículas virales transferidas son un elemento que participa en el desarrollo de este padecimiento.

2. Introducción

El viroma intestinal es el conjunto de genes virales presentes en el intestino de un organismo, forma parte del microbioma intestinal, que es el conjunto de genes no humanos de todos los microorganismos que habitan en este órgano en un equilibrio denominado eubiosis. Una alteración en las poblaciones microbianas, conocida como disbiosis, está asociada con diversas patologías, como son la diabetes tipo 2, la obesidad, el síndrome de colon irritable, la enfermedad inflamatoria intestinal e incluso enfermedades neurológicas y autoinmunes; no obstante, los estudios se han centrado principalmente en su asociación con los filos bacterianos; sin embargo, los virus, principalmente los bacteriófagos, influyen en la salud o enfermedad del huésped. Además, el viroma intestinal interactúa con la capa mucosa, células epiteliales y células inmunes del intestino, por ello, es capaz de influenciar el tipo de respuesta del huésped, así como la inflamación y la enfermedad por medio de la interacción con otros miembros de la microbiota, por lo que su estudio es de suma importancia en patologías como lo es la diabetes tipo 2, enfermedad metabólica más frecuente en todo el mundo, misma que en nuestro país representa uno de los principales problemas de salud pública.^{1, 2, 3,}

4

2.1 Antecedentes generales

2.1.1 El microbioma humano

La microbiota es el conjunto de todos los microorganismos que habitan en el cuerpo humano, mientras que el microbioma humano, es la colección de todos los genes de estos microorganismos, en esta colección hay una variedad de microorganismos que incluye eucarias, arqueas, bacterias, hongos, protozoarios y virus. Cuando el microbioma se agrupa por genomas pertenecientes a diferentes especies, se denomina metagenoma.^{24, 14, 25, 26}

Se ha estimado que el hombre tiene diez veces más microorganismos que células pertenecientes a su propio cuerpo. También se ha estimado que el microbioma está compuesto por genes de más de 10 000 especies diferentes.^{2, 4, 23}

2.1.2 Microbiota del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal, es un complejo ecosistema en donde existen interacciones entre las células del hospedero y la microbiota. Estas interacciones mantienen un equilibrio denominado como eubiosis, el cual, cuando es alterado, se denomina como disbiosis. La disbiosis está asociada con algunos padecimientos como diabetes tipo 2, obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome de colon irritable.

El pH ácido del estómago restringe el crecimiento de la mayoría de los organismos, aunque algunos pueden habitar en él, tal como *Helicobacter Pylori*, bacteria asociada al desarrollo de úlceras y cáncer de estómago. Pocos microorganismos sobreviven en el duodeno, esto debido a que los ácidos biliares inhiben su crecimiento, aumentando su cantidad en el yeyuno e ileon. En el colon se encuentran la mayor parte de los microorganismos, principalmente bacterias (*Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococos*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacilos*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Estaphylococos* y *Streptococos*).²³

2.1.3 Funciones principales de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal es considerada como un órgano más del cuerpo, pues tiene funciones que son cruciales para mantener la vida. Algunas de estas funciones se describen a continuación.

- *Funciones nutritivas y metabólicas:* Algunas poblaciones bacterianas participan en la fermentación de los carbohidratos no digeribles, producción de ácidos grasos de cadena corta, absorción de iones como calcio, hierro y magnesio, producción de enzimas, síntesis de vitaminas (K, B₁₂, biotina, ácido fólico y patoténico), síntesis de aminoácidos y modulación del metabolismo de la grasa.²⁶
- *Funciones de protección:* El crecimiento de la microbiota asociada a la mucosa intestinal, tiene un efecto barrera, que previene la invasión de microorganismos patógenos u oportunistas.²⁶

- *Funciones tróficas:* La presencia de microorganismos en el lumen intestinal participa en el control de proliferación y diferenciación de las células epiteliales y en el desarrollo y modulación del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal (GALT), ya que los componentes de la microbiota son reconocidos por las células de la respuesta inmune, generando las condiciones de activación y tolerancia para mantener el equilibrio entre las poblaciones que constituyen la microbiota.²⁶

2.1.4 Factores que afectan la composición de la microbiota

Los factores que afectan la composición de la microbiota son: el consumo de probióticos y prebióticos, el sistema inmunológico, por medio de la producción de IgA, anticuerpos secretados al intestino e inflamación, la edad, la genética, la dieta, el uso de antibióticos, el estrés y los bacteriófagos que infectan a las bacterias y son capaces de destruir a cepas específicas. La alimentación se asocia también con la alteración del viroma intestinal humano, compuesto principalmente por bacteriófagos, de acuerdo con un estudio realizado por Minot en el 2011.^{16, 24, 27}

El entendimiento de los factores que afectan el microbioma humano comprende el estudio de los bacteriófagos como reguladores de la composición de la microbiota, y por sus características de especificidad han sido propuestos en la terapia de algunas infecciones como alternativa al uso de antibióticos.⁶³

El presente trabajo se enfocó en el estudio de la transferencia de la parte no bacteriana proveniente de heces fecales, fracción que se consideró posee la mayoría de las partículas virales que conforman el viroma intestinal, a continuación, se hará una breve descripción de los virus y su clasificación.

2.1.5 Una aproximación a los virus

La microbiología comenzó como ciencia en 1674, cuando Anton van Leeuwenhoek examinó mediante un microscopio una gota de agua y descubrió un mundo formado por millones de microorganismos, 100 años después, Otto Muller organizó a las bacterias en géneros y especies. Posteriormente en 1840, Friederich Heile propuso una serie de criterios para demostrar que los microorganismos eran responsables de la aparición de

enfermedades en el ser humano. No fue sino hasta 1946, que John Enders cultivó virus en cultivos celulares *in vitro*. Las investigaciones y las técnicas fueron avanzando, hasta que en 1901, Reed identificó al primer virus que infecta a los humanos.^{5, 6, 7}

Refiriéndonos a los virus, los primeros pasos de numerosos investigadores se han seguido por miles de científicos que han añadido cada vez más datos para ampliar los conocimientos sobre estos microorganismos y el papel que ejercen en las enfermedades. Se considera que de 1929 a 1962 se trabajó para identificar la estructura y composición de los virus, los cuales no pudieron ser vistos sino hasta 1930, con el lanzamiento del microscopio electrónico.^{6, 7}

La composición de estas partículas fue determinada por Slesinger, quien demostró que estaban formados por proteínas, fósforo y ácido desoxirribonucleico. En 1935, Stanley hizo la primera cristalización de un virus, técnica que permitió a los científicos conocer con mayor cercanía a estas entidades. Por último, en 1940 se tomaron las primeras fotografías de un virus, permitiendo a la comunidad científica, visualizar a una de las entidades estudiadas. Finalmente, con la invención del microscopio electrónico y el desarrollo de la técnica de cultivo de células *in vitro* para la reproducción de los virus, se abrió el camino a la entonces considerada como investigación moderna de la virología.⁶

Por la simpleza de su composición, la ausencia de organelos celulares y de algunas funciones vitales, se ha pensado que los virus no son organismos vivos, no obstante, están formados por componentes de materia viva (proteínas y ácidos nucleicos), además de multiplicarse intracelularmente y transmitirse de un huésped a otro; por lo que son considerados como parásitos intracelulares obligados, los cuales únicamente pueden replicarse cuando infectan a una célula, que les provea la maquinaria necesaria para la generación de nuevas partículas virales.^{8, 9}

2.1.6 Definición y características de los virus

Los virus han sido descritos como elementos proteicos y genéticos que infectan una célula, la invaden y se replican a expensas de ella, además deben ser capaces de utilizar los procesos celulares de una célula hospedada para producir sus componentes, ya que

no pueden generar energía o sintetizar proteínas independientemente de una célula hospedadora.^{10, 6}

La palabra *Virus* viene de una voz latina que significa veneno, conforman un inmenso y heterogéneo grupo de partículas infecciosas, con un diámetro que oscila desde los 10 hasta los 600 nm. Se sabe que los virus son la entidad más abundante en el planeta, constituyen un reservorio de diversidad genética, afectan ciclos biogeoquímicos y la dinámica de un ecosistema. Son partículas diminutas, de estructura elemental que tienen un mecanismo de replicación, en el cual el ácido nucleico o material genético del virus da la información necesaria para programar a la célula hospedera y hacerla sintetizar moléculas específicas, generando una nueva progenie viral.^{6, 11}

Ningún tipo de célula está exenta de ser infectada por un virus, aunque existe especificidad para ello, los virus pueden infectar humanos, animales, plantas, protozoarios, hongos, arqueas, bacterias y otros virus. Muchas enfermedades humanas son causadas por virus, no obstante, en la microbiota humana podemos encontrar virus inocuos para el hombre que incluso pueden ser benéficos para la salud.¹²

2.1.7 Composición de los virus

En cuanto a la composición de los virus, se conoce que poseen un solo tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), nunca ambos, característica que los distingue de la célula microbiana, cuyo material genético es exclusivamente ADN. Este material genético se encuentra protegido por la cápside estructurada, en donde residen las proteínas virales. El genoma, la cápside y una envoltura lipídica constituyen el virión, aunque también existen partículas desnudas. La envoltura es una estructura que existe únicamente en determinados virus cubriendo la cápside y generalmente esta constituida por la membrana de las células infectadas. Atravesando esta estructura se encuentran las espículas, que son prolongaciones proteicas de la cápside. Las estructuras presentes en la cápside median la interacción entre la unión y la entrada del virus a la célula diana. La nucleocápside es un complejo de proteínas y ácidos nucleicos que representan la forma empacada del genoma viral, este genoma codifica para proteínas estructurales que formarán nuevas partículas virales y proteínas no estructurales, las cuales participan principalmente en la transcripción de los genes virales y en la modulación de

la transcripción de los genes celulares, adueñándose de la maquinaria transcripcional celular.^{10, 13, 14, 15}

2.1.8 Clasificación de los virus

En cuanto a la taxonomía, los virus se clasifican con diferentes criterios de acuerdo a su ácido nucleico (ADN o ARN), a la forma de la cápside (isaédricos o helicoidales), a la presencia de membrana lipídica (desnudos o con envoltura), número de capsómeros, diámetro de la nucleicápside, modo de replicación, propiedades físicoquímicas del virión, propiedades de las proteínas virales, tipo de huésped que infecta, tipo de enfermedad que producen, por sus células diana, mecanismo de transmisión, ubicación en el cuerpo humano y propiedades inmunológicas y antigénicas. De esta manera, los virus se ordenan en familias y géneros, que forman grupos y subgrupos. La clasificación más utilizada para el estudio de los virus es la clasificación de Baltimore, la cual se basa en la composición del material genético de las partículas virales y de la estrategia de transcripción y replicación, describiendo siete grupos.^{7, 14, 15}

Baltimore clasificó a los virus en tres grandes grupos (virus de ADN, virus de ARN y virus de transcripción reversa). Dentro del grupo de virus de ADN encontramos a los virus en I y II, dentro del grupo de virus de ARN se encuentran los grupos III, IV y V y dentro del grupo de virus de transcripción reversa se encuentran los virus clase VI y VII.⁶⁴

Grupo I: Virus cuyo genoma tiene ADN con doble cadena. Estos virus, como las células, llevan a cabo una transcripción asimétrica de su ADN para producir ARNm. Su polaridad es poitiva y negativa.

Grupo II: Virus con ADN de una sola cadena, con la misma polaridad que el ARNm. La polaridad del ADN es positiva.

Grupo III: Virus con ARN de doble cadena con polaridad positiva y negativa. El ARN de estos virus representa una transcripción asimétrica del genoma. Los virus de este tipo

tienen múltiples segmentos de ARN de doble hélice, cada uno contiene la información para sintetizar una sola proteína.

Grupo IV: Virus con ARN de una cadena, cuya secuencia de bases de ARNm es idéntica a la de el ARN. Su polaridad es positiva.

Grupo V: Virus con ARN de una cadena con polaridad negativa, cuya secuencia de bases es complementaria al ARNm. La síntesis de ARNm implica la transferencia de información de ARNm de una sola cadena a su ARN complementario.

Grupo VI: Virus de ARN de cadena positiva, que requieren de un intermediario de ADNE para la transcripción de los genes, por lo que posee una enzima denominada como transcriptasa reversa.

Grupo VII: Virus con ADN de doble cadena con transcripción reversa.⁶⁴

2.1.9 Bacteriófagos

En el presente trabajo se describirá la importancia de los virus conocidos como *bacteriófagos* o *fagos*, los cuales representan la mayor parte de los virus intestinales; sin embargo, no son los únicos virus presentes en él. Estos microorganismos, descubiertos en 1915 por Twort, son virus que infectan bacterias y, al igual que todos los virus, son parásitos intracelulares, algunos son patogénicos, mientras que otros no lo son. Los bacteriófagos inyectan su ácido nucleico en bacterias, algunos pueden destruirlas (líticos) y otros, por el contrario, participan en dos de los cuatro mecanismos en los cuales las bacterias adquieren nueva información genética (lisogénicos). Este tipo de virus son las entidades biológicas más abundantes de la Tierra y su rol en la salud humana a penas comienza a ser estudiado.^{16, 12, 17, 8, 15, 18, 19}

Debido al potencial de los bacteriófagos para destruir bacterias, Feliz d'Herelle y colaboradores en 1919 comenzaron a estudiarlos para utilizarlos terapéuticamente, sin embargo, se perdió interés por esta medida terapéutica debido al desarrollo de antibióticos en 1940. Hoy en día, su potencial de destrucción de bacterias es retomado

por algunos científicos para comprender su papel en la simbiosis o disbiosis de la microbiota intestinal.¹⁷

En el presente estudio se asocia a las partículas virales presentes en el intestino de ratones, con la diabetes tipo 2, por lo tanto, en caso de encontrar alguna asociación, será necesario en estudios posteriores, identificar y analizar a los virus que se encuentran presentes en el intestino de los ratones con esta entidad patológica.

2.1.10 Análisis de los virus

Para identificar y analizar a los virus se han utilizado, a lo largo de la historia de la virología, diferentes técnicas. El análisis genético es una técnica poderosa para entender la estructura y la función del genoma viral, los productos de sus genes, y su función en la infección y el proceso salud-enfermedad.

Las partículas virales guardan una relación de 10:1 con otros microorganismos en la mayoría de ambientes, pero el ADN viral representa sólo del 2 al 5% del total existente. Separar a los virus de los demás microorganismos es requerido en algunos estudios.²⁰

Las técnicas rápidas y precisas de la biología molecular han facilitado la identificación de productos de genes virales y el mapeo de éstos en el genoma viral. Se cuenta con diversas técnicas comerciales cuantitativas para detectar ácido nucleico de virus o para amplificarlo e identificarlo. Las técnicas tradicionales de cultivo de virus y detección de antígenos fueron sustituidas por métodos como reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR transcriptas inversa (RT-PCR), y otros. Estos métodos detectan virus y permiten cuantificarlos para su uso en virología diagnóstica. No obstante, hoy en día se cuenta con tecnologías mucho más avanzadas, en las cuales se utiliza la metagenómica mediante la implementación de técnicas como el Shoutgun y la pirosecuenciación.^{21, 16}

El desarrollo de estas técnicas ha permitido la secuenciación masiva de los genes presentes en ecosistemas completos, incluyendo el intestino, lo que permite conocer a las poblaciones de microorganismos presentes, demostrando la presencia de virus dentro de este complejo sistema. Estas técnicas tienen un menor sesgo taxonómico en la secuenciación, permiten conocer a los organismos de las comunidades y sus

funciones, por lo que representan un avance cuántico en el entendimiento de cómo funciona la naturaleza.²²

2.1.11 Proyectos de estudio del microbioma y viroma humano

Las nuevas tecnologías de secuenciación y análisis han permitido el desarrollo de proyectos grandes de estudio de microorganismos, hace diez años se estudia la microbiota utilizando procedimientos moleculares que han sido sistematizados con metagenómica. El costo para la secuenciación utilizando nuevas tecnologías ha permitido la elaboración de estudios a gran escala sobre el microbioma humano, revelando así una enorme variabilidad interpersonal en la composición de la microbiota y en su ubicación.^{16, 25}

Con respecto al microbioma, se han realizado dos grandes proyectos de identificación y análisis de los microorganismos que la integran. Estos proyectos se basan en la aplicación de las nuevas tecnologías para tratar de responder cuestionamientos de gran importancia hoy en día en la salud y la nutrición relacionados con la microbiota, como lo es el The Human Microbiome Project y el MetaHit.^{22, 16, 29, 21, 14, 23, 30, 31}

2.1.12 El viroma humano

El viroma humano es la colección de todos los genes virales presentes en los seres humanos, comprende virus que infectan a las células eucariotes, virus que infectan bacterias (bacteriófagos), virus que infectan arqueas. En el viroma se encuentran virus eucariotas y procariotas, virus que causan infecciones agudas, latentes o crónicas, en donde los virus se integran al genoma del huésped. La amplitud del viroma humano no es totalmente conocida, y es sumamente complejo, pues cada individuo ha estado expuesto a distintos tipos de infecciones, por lo que se siguen realizando estudios para la identificación de más virus presentes en la microbiota intestinal.^{9, 28}

2.1.12.1 El viroma intestinal

El primer reporte de viroma asociado a intestino fue publicado en el 2003, en este estudio se aislaron partículas virales de un solo adulto. Se identificaron 1200 virotipos y

la fracción identificada del viroma estuvo dominada por bacteriófagos, la mayoría *Siphoviridae* y *Podoviridae*. Posteriormente se identificó a *Microviridae* como una familia viral importante presente en el intestino humano.²⁰

El número de partículas virales en las heces humanas está en el mismo rango que el de las bacterias, más de 10^8 por gramo, la mayoría de estas partículas virales son bacteriófagos (90%) con variación interindividual extrema. Existen virus en el intestino de los seres humanos y de los mamíferos que aún no han sido caracterizados.⁵⁰

Una inmensa cantidad de virus está presente en el intestino humano. El entendimiento del rol de estas poblaciones en la salud y la enfermedad requiere un profundo análisis de su composición y dinámica.^{30, 16}

El viroma intestinal incluye virus patogénicos, estos se vinculan con el viroma humano porque cuando infectan al intestino son responsables de cambios en los enterocitos y en la microbiota bacteriana.⁵¹

Se han encontrado virus eucariotas asociados a enfermedades como *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Enterovirus* y *Norovirus*, virus asociados a la ingesta de alimentos como Gynovirus, Nodavirus y miembros de la familia *Dicistroviridae*, *Vigaviridae* y *Partitiviridae*. En heces de niños con diarrea, se encontraron virus, muchos de ellos no reconocidos como patogénicos, como las familias *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*.^{20, 51}

En décadas pasadas, investigaciones microbiológicas han descubierto virus infectando parásitos del intestino humano como *Mimiviridae*, *Mamaviridae*, *Marseilleviridae*. Estos virus se definen como virus gigantes por sus dimensiones.⁵¹

Se han descrito virus de plantas, cuya importancia biológica radica en que afectan la composición cualitativa y cuantitativa de las bacterias intestinales.⁵¹

En el análisis taxonómico de la población viral de un individuo se encontró predominancia de *Microviridae* y se identificaron en menor cantidad, virus como *Podoviridae*, *Myoviridae* y *Siphoviridae* únicamente en un 13%.¹⁸

Se ha encontrado que los bacteriófagos representan el 90% del viroma humano, gran cantidad de estos bacteriófagos pertenece a la familia *Microviridae*. Mediante análisis metagenómicos, se han identificado géneros de bacteriófagos asociados con bacterias por ejemplo, los genomas de *Picornaviridae* y *Spounavirinae* fueron aislados de bacterias asociadas a humanos como *Estafilococos*, *Streptococos*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Listeria*, *Enterococos* y *Bacilos*. Se identificaron siete géneros de virus asociados con géneros de bacterias, se encontró que el gen P22 está conectado con el género de la familia de *Enterobacteraceas* como *Escherichia*, *Salmonella* y *Klebsiella*. El *Spounavirinae* se conecta con el orden de *Bacteroidales*.⁵¹

En un análisis del viroma de un individuo se encontraron linajes bacterianos que se vinculan con bacteriófagos, entre ellas *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium siraeum* y *Bacteroides fragilis*, *Blautia hansenii* y *Lachnospiraceae*, todas ellas presentes en un análisis metagenómico de ADN.¹⁸

Los virus no bacteriófagos que se han encontrado en el intestino y que no han sido asociados con enfermedades, especialmente aquellos adquiridos en la infancia temprana, pueden ser esenciales para el desarrollo propio del sistema inmune. Algunos genotipos humanos o ciertas restricciones inmunológicas pueden ser causa de que los virus que son normalmente inocuos induzcan enfermedades en el huésped.²⁰

2.1.12.2 El viroma intestinal en la salud y la enfermedad

Desde que se descubrió la presencia de virus en estudios del microbioma humano en individuos sanos, el concepto tradicional de infección viral se ha volcado. En la salud, la mucosa intestinal se caracteriza por infecciones virales que pueden traer efectos benéficos o dañinos para el huésped.¹

La presencia del ADN y ARN virales induce la expresión de interferones, mecanismos antivirales por las células epiteliales y del sistema inmune innato. A su vez, también se

desencadenan respuestas inmunomoduladoras para neutralizar la sobreactivación del sistema inmune del intestino induciendo la producción de IL-10 y células T reguladoras. Sin embargo, la inducción de los mecanismos efectores y supresores modifica el estado de inmunidad. La inmunomodulación viral tiene consecuencias para el huésped, ya que puede alterar la susceptibilidad a enfermedades complejas e infecciones secundarias.

50

Un virus puede tener efectos adversos y benéficos dependiendo de su localización anatómica, el genotipo del huésped y la presencia de otros microorganismos. El contexto es el determinante del efecto deletéreo, neutro o benéfico que tiene un virus en un huésped.⁵⁰

2.1.12.3 Avances en el conocimiento del viroma intestinal

Los hallazgos más importantes acerca del viroma intestinal se enumeran a continuación:

1. Está compuesto en su mayoría por bacteriófagos, también llamados fagos. Estos virus influyen en la salud afectando la estructura y función de la comunidad bacteriana, modulando su interacción con el huésped. Los tipos de bacteriófagos varían enormemente únicamente entre un individuo, no se ha encontrado una variabilidad intrapersonal significativa. La variedad de estos virus incrementa con la edad adulta, siendo la dieta un factor que afecta la composición de una comunidad intestinal de fagos.^{1, 20}
2. El viroma intestinal interactúa con la capa mucosa, células epiteliales y células inmunes subyacentes a la lámina propia, por ello puede contribuir a la salud o enfermedad del huésped.¹
3. El viroma intestinal es capaz de influenciar el tipo de respuesta del huésped y de regular su inmunofenotipo durante la salud, así como la inflamación y la enfermedad por medio de la interacción con otros miembros del microbioma y con factores genéticos del huésped.¹
4. Los bacteriófagos juegan un rol en la transición entre la salud y la enfermedad cuando contribuyen a la generación de una disbiosis, es decir, a un desequilibrio entre las bacterias patógenas y las comensales.¹

Los bacteriófagos son responsables de la diversidad bacteriana en el intestino por medio de la transferencia del material genético en las comunidades bacterianas, incluyendo el responsable de la patogénesis y de la resistencia a antibióticos. La activación de profagos provoca la lisis de algunas bacterias trayendo consecuencias ecológicas. El microbioma intestinal ha mostrado ser sensible a la invasión por bacteriofagos, provocando cambios en la abundancia de especies bacterianas.²

Aunque la enfermedad del colon irritable ha sido la enfermedad más asociada con disbiosis, otras enfermedades adicionales están asociadas con cambios en el microbioma intestinal, estas incluyen diabetes, cáncer, síndrome metabólico, enfermedades metabólicas y obesidad.^{2, 3}

Es importante mencionar a la obesidad, ya que se identifica como causa de la diabetes tipo 2. El desarrollo de la obesidad es un proceso complejo que involucra factores genéticos y ambientales. Estudios han revelado cambios importantes en la composición y función metabólica de la microbiota intestinal en participantes con obesidad.⁵²

Algunos individuos parecen ser más afectados que otros por el ambiente obesogénico, por ello se sugirió un componente hereditario para la acumulación excesiva de grasa corporal, respaldado por estudios en gemelos y en hijos adoptados. Los estudios sobre variación en el genoma humano han resultado en el descubrimiento de 31 locus asociados a la acumulación de tejido adiposo general y 17 locus asociados con acumulación de grasa visceral.³⁰

Sin embargo, la proporción de la explicación genética de la variación del índice de masa corporal (IMC) permanece deficiente. A pesar de los hallazgos de la asociación entre el genoma humano y la obesidad, en el Metahit se encontró que las variaciones en el microbioma tienen un papel mayor en la patogénesis de la obesidad que las variaciones en el genoma humano, ya que las señales asociadas a obesidad en el microbioma intestinal son mucho más fuertes, es importante mencionarlo, ya que la obesidad es una causa conocida de la diabetes tipo 2.³⁰

Un desequilibrio entre las bacterias pro y anti-inflamatorias condiciona a la aparición de inflamación y resistencia a la insulina, una liberación elevada de triglicéridos y ácidos grasos libres.³⁰

Muchas anormalidades metabólicas se asocian con la acumulación de grasa. Algunos individuos con obesidad parecen tener un mejor pronóstico, mientras que otros desarrollan comorbilidades metabólicas e isquémicas. En el Metahit existe evidencia de que algunas alteraciones en el microbioma definen a los individuos con perfiles de riesgo metabólico y contribuyen a resolver la heterogenicidad asociada con los fenotipos asociados a la adiposidad y resistencia a la insulina.³⁰

2.1.12.4 Efectos metabólicos del viroma

Existen factores de virulencia en las bacterias intestinales codificados por los bacteriófagos. En un estudio se compararon las partículas virales y los microbiomas de gemelos monocigóticos y los fagos mostraron genes involucrados en la síntesis anaeróbica de nucleótidos, así como en la síntesis y degradación de pared celular. Los bacteriófagos poseen genes que pueden alterar los receptores bacterianos y prevenir las infecciones. Muchos receptores pueden estar involucrados en el transporte y utilización de carbohidratos. En un ambiente intestinal en el que la utilización de carbohidratos es un factor importante para las bacterias, la movilización de estos genes por los fagos puede dotar a sus huéspedes bacterianas con beneficios.²⁰

2.1.12.5 El viroma y la inflamación

Los metabolitos de la microbiota contribuyen a la integridad de la barrera intestinal. Una barrera intestinal comprometida ocasiona una fuga de mediadores inflamatorios a la circulación sistémica.³

La asociación del microbioma en general con la inflamación se ha estudiado particularmente en síndrome de colon irritable. En un estudio reciente, se encontró que algunos marcadores de inflamación y disbiosis están incrementados en esta patología. El incremento en la disbiosis se asoció con un incremento en la calprotectina, un marcador de inflamación. También se observó que la disbiosis se revierte con el tiempo,

pero persiste después de que la actividad clínica de enfermedad cesa y la mucosa sana, lo cual puede representar un riesgo de recaída.⁵³

Los bacteriófagos se asocian con la inflamación mediante varios mecanismos. La lisis de bacterias a causa de los bacteriófagos libera proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que sirven como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y antígenos que desencadenan las cascadas de señalización inflamatoria, induciendo la liberación de citocinas, infiltración celular y daño tisular. Por otra parte, los bacteriofagos son capaces de inducir la respuesta inmune humoral. Además, estos virus son capaces de translocarse desde el lumen gastrointestinal a sitios sistémicos en animales. Todo esto contribuye a la perpetuación de enfermedades intestinales inflamatorias como el síndrome de colon irritable, en el cual se observa un incremento de la permeabilidad intestinal.²

Otra manera en que los bacteriófagos pueden desencadenar la respuesta inmune es mediante su adaptabilidad para unirse a materiales ambientales o a receptores de superficie de bacterias. En estudio metagenómico reciente, se examinaron partículas virales, se encontraron 51 locus con alta variabilidad y con tasas de mutación más altas que el resto de su genoma viral. Algunas tienen similitud con la superfamilia de proteínas Ig, otras con los dobleces tipo C de lectina, que juegan un papel clave en la unión a carbohidratos. Este locus confiere una ventaja para los fagos, aumentando las posibilidades de infectar a una célula huésped en las condiciones cambiantes del intestino.²⁰

2.1.13 Diabetes

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos (NOM-015).³³

2.1.13.1 Epidemiología de la diabetes

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia mundial de diabetes en adultos ha aumentado del 4.7% en 1980 al 8.5% en 2014. Esta prevalencia ha aumentado con mayor rapidez en los países de ingresos medianos y bajos. Se estima que, en 2015, la diabetes fue causa directa de 1.6 millones de muertes. De acuerdo con proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030.³⁴

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), en México, la proporción de adultos con diagnóstico de diabetes para el año 2012 fue de 9.2%, 4 millones de personas refirieron haber sido diagnosticadas con diabetes, lo que muestra un incremento importante en comparación con la proporción reportada en ENSA 2000 (5.8%).³⁵

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, reportó en 2010 a la diabetes como primera causa de defunciones por año, con más de 70 mil muertes en el país.³³

2.1.13.2 Diagnóstico de diabetes en humanos

Se establece diagnóstico de diabetes si se cumple con cualquiera de los siguientes criterios: presencia de síntomas clásicos y una glucemia plasmática casual ≥ 200 mg/dl; glucemia plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dl; o bien glucemia ≥ 200 mg/dl a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. En ausencia de síntomas inequívocos de hiperglucemia, estos criterios se deben confirmar repitiendo la prueba en un día diferente. Se define como intolerancia a la glucosa cuando los niveles de glucosa 2 horas post carga oral de 75 g de glucosa anhidra son ≥ 140 mg/dl e ≤ 199 mg/dl (NOM 015).³³

2.1.13.3 Diabetes tipo 2

La OMS define a la diabetes tipo 2 como no insulín dependiente o de inicio en la edad adulta que se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa la mayoría de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo

y a la inactividad física. Los síntomas suelen ser similares a los de la diabetes tipo 1, pero menos intensos. En general se diagnostica cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones. La NOM-015 define a la diabetes tipo 2 como el tipo de diabetes en la que se presenta resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en su producción puede ser absoluta o relativa. Los pacientes suelen ser mayores de 30 años cuando se realiza el diagnóstico, generalmente presentan obesidad y pocos síntomas clásicos.^{34, 33}

La diabetes tipo 2 representa un heterogéneo grupo de enfermedades caracterizado por una resistencia a la acción de la insulina en tejidos periféricos y un deterioro en la secreción de esta hormona en las células beta pancreáticas. Esta heterogeneidad de la diabetes tipo 2 se ve reflejada en la diversidad de modelos animales que son útiles para su estudio.³⁶

Aunque la diabetes tipo 2 es una patología con alta prevalencia mundial y en México, aún existen muchas incógnitas acerca de sus mecanismos patogénicos. El avance en la prevención y el tratamiento depende de la comprensión de estos mecanismos, por lo que es necesario utilizar modelos animales para realizar experimentos que éticamente no serían aceptables en humanos.³⁶

2.1.13.4 Dislipidemias en la diabetes tipo 2

Las personas con diabetes tipo 2 tienen un riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular de 2 a 4 veces superior al observado en la población general. La dislipidemia asociada a la diabetes tipo 2 se encuentra presente hasta en un 60% de las personas con diabetes y contribuye en gran medida al incremento de riesgo cardiovascular, morbilidad y mortalidad de los pacientes. La denominada dislipidemia diabética es una alteración del metabolismo lipídico que se caracteriza por un exceso de triglicéridos, un déficit de colesterol HDL y una alteración de la composición de las lipoproteínas que consiste en un exceso de partículas LDL pequeñas y densas. En el presente estudio se midieron los niveles séricos de triglicéridos y colesterol total de los ratones transferidos con el filtrado de heces procedentes de ratones diabéticos.⁶²

2.1.13.5 Modelos animales de diabetes tipo 2

La diabetes puede presentarse espontáneamente en los animales, siendo reconocida en mamíferos y puede ser inducida de manera experimental. El amplio espectro de la diabetes abre campo para desarrollar tantos modelos animales como posibilidades existen en su etiopatogenia. En algunos animales predomina la resistencia a la insulina y en otros la disfunción de las células beta pancreáticas.³⁶

2.1.13.5.1 Clasificación de los modelos animales de diabetes tipo 2

Se pueden clasificar los modelos animales de diabetes tipo 2 de acuerdo con su mecanismo de producción en modelos espontáneos e inducidos. Los modelos espontáneos incluyen modelos análogos (útiles como sustitutos de la enfermedad humana), modelos intrínsecos (cuya utilidad radica en responder preguntas específicas de la patología), dieta con alto contenido en grasas (30-45%), animales en los que se induce la diabetes por medio de cirugía, reduciendo el tamaño del páncreas y animales transgénicos, *knock-out*, los cuales carecen de algún gen que participa en el metabolismo de la glucosa y que como consecuencia, presentan diabetes.³⁷

Los modelos inducidos incluyen inducción hormonal, manipulación genética y administración de fármacos. El modelo animal desarrollado en el presente trabajo es un modelo inducido por administración del fármaco estreptozotocina.³⁶

2.1.13.5.2 Inducción de diabetes a través de administración de fármacos

Para la inducción de diabetes a partir de la administración de fármacos, se utilizan aloxano y estreptozotocina. El aloxano se utiliza para destrucción de las células beta pancreáticas, por lo que se asemeja a la diabetes tipo 1. En cambio, la estreptozotocina (STZ), es un derivado de la nitrosourea con actividad antibiótica y antineoplásica, por lo que es utilizado en la quimioterapia del cáncer.³⁶

El fármaco utilizado en el modelo desarrollado en el presente trabajo es STZ con una previa dosis protectora de nicotinamida (NAD). La STZ en altas dosis (100 mg/kg) induce insulino deficiencia, las células beta se destruyen, aunque aproximadamente la mitad se regenera gradualmente.³⁸

El modelo animal de diabetes tipo 2 inducida farmacológicamente con STZ y de NAD fue descrito por Maisello et. al. (1998). Este modelo es el más económico, fácil de establecer y el más utilizado para inducir diabetes.³⁷

La STZ induce diabetes tipo 2 en roedores, pues interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucocinasa, además induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del ADN. Su molécula consta de glucosa ligada a nitrosourea y es internalizada a través de los transportadores de glucosa, una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Las células beta pancreáticas son muy sensibles a la captación de glucosa, por lo que también resultan sensibles al efecto tóxico de la STZ; sin embargo, estas células se pueden proteger administrando NAD antes de la inducción. Algunas evidencias indican que la toxicidad de la STZ está mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre la célula beta, provocando un decremento en los niveles de NAD y adenina, disminuyendo su síntesis e incrementando su hidrólisis. La NAD protege a los animales contra la citotoxicidad de la STZ. Una única dosis importante de STZ puede inducir diabetes tipo 2 en roedores y varias dosis menores inducen diabetes tipo 1.^{36, 39}

2.1.13.5.3 Niveles de referencia de glucosa y lípidos en ratón

En un estudio realizado en Venezuela para describir el perfil bioquímico, se midió glucosa, proteínas totales, albúmina, globulinas, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL en ratones producidos en el bioterio central de la UCLA, en base a cepa, sexo y edad. El estudio se realizó en 720 animales de diferentes cepas y se determinaron valores de referencia basados en las medias obtenidas.⁴⁰

Para ratón hembra de la cepa C57, los niveles normales de glucosa son 104.86 mg/dl a las 6 semanas de edad, 84.80 mg/dl a las 9 semanas de edad y 111 mg/dl a las 14 semanas de edad. En cuanto a perfil de lípidos para la misma cepa, la media de triglicéridos séricos para la misma cepa fue de 134.34 mg/dl a las 6 semanas de edad, 137.18 mg/dl a las 9 semanas de edad y 128.47 mg/dl a las 14 semanas de edad. La media de colesterol total sérico fue de 66.01 mg/dl a las 6 semanas de edad, 69.36 mg/dl a las 9 semanas de edad y 79.57 mg/dl a las 14 semanas de edad. La media para los niveles séricos de HDL fue de 28.13 mg/dl a las 6 semanas de edad, 27.78 mg/dl a las 9 semanas de edad y 40.93 mg/dl a las 14 semanas de edad. Por último, la media

para los niveles séricos de LDL fue de 23.98 mg/dl a las 6 semanas de edad, 23.75 mg/dl a las 9 semanas de edad y 33.41 mg/dl a las 14 semanas de edad.⁴⁰

Se determinaron los niveles de referencia a través del cálculo de medias por sexo en la cepa C57. Para las hembras, la media de los niveles de glucosa fue de 113.71 mg/dl y para los machos de 97.6 mg/dl, la media de los niveles de triglicéridos fue de 166.33 mg/dl en las hembras y 149.9 mg/dl en los machos, la media de los niveles de colesterol total fue de 68.42 mg/dl en las hembras y de 75.7 mg/dl en los machos, la media del HDL fue de 30.4 mg/dl en las hembras y 34.7 mg/dl en los machos, por último, la media de LDL fue 25.5 mg/dl en las hembras y 29.7 mg/dl en los machos.⁴⁰

	Glucosa	Triglicéridos	Colesterol total	HDL	LDL
6 semanas	104.8	134.3	66.0	28.1	23.9
9 semanas	84.8	137.1	69.3	27.7	23.7
14 semanas	111.0	128.4	79.5	40.9	33.4

Tabla 1. Valores de glucosa (mg/dl) y perfil de lípidos (mg/dl) en ratones C57. Medias de acuerdo a la edad.⁴⁰

	Glucosa	Triglicéridos	Colesterol total	HDL	LDL
Machos	97.6	149.9	75.7	34.7	29.7
Hembras	113.7	116.3	68.4	30.4	25.5

Tabla 2. Valores de glucosa (mg/dl) y perfil de lípidos (mg/dl) en ratones C57. Medias de acuerdo con el sexo.⁴⁰

La identificación de metagenomas de la microbiota relacionados con la diabetes puede abrir nuevos caminos para entender y combatir esta condición, ya que son un buen elemento para el desarrollo del pronóstico y herramientas diagnósticas con relevancia clínica para esta patología.

2.1.13.6 Inflamación en diabetes

La inflamación es el conjunto de mecanismos de respuesta de los tejidos vivos a una agresión física, química, infecciosa o autoinmune, que localizan, aíslan y destruyen al agente agresor. En ella participan células del sistema inmune, células epiteliales, mediadores solubles como las citocinas y quimiocinas, receptores en células efectoras y activación del sistema de complemento. La inflamación actúa sinérgicamente con los mecanismos de la inmunidad innata y adquirida. En la inflamación aguda, los efectos son la vasodilatación, el aumento del flujo sanguíneo hacia la región, el aumento de la permeabilidad vascular y la migración de leucocitos, granulocitos y monocitos a través del endotelio vascular local en dirección a la zona inflamada.^{41, 42, 43}

El proceso de inflamación como parte del mecanismo de defensa inmune es normal y benéfico para el organismo. No obstante, bajo ciertas circunstancias se inicia sin una causa clara o se prolonga en forma innecesaria, produciendo daño tisular o manifestaciones clínicas importantes, incluso la muerte.⁴¹

La inflamación crónica, ha sido descrita en diversas enfermedades metabólicas no transmisibles, entre las cuales se incluye la diabetes tipo 2.⁴⁴

2.1.13.6.1 Mediadores de la inflamación

Son muchos y con diferentes funciones, producidos por las diferentes células del sistema inmune y por activación de sistemas enzimáticos. Los mediadores primarios son rápidamente secretados cuando se inicia un proceso inflamatorio. Los secundarios requieren un proceso de transcripción y traducción que tarda varias horas o días en desarrollarse.⁴¹

Dentro de los mediadores primarios se encuentran los producidos por los polimorfonucleares (PMN), células de la respuesta inmune innata (elastasa, colagenasa, lactoferrina, quimiocinas y catepsina G), por los mastocitos (histamina, heparina, IL-8, eotaxina, eicosanoides, adenosina y proteasa), por las plaquetas (PF-4, factores quimiotácticos para PMN y eosinófilos) y por las células endoteliales (IL-8 e IL-6). Dentro de los mediadores secundarios se encuentran los producidos por mastocitos (leucotrienos, prostaglandinas, metabolitos del O₂ y del N), los producidos por macrófagos (TNF, IL-1, IL-8, IL-12, prostaglandinas y leucotrienos), los producidos por

los hepatocitos (proteínas de fase aguda y PCR), los producidos por las células T activadas (IL-2, IL-5, IL-6, IFN γ , IL-17 e IL-23) y los producidos por los fibroblastos (IL-6).⁴¹

2.1.13.6.2 IL-6

Las citocinas son compuestos involucrados en la transmisión de señales entre las células del cuerpo con las células del sistema inmune en respuesta a un estímulo. En las fases iniciales las células de los tejidos en las que se está produciendo un daño, se desencadena la reacción inflamatoria y el sistema inmune comienza a producir citocinas como IL-1 e IL-6⁴².

La IL-6 es una glucoproteína constituida por 184 aminoácidos, es producida por los linfocitos, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células masangiales, astrocitos, estroma de la médula ósea y células tumorales. A nivel proteico, la IL-6 de ratón muestra 42% de homología con la humana. La IL-6 juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular, hematopoyesis e inflamación. Esta glucoproteína induce la maduración de las células B en anticuerpos plasmáticos y co-estimula el crecimiento de las células T y la diferenciación de las células T citotóxicas, incrementa la producción del receptor de IL-2 en las células T e induce la producción de IL-2. La IL-6 es el principal inductor de las reacciones de fase aguda en respuesta a la inflamación o a la lesión tisular, y en conjunto con IL-1 β , y TNF- α , induce la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos.^{45, 46}

2.1.13.6.2.1 IL-6 y diabetes tipo 2

A pesar de que las principales anomalías fisiológicas en la diabetes tipo 2 son la resistencia a la insulina y/o un defecto en su secreción, las determinantes específicas de estos defectos metabólicos no son claras. La evidencia sugiere que la inflamación juega un papel crucial en la patogénesis de la diabetes y se tiene una sustancial evidencia experimental de que la IL-6 es un marcador fisiológico de inflamación sistémica asociada con hiperglucemia, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.⁴⁵

En un estudio prospectivo de casos y controles se reveló que los niveles de IL-6 fueron significativamente mayores en mujeres con diabetes y el riesgo relativo para futura diabetes entre los cuartiles más altos contra los más bajos de IL-6 fue de 7.5, lo cual

sugiere que los niveles elevados de esta citocina están relacionados con el desarrollo de diabetes tipo 2.⁴⁵

2.1.13.7 Leptina en diabetes

Existen numerosos factores neuroendócrinos encargados de regular el metabolismo energético, como la leptina, una hormona producida por los adipocitos en relación a la masa del tejido adiposo y que actúa en el hipotálamo regulando la ingesta y el gasto de energía. En particular, esta hormona actúa en el núcleo arqueado, uniéndose a su receptor en neuronas que expresan neuropéptido-Y (NPY) y proteína R-agouti (AgRP) para inhibirlas. El NPY y la AgRP estimulan la ingesta y disminuyen el gasto de energía. Por otra parte, la leptina se une también a sus receptores en neuronas productoras de proopiomelanocortina (POMC) para activarlas. La POMC disminuye la ingesta y favorece la pérdida de peso. La leptina actúa también como marcador de las reservas energéticas del organismo, ya que sus niveles son directamente proporcionales al contenido de tejido graso; sin embargo, niveles altos de leptina se asocian con resistencia a esta hormona debido a un daño en la vía de señalización intracelular de la leptina y su receptor. La leptina interviene en el metabolismo de las grasas e hidratos de carbono. En un estudio se encontró que algunas variantes genéticas de la leptina se relacionan con la conducta alimentaria en niños.^{47, 48, 49}

2.2 Antecedentes específicos

2.2.1 La microbiota y la obesidad y la diabetes tipo 2

La información sobre la relación de la microbiota con la obesidad y la diabetes tipo 2 se centra principalmente en las poblaciones bacterianas o en la microbiota en general. Existe poca información sobre la relación de la microbiota con la diabetes tipo 2, no obstante, es importante mencionar algunos estudios, ya que el viroma es parte de la microbiota y es, además, un elemento regulador de la composición de la misma.

La hipótesis de que la microbiota intestinal podría actuar como un factor favorecedor de la adiposidad surgió a partir de las observaciones de Bäckhed y col. en 2004 de que los ratones sin microbiota intestinal, a pesar de consumir un 30% más de alimento que los

ratones convencionales de la misma edad y peso, tenían un 42% menos de grasa corporal.⁴⁴

La obesidad se asocia a cambios específicos del grupo de bacterias en la microbiota y también se correlaciona con una menor diversidad microbiana, lo cual se acompaña de mayor adiposidad, resistencia a la insulina y un fenotipo inflamatorio más pronunciado comparado con aquellos individuos que presentan una alta diversidad microbiana.^{26, 52}

La microbiota contribuye con el huésped a la fermentación de los sustratos energéticos no utilizados, a entrenar el sistema inmune, a prevenir el crecimiento de bacterias patógenas, al desarrollo del intestino, a la producción de vitaminas y de hormonas que regulan la saciedad.³

Es razonable asumir que la microbiota intestinal contribuye a la ganancia de peso, ya que promueve el incremento de la absorción de monosacáridos y el almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos del huésped y juega un papel importante en el procesamiento de polisacáridos provenientes de la dieta.⁵⁵

Se han asociado cambios en la microbiota con la presentación de un fenotipo de obesidad, particularmente un incremento de la relación *Firmicutes: Bacteroidetes* en individuos con obesidad comparados con individuos delgados.⁵⁵

En un estudio, ratones tratados con antibióticos se inocularon con el contenido fecal procedente de ratones con obesidad y de ratones delgados. Se encontraron diferencias entre la microbiota de los ratones inoculados con el contenido de las heces de ratones con obesidad y de ratones delgados. También se encontró una menor abundancia de bacteroidetes y una alta abundancia de *B. Fragilis* y *Enterobacteriaceae* en la microbiota de ratones con obesidad. Asimismo, la ganancia de peso y el consumo de alimento fue mayor en los ratones inoculados con la microbiota de ratones con obesidad.⁵⁵

Observaciones recientes mostraron cómo criar ratones inoculados con microbiota de ratones delgados previno el desarrollo de un IMC incrementado y de fenotipos metabólicos relacionados con la obesidad, en ratones inoculados con microbiota de ratones con obesidad en la misma caja, esto deriva de que los ratones son animales coprofágicos y la microbiota puede transmitirse vía fecal.⁵⁶

2.2.3 La microbiota y el síndrome metabólico

En un estudio se compararon sujetos con alta y baja diversidad en la microbiota intestinal. El fenotipo adiposo de individuos con poca variabilidad en la microbiota fue asociado con niveles elevados de leptina, niveles bajos de adiponectina, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, niveles incrementados de triglicéridos y ácidos grasos libres, niveles bajos de HDL colesterol y un genotipo inflamatorio más marcado (niveles incrementados de PCR y de conteo de células blancas). Esto sugiere que se requiere diversidad funcional para contribuir al metabolismo del huésped por medio de la microbiota, para mejorar las condiciones de salud.³

En un estudio se compara la microbiota intestinal distal de ratones genéticamente obesos con sus compañeros de camada delgados y se observó un aumento en la concentración relativa de *Firmicutes* y una reducción de *Bacteroidetes* asociado a la obesidad. En otro estudio se encontró una correlación positiva entre un incremento en la relación *Firmicutes*: *Bacteroidetes* con los niveles plasmáticos de glucosa.^{26, 55}

Recientemente, se estudiaron ratones tratados con antibióticos inoculados con el contenido fecal procedente de ratones con obesidad y de ratones delgados. Se halló que los ratones receptores de microbiota de ratones con obesidad mostraron una respuesta incrementada de las células beta pancreáticas a la glucosa. En el mismo estudio, ratones en etapa de destete mostraron niveles de insulina incrementados después de la inoculación con microbiota de ratones con obesidad.⁵⁵

Recientemente, se concluyó que la elevación en el músculo esquelético de acylcarnitinas de cadena larga está asociada con intolerancia a la glucosa en ratones inoculados con microbiota de ratones con obesidad y que consumían una dieta baja en grasa saturada y alta en frutas y verduras.⁵⁶

2.2.4 Trasplante de microbiota fecal (TMF)

El proceso de transferencia de heces de donadores sanos a enfermos, conocido como trasplante de microbiota fecal, tiene antecedentes históricos que datan del siglo IV, ya que se realizaba en china para tratar a pacientes envenenados oralmente o que padecían diarrea. Recientemente, investigadores comenzaron a realizar estudios

basados en la evidencia sobre sus efectos y aplicaciones. El conocimiento del microbioma, el concepto de disbiosis y los resultados de estudios preliminares sugieren que existe una asociación entre la alteración de la microbiota intestinal y ciertas patologías, se han hecho estudios sobre su aplicación en infección recurrente por *clostridium difficile* (IRCD), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome de intestino irritable (SII) y obesidad.⁵³

El TMF ha considerado como opción terapéutica genuina por su simpleza y su costo-efectividad en las patologías mencionadas y en otras condiciones como síndrome metabólico y resistencia a la insulina. Un ensayo pequeño, aleatorizado, doble ciego reveló que un TMF utilizando heces de donadores delgados, mejoraba la sensibilidad a la insulina en hombres con obesidad.⁵⁷

En un estudio realizado por Pinn et al. se analizaron a 13 pacientes con SII, de los cuales 70% presentaron mejoría en los síntomas como dolor abdominal, hábitos intestinales, dispepsia, distensión, flatulencias y calidad de vida después del TMF.⁶²

El TMF resulta más efectivo que el tratamiento con vancomicina en pacientes IRCD, presentándose la curación en un 90% de los casos.⁵⁸

Algunas alteraciones en la microbiota intestinal están asociadas con la obesidad y la resistencia a la insulina. En un ensayo clínico aleatorizado se estudiaron los efectos de un TMF de donadores delgados a hombres con síndrome metabólico en la composición de la microbiota y en el metabolismo de la glucosa. Seis semanas después del procedimiento, la sensibilidad a la insulina de los receptores incrementó junto con las especies de bacterias productoras de butirato en su microbiota.⁵⁹

No existe actualmente un consenso sobre la mejor ruta de administración, se ha probado por medio de enemas, sondas nasogástricas y colonoscopia, teniendo resultados muy variables, ya que la viabilidad de las bacterias varía en cada procedimiento.⁵³

En cuanto a la seguridad de un TMF, parece ser que es un procedimiento inocuo y bien tolerado. Los efectos adversos más reportados incluyen diarrea, dolor abdominal y espasmos en el día de la infusión, lo cual se resuelve en pocas horas. Otros síntomas

reportados son fatiga, distensión abdominal, náuseas, incomodidad rectal y cefaleas. No se han observado complicaciones infecciosas.⁵³

De la misma manera en que el TMF se ha explorado por sus utilidades terapéuticas, también se sabe que el TMF de un donador con ciertas enfermedades puede transmitir potencialmente la enfermedad a sus receptores.⁵³

En un estudio prospectivo, se siguieron a 77 pacientes sometidos a TMF para resolver IRCD tres meses antes. Aunque los síntomas de la IRCD se resolvieron, cuatro pacientes reportaron una nueva condición médica como neuropatías periféricas, púrpura trombocitopénica y artritis reumatoide. Se necesitan estudios de largo plazo para identificar los efectos adversos potenciales del TMF, que podrían tener un impacto en la selección de los donadores.^{53, 60}

3. Justificación

La disbiosis intestinal, ha sido asociada a diversas enfermedades crónicas como la obesidad, enfermedades metabólicas, gastrointestinales y neurológicas, sin embargo, estos estudios se han enfocado principalmente en determinar la composición de los filos bacterianos, elementos más abundantes en la microbiota intestinal.

En la actualidad, gracias a los estudios de metagenómica, se conoce que existen una gran cantidad de genes virales presentes en el microbioma intestinal, muchos de ellos son bacteriófagos, virus capaces de infectar bacterias y controlar las poblaciones bacterianas. Por esta razón resulta necesario implementar estudios que incluyan al viroma para determinar su relevancia en el establecimiento de la disbiosis y por tanto en el mantenimiento y desarrollo de las enfermedades. Así mismo, existen una gran cantidad de virus eucariotes que podrían estar participando en la inducción de inflamación a nivel intestinal alterando el sistema inmune y contribuyendo de manera indirecta en la disbiosis. Sin embargo, poco se sabe acerca de su contribución a la disbiosis en diabetes tipo 2.

Además de los bacteriófagos, existen factores poco controlables a nivel poblacional que pueden modificar la composición bacteriana de la microbiota como lo son el medio ambiente, la dieta y el uso de antibióticos. Por otra parte, existen elementos reguladores

intrínsecos a cada individuo como lo son la genética, el sistema inmune a través de la producción de IgA, el sexo y el estado nutricional y de salud.

Debido a la complejidad del estudio de los factores que intervienen en la disbiosis, en el presente trabajo se utiliza el modelo murino para evaluar la participación del viroma en la disbiosis intestinal que se presenta en la diabetes tipo 2. Este modelo permite la colonización de microbiota de ratón con diabetes tipo 2 inducida por fármaco a otros ratones sanos mediante una transferencia fecal, permitiendo evaluar de forma más específica la participación de la fracción no bacteriana (viroma) de ratones con diabetes tipo 2 en ratones con una microbiota normal, eliminando variantes como la dieta, sexo, edad, medio ambiente y genética, ya que se utilizan ratones singénicos, libres de patógenos específicos y bajo las mismas condiciones de biorritmo y alimentación.

Una de las principales ventajas del modelo murino es que es posible evaluar de manera precisa la diabetes tipo 2, analizando marcadores séricos del metabolismo y sistema inmune. Los modelos animales de diabetes como el de ratón permiten realizar experimentación que éticamente sería inaceptable en humanos, para entender los mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo de dicha patología.

Un análisis del viroma como elemento que compone a la microbiota permite el entendimiento de interacciones moleculares entre los microorganismos y su rol en la salud y la enfermedad, en este caso, en la diabetes tipo 2. Los mecanismos implicados pueden ser explorados posteriormente como metas terapéuticas para tratar enfermedades relacionadas con una disbiosis del microbioma, como la diabetes tipo 2 y otras enfermedades como la obesidad, síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes y cáncer. En un proyecto posterior, se analizará mediante metasecuenciación, la composición del viroma intestinal de pacientes con obesidad, síndrome metabólico y/o enfermedad inflamatoria intestinal y evaluaremos su participación mediante la transferencia de partículas virales aisladas de muestra de heces de pacientes, en la generación de disbiosis y en el desarrollo y mantenimiento de estos padecimientos en un modelo murino, resultando ser uno de los primeros estudios a nivel funcional que involucra la participación de los virus como agentes etiológicos de estos padecimientos, o bien, como agentes generadores de la disbiosis.

5. Definición del problema (planteamiento del problema)

Se ha observado que la microbiota intestinal humana es diferente en personas sanas y en personas con diabetes tipo 2, presentándose una disbiosis en este padecimiento.

También, se ha observado, mediante análisis de la composición de la microbiota y de indicadores bioquímicos, que la población que presenta disbiosis tiene mayor riesgo metabólico y algunos marcadores de inflamación elevados.

La información sobre la relación de la microbiota con la diabetes tipo 2 se centra en las poblaciones bacterianas. Actualmente, la información sobre la asociación del viroma con esta patología es escasa, por lo que resulta necesario establecer su participación dentro de ambientes complejos como lo es la microbiota intestinal en la etiología y desarrollo de las enfermedades.

6. Pregunta de investigación

La disbiosis se asocia al desarrollo de enfermedades metabólicas no infecciosas y los virus, principalmente los bacteriófagos, son un elemento regulador importante de la composición de la microbiota intestinal, fundamento elemental para plantear la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el grado de participación del viroma intestinal de ratones con diabetes tipo 2 transferido a ratones sanos en el desarrollo de diabetes tipo 2?

6. Hipótesis de estudio

6.1 Hipótesis alterna (H_a)

Existe una asociación entre el viroma intestinal y la diabetes tipo 2. El viroma de ratones con este padecimiento transferido a ratones sanos inducirá una disbiosis y el desarrollo de diabetes tipo 2.

6.2 Hipótesis nula (H_0)

No existe una asociación entre el viroma intestinal y la diabetes tipo 2. El viroma de ratones con este padecimiento transferido a ratones sanos no inducirá el desarrollo de diabetes tipo 2.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Determinar el grado de asociación del viroma intestinal de ratones con diabetes tipo 2 transferido a ratones sanos en el desarrollo y mantenimiento de diabetes tipo 2.

7.2 Objetivos particulares (o específicos).

1. Inducir el desarrollo de diabetes tipo 2 a ratones mediante la administración de nicotinamida, estreptozotocina y citrato de sodio.
2. Establecer las condiciones para la transferencia de microbiota y viroma de ratones con diabetes tipo 2 a ratones sanos.
3. Evaluar el desarrollo de diabetes tipo 2 en los ratones transferidos con microbiota y viroma de ratones con diabetes tipo 2, mediante la medición de glucosa en ayuno, colesterol total, triglicéridos, IL-6 y leptina.

8. Metodología

8.1 Tipo y diseño del proyecto

8.1.1 Tipo de estudio

El estudio es exploratorio, ya que se estudia un tema de investigación poco abordado, del cual se encontraron escasos estudios en la revisión de la literatura y tiene como objetivo lograr una mayor penetración y comprensión del problema. La investigación incluye amplia revisión de literatura y consulta con profesionales especializados en el tema.

Clínicamente tiene semejanzas con estudios de casos y controles, ya que los ratones se dividieron en grupos controles y experimentales que incluyeron ratones transferidos con microbiota de ratones sanos, ratones transferidos con viroma de ratones sanos,

ratones transferidos con microbiota de diabetes tipo 2 y ratones transferidos con viroma de diabetes tipo 2.

8.1.2 Características del estudio (Taxonomía de Feinstein)

Por su objetivo	Comparativa: de causa-efecto
Por tipo de agente de investigación	Maniobras de causa-efecto
Por asignación del agente	Experimental
Por su dirección en el tiempo	Prospectivo
Por el número de mediciones	Longitudinal
Por los componentes de los grupos	Homodémicos

8.2 Definición del universo de trabajo

8.2.1 Población fuente

Ratones de la cepa C57/B6 y ratones CD1.

8.2.2 Población elegible

Ratones de 6 semanas de edad, hembras, de la cepa C57/B6, libres de patógenos específicos.

8.3 Definición de unidades de observación y grupo control

El grupo control fueron ratones trasplantados con microbiota de ratones sanos y transferidos con viroma de ratones sanos.

Se utilizaron los ratones inducidos por fármaco con diabetes tipo 2 como controles positivos para su comparación con los ratones transferidos con el viroma de estos ratones diabéticos.

8.3.1 Criterios de Inclusión

Ratones de 6 semanas de edad, hembras, de la cepa C57/B6, libres de patógenos específicos.

8.3.2 Criterios de Exclusión

No aplica

8.3.3 Criterios de Eliminación

Ratones que presenten enfermedades y/o comportamientos ajenos al experimento. Por ejemplo, agresividad, preñez, tumores, etc.

8.4 Estrategia de muestreo

8.4.1 Tamaño de la Muestra (cálculo)

N= 5. Número establecido ya para la experimentación con ratones, apegado a la Normatividad en Bioética que indica usar el número mínimo de animales para experimentación, el cual es un número representativo para el diseño del presente proyecto.

Se utilizó la fórmula para el cálculo de la muestra en base a incidencias seriadas en los procedimientos (Rojo, 2014)

$$X = N / ((A/100) * (B/100) * (C/100) \dots)$$

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual se debe partir.
N= Número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos en el proyecto.

A= 100 -% de incidencia 1

B= 100 -% de incidencia 2

C= 100 -% de incidencia 3, y así sucesivamente.

- Aplicada al proyecto:

$$N = 5$$

$$A = 100 - 20\% = 80 \quad B = 100 - 20\% = 80 \quad C = 100 - 10\% = 90$$

$$X = 5 / [(80/100) * (80/100) * (90/100)] = 9.7, \text{ que equivale a } 10 \text{ ratones por grupo experimental.}$$

Número de grupos experimentales: 2

$$2 * 10 = 20 \text{ ratones}$$

$$X = 20 \text{ ratones}$$

8.4.2 Tipo de Muestreo

Muestreo sistemático.

8.5 Definición de variables y escalas de medición

8.5.1 Definición conceptual de variables

Viroma intestinal: Filtrado por 0.022 micrómetros obtenido de homogeneizado de heces fecales. Parte no bacteriana de las heces fecales de ratones.

Peso: es la medida de la masa corporal total, expresada en gramos.⁷⁸

Niveles de glucosa en sangre: medida estática de la glucosa, la cual es un monosacárido con fórmula $C_6H_{12}O_6$, es una hexosa, es decir, que contiene seis átomos de carbono y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula.⁶⁸

Niveles de IL-6 en suero: medida de IL-6 libre en suero sanguíneo, la cual es una citocina proinflamatoria, producida por los linfocitos, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células masangiales, astrocitos, estroma de la médula ósea y células tumorales. Juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular, hematopoyesis e inflamación.^{76, 77}

Niveles de leptina en suero: medida de leptina en suero sanguíneo, la cual es una proteína y hormona producida por los adipocitos en relación a la masa del tejido adiposo y que actúa en el hipotálamo regulando la ingesta y el gasto de energía.^{54, 55}

Niveles de triglicéridos en suero: medida estática de los triglicéridos en suero sanguíneo, estos son la forma principal en la cual se almacenan y transportan los ácidos grasos en los animales, consiste en tres cadenas de ácidos grasos esterificadas a una molécula de glicerol.⁷⁹

Niveles de colesterol en suero: medida estática del colesterol en suero sanguíneo, éste es un lípido que contiene una estructura de cuatro anillos esteroideos con un grupo hidroxilo en uno de ellos, es componente de muchas membranas eucariontes y el precursor de las hormonas esteroideas, los ácidos biliares y la vitamina D.⁸⁰

8.5.2 Cuadro de operacionalización de variables

Variable	Tipo de variable por naturaleza y escala de medición		Definición operacional	Escala de medición	Indicadores
Viroma intestinal	Independiente	Cualitativa Nominal	Filtrado obtenido de homogeneizado de heces fecales.	Nominal	Categorías: presencia o ausencia Dosis de transferencia de filtrado de sobrenadante: 100 mcl
Peso	Dependiente	Cuantitativa continua	Balanza	Intervalos	Unidades de medición: gramos
Niveles de glucosa en sangre	Dependiente	Cuantitativa discreta	Cuantificación por medio de glucómetro One Touch Mini.	Intervalos	Unidades de medición: mg/dl
Niveles de IL-6 en suero	Dependiente	Cuantitativa continua	Prueba de ELISA	Intervalos	Unidades de medición: pg/ml
Niveles de leptina en suero	Dependiente	Cuantitativa continua	Prueba de ELISA	Intervalos	Unidades de medición: ng/ml
Niveles de triglicéridos en suero	Dependiente	Cuantitativa continua	Espectofotometría	Intervalos	Unidades de medición: mg/dl
Niveles de colesterol en suero	Dependiente	Cuantitativa continua	Espectofotometría	Intervalos	Unidades de medición: mg/dl

8.6 Estrategia experimental y procedimientos

Se hicieron 4 grupos de 5 ratones, los cuales fueron marcados mediante perforación en la oreja y puestos en contenedores de policarbonato esterilizables con agua y comida ad libitum, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

Antes de cada medición, los ratones fueron sometidos 4 horas de ayuno retirando únicamente el alimento.

8.6.1 Toma de peso y muestras de sangre iniciales

Los ratones fueron pesados utilizando una báscula Scout Pro y un recipiente para contener al ratón. La báscula fue tarada para quedar en cero con el recipiente. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas mediante una punción en la cola y colectadas en tubos Eppendorf, sin anticoagulante, aproximadamente 200 microlitros de sangre total, posteriormente fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 5 min. El suero obtenido (aproximadamente 50 microlitros) fue colectado utilizando una micropipeta Thermo Scientific. Los sueros fueron rotulados y almacenados a -20°C hasta su análisis. Durante la toma de la muestra, se tomaron glucosas iniciales mediante un glucómetro One Touch Ultra Mini, antes de realizar la inducción de diabetes y el trasplante de viroma y microbiota. Se almacenó más sangre para posterior análisis de perfil de lípidos (colesterol, triglicéridos, HDL y LDL), IL-6 y leptina, de manera inicial y postransferencia de microbiota y viroma.

Este procedimiento se repitió en la tercera semana después de la transferencia de microbiota y viroma para posterior análisis.

8.6.2 Inducción de diabetes con estreptozotocina

Se indujo diabetes tipo 2 a cinco ratones de la cepa CD1, machos, de 8 semanas de edad. Los ratones se encontraban con 8 horas de ayuno.

La inducción de diabetes tipo 2 se realizó por medio de una inyección intraperitoneal de 40 mg/kg de nicotinamida diluída en 100 mcl de agua inyectable 15 minutos antes de la inyección de estreptozotocina para proteger a las células beta pancreáticas y 100 mg/kg de estreptozotocina diluída en 100 mcl de citrato de sodio a un pH de 4.5 con 0.05 M, en una única dosis. Para ello, se utilizó una jeringa de insulina.

El promedio de peso para los 5 ratones fue de 35 g, por lo que se realizaron reglas de tres para calcular la dosis individual de nicotinamida y estreptozotocina.

- Dosis individual de nicotinamida: 1.4 mg/100 mcl
- Dosis individual de estreptozotocina: 3.5 mg/100 mcl

Posteriormente se calculó la dosis para 10 ratones:

- Dosis para 10 ratones de nicotinamida: 14 mg/1 ml
- Dosis para 10 ratones de estreptozotocina: 35 mg/ 1 ml

Para el pesaje del medicamento se utilizó una balanza de precisión Ohaus Adventurer.

Tres días después, se realizaron pruebas de glucosa en ayuno para confirmar diabetes en los 5 ratones obteniendo los siguientes resultados:

Ratón	Glucosa con 8 horas de ayuno
1	372 mg/dL
2	134 mg/dL
3	339 mg/dL
4	451 mg/dL
5	113 mg/dL

Tabla 3. Niveles de glucosa sanguínea en ayuno de ratones diabéticos inducidos con STZ.

8.6.3 Colecta de heces fecales de ratón diabético y ratón sano.

Se realizó colecta de heces de los 5 ratones diabéticos por 3 días y de 20 ratones sanos por 1 día utilizando tubos Falcon de 15 ml.

Se colectaron 4 tubos Falcon de 5 gr de heces de ratón con diabetes y sanos, obteniendo aproximadamente 3 ml de heces por tubo y se les añadió el doble de volumen de glicerol al 20%, obteniendo 6 ml por tubo.

Las muestras fueron colocadas en congelación a -20°C, para su posterior utilización.

8.6.4 Homogeneización de la mezcla

Posteriormente se realizó la descongelación y homogeneización de los tubos con heces fecales y glicerol por medio un vortex, los tubos fueron colocados en posición vertical en refrigeración a 4°C por 24 horas para obtener un precipitado de heces y un sobrenadante, mismo que contiene a a las partículas virales que fueron utilizadas para su inoculación en ratones sanos.

Para acelerar el procedimiento de precipitación y obtención de sobrenadante, se diluyeron las muestras de heces y glicerol al 20% homogeneizadas en cloruro de sodio, se trasladaron del tubo Falcon de 15 ml mediante una pipeta Thermo Scientific y puntas de 1 ml a tubos Eppendorf, quedando una silución 1:5 con glicerol al 20% estéril. Se realizó entonces una centrifugación por separado de las muestras de ratón diabético y de ratón sano, utilizando una centrífuga Pro Research a 2500 rpm durante 10 minutos, obteniendo el precipitado y el sobrenadante con las partículas virales.

8.6.5 Filtración del sobrenadante

El sobrenadante obtenido del procedimiento anterior fue filtrado utilizando un filtro de jeringa de 0.020 micras de nitrocelulosa (Corning) colectando el filtrado en un tubo Falcon de 50 ml. Se obtuvieron 3 ml de filtrado. Con este procedimiento se eliminaron bacterias, esporas y partículas con tamaño superior a los poros del filtro, la mayoría de las partículas virales pueden filtrarse, ya que su tamaño oscila entre los 10 y los 600 nm.

8.6.6 Almacenamiento de heces para secuenciación

Se realizó una colecta inicial de heces de los ratones experimentales de la caja 1, 2, 3 y 4 para posterior secuenciación en otro estudio.

Se utilizó 1 tubo Falcon de 15 ml para almacenar las heces de los ratones de cada caja, se agregaron 5 ml de RNA later a cada uno y se colocaron en congelación a -20°C.

8.6.7 Transferencia de sobrenadante con viroma y heces con microbiota a ratones experimentales

La transferencia de viroma y microbiota se realizó a los ratones hembras de 6 semanas de edad de la de la cepa C57/B6. Se hicieron 4 grupos con 5 ratones cada uno. Los

grupos experimentales se organizaron de la siguiente manera: 5 ratones transferidos con filtrado de homogeneizado de heces de ratones sanos (caja 1), 5 ratones transferidos con homogeneizado de heces de ratones sanos (caja2), 5 ratones transferidos con filtrado de homogeneizado de heces de ratones con diabetes (caja 3) 5 ratones transferidos con homogeneizado de heces de ratones con diabetes (caja 4), quedando organizados los grupos como se muestra en la Tabla 4.

La transferencia se llevó a cabo vía oral, previa administración de 100 microlitros de bicarbonato de sodio al 1.33%. Posteriormente se utilizó una cánula gástrica desechable, la cual fue introducida a nivel del esófago del ratón para realizar la transferencia. Se transfirieron 100 mcl de filtrado con viroma sano a 5 ratones (caja 1), 100 mcl de heces con microbiota sana a 5 ratones (caja 2), 100 mcl de filtrado con viroma de diabetes a 5 ratones (caja 3) y 100 mcl de heces con microbiota de diabetes a 5 ratones (caja 4), tal como se muestra en la siguiente tabla.

Número de caja	Número de ratones	Elemento transferido
Caja 1	5	Viroma sano
Caja 2	5	Microbiota sana
Caja 3	5	Viroma de diabetes
Caja 4	5	Microbiota de diabetes

Tabla 4. Elementos transferidos a los ratones en las diferentes cajas y número de ratones por caja.

Se repitió el procedimiento tres días después, realizando una segunda transferencia de viroma y microbiota como corresponde de acuerdo a los grupos.

8.6.8 Toma de muestras de sangre

Se realizaron tomas de muestras de sangre periférica mediante una punción en la cola de los ratones en los días 7, 14, 21 y 28 posteriores a la transferencia de microbiota y viroma intestinal de ratones con diabetes tipo 2 para realizar medición de glucosa. Para

el perfil de lípidos (colesterol y triglicéridos), IL-6 y leptina, se tomaron muestras de sangre en los días 7, 21 y 36.

Las muestras de suero de los días 7, 21 y 36 fueron almacenadas en tubos Eppendorf, se almacenaron en congelación a -20°C para su posterior análisis.

8.6.9 Medición de glucosa en ayuno

Se tomaron mediciones de glucosa en ayuno a los cuatro grupo de ratones utilizando un glucómetro y tiras reactivas One Touch Mini. La muestra de sangre se tomó a partir de la cola del ratón con 4 horas de ayuno. Se realizaron un total de cinco mediciones, la primera de manera inicial antes de la transferencia de microbiota o viroma intestinales, posterior a la transferencia se realizaron mediciones a los 7, 14, 21 y 28 días post transferencia.

8.6.10 Determinación cuantitativa de IL- 6

Se determinó IL- 6 mediante un ELISA de captura tipo sándwich para determinación cuantitativa, se utilizó el kit de Affimetrix, placas para ELISA de alta adherencia de Corning, siguiendo las especificaciones del fabricante. La determinación se realizó al día 0, día 7 y 21 posteriores a las transferencias. Para este ensayo se realizaron pools de sueros.

El ELISA tipo sándwich para determinación cuantitativa de IL-6 de ratón está diseñada para medir la cantidad de esta sustancia unida entre dos pares de anticuerpos.

Para realizar la curva del control positivo, se hizo una dilución en base dos de la concentración máxima del estándar (500 pg/ml). Se prepararon 20 mcl de anticuerpo de captura anti IL-6 de ratón en 5 ml de PBS, para obtener una dilución 1:250, se cargaron 100 mcl por pozo y se incubó la placa a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron tres lavados con el buffer de lavado (PBS-Tween), se bloqueó con 200 ml de buffer diluyente proporcionado en el kit y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después se aspiró el contenido y se añadieron en los pocillos correspondientes 100 mcl de suero diluido 1:100 por duplicado de controles y muestras objetivo, mismas que se unieron con el anticuerpo de captura inmóvil durante una incubación de 2 horas a

temperatura ambiente. El sándwich se formó por medio de la adición de 100 mcl del segundo anticuerpo biotinilado, o anticuerpo de detección, que se unió a la muestra objetivo en un sitio de unión diferente durante una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, después se realizaron cuatro lavados la solución de lavado. Se agregaron 100 mcl de avidina-HRP (enzima peroxidasa) (1 microgramo por ml) que se unió a la biotina del anticuerpo de detección, se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados con el detergente preparado, con un minuto de separación entre cada lavado. Después, se añadieron 100 mcl de sustrato TMB 1x (Sigma-Aldrich) y la placa se incubó por 30 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Después de la incubación, el sustrato y el complejo enzima-anticuerpo objetivo reaccionaron para producir una señal de color medible. Esta reacción fue parada con 50 mcl de ácido sulfúrico a los 30 minutos. La intensidad de la señal de color es directamente proporcional a la concentración de la IL-6 presente en la muestra. La lectura se realizó a 405 nm.

8.6.11 Determinación cuantitativa de leptina

Se determinó leptina por medio de un ELISA de captura, se utilizó el kit de PeproTech y placas para ELISA de alta adherencia, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para realizar la curva del control positivo, se hizo una dilución en base diez de la concentración máxima del estándar (1.25 ng/ml). Se prepararon 20 mcl de anticuerpo de captura anti leptina de ratón en 5 ml de PBS, para obtener una dilución 1:250, se cargaron 100 mcl por pozo y se almacenó la placa a 4°C por 24 horas. Se realizaron cuatro lavados con 300 mcl el buffer de lavado preparado, se añadieron 300 mcl por pozo de buffer de bloqueo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se aspiró el contenido y se lavó la placa 4 veces. Se añadieron 100 mcl por pozo en duplicado de los controles y muestras objetivo, mismos que se unieron con el anticuerpo de captura inmóvil durante una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. El sándwich se formó por medio de la adición de 100 mcl del segundo anticuerpo biotinilado, o anticuerpo de detección, que se enlazó a la muestra objetivo en un sitio de unión diferente durante una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados, se agregaron 100 mcl de avidina-HRP

(enzima peroxidasa) que se unió a la biotina del anticuerpo de detección, se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados con el detergente preparado, con un minuto de separación entre cada lavado. Después, se añadieron 100 mcl de sustrato ABTS, proporcionado por el kit, y la placa se incubó por 30 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Después de la incubación, el sustrato y el complejo enzima-avidina-anticuerpo de detección objetivo reaccionaron para producir una señal colorimétrica. Esta reacción fue parada con 50 mcl de ácido sulfúrico a los 30 minutos. La intensidad de la señal de color es directamente proporcional a la concentración de leptina presente en la muestra. La lectura se realizó a 405 nm.

8.6.12 Determinación cuantitativa de triglicéridos

La determinación cuantitativa de triglicéridos se realizó en tres tiempos por medio de espectofotometría. Se utilizó el kit Triglicéridos–LQ y un espectofotómetro de Spinreact. La primera medición se realizó de manera inicial antes de la transferencia de microbiota o viroma, posterior a la transferencia se realizaron mediciones el día 7, 21 y 36. Las muestras se obtuvieron a partir del suero de la sangre periférica de los cuatro grupos de ratones (ratones transferidos con viroma sano, ratones transferidos con viroma de diabetes, ratones transferidos con microbiota sana y ratones transferidos con microbiota de diabetes). Se realizó un pool para cada grupo de ratones. Al final se obtuvieron 16 pools y 1 muestra del ratón control (diabético inducido por fármaco).

8.5.12.1 Método para determinación cuantitativa de triglicéridos

El principio del método se basa en que los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por la glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno por GPO. Al final, el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra.

Se colocaron 19 tubos en una gradilla, uno para el blanco de reactivo (control negativo), uno para el PACAL (control positivo), 16 tubos para las muestras y uno para la muestra del ratón control. Se agregaron en todos los tubos 600 mcl de reactivo, conformado por GOOD pH 6.3, p-clorofenol, LPL, GK, GPO, POD, 4-AF y ATP, posteriormente se agregaron 6 mcl de pacal o agua para el blanco de reactivo y el control positivo, y 6 mcl de muestras en los demás tubos. Se dejó incubar por 20 min y se comenzó con la lectura en el espectofotómetro a 505 nm.

8.6.13 Determinación cuantitativa de colesterol

La determinación cuantitativa de colesterol se realizó en tres tiempos por medio de espectofotometría. Se utilizó el kit Colesterol-LQ y un espectofotómetro de Spinreact. La primera medición se realizó de manera inicial antes de la transferencia de microbiota o viroma, posterior a la transferencia se realizaron mediciones el día 7, 21 y 36. Las muestras se obtuvieron a partir del suero de la sangre de los cuatro grupos de ratones (ratones transferidos con viroma sano, ratones transferidos con viroma de diabetes, ratones transferidos con microbiota sana y ratones transferidos con microbiota de diabetes). Se realizó un pool para cada grupo de ratones. Al final se obtuvieron 16 pools y 1 muestra del ratón control (diabético inducido por fármaco).

8.6.13.1 Método para determinación cuantitativa de colesterol

El principio del método para determinación cuantitativa de colesterol se basa en que el colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado de acuerdo a un conjunto de reacciones. Estas reacciones comienzan cuando los ésteres de colesterol en presencia de agua y de la enzima colesterol esterasa (CHE) producen colesterol y ácidos grasos, este colesterol en presencia de oxígeno produce 4-colestenona y peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por la enzima colesterol oxidasa (CHOD). Dos moléculas de peróxido de hidrógeno con fenol y 4-aminofenazona (4-AF) producen quinonimina y agua en una reacción catalizada por una enzima peroxidasa. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

Se colocaron 19 tubos en una gradilla, uno para el blanco de reactivo (control negativo), uno para el PACAL (control positivo), 16 tubos para las muestras y uno para la muestra del ratón control. Se agregaron en todos los tubos 600 mcl de reactivo, conformado por PIPES pH 6.9, fenol, CHE, CHOD, POD y 4-AF. Posteriormente se agregaron 6 mcl de pacal o agua para el blanco de reactivo y el control positivo, y 6 mcl de muestras en los demás tubos. Se dejó incubar por 20 min y se comenzó con la lectura en el espectofotómetro a 505 nm.

8.7 Diagrama de flujo de la estrategia general

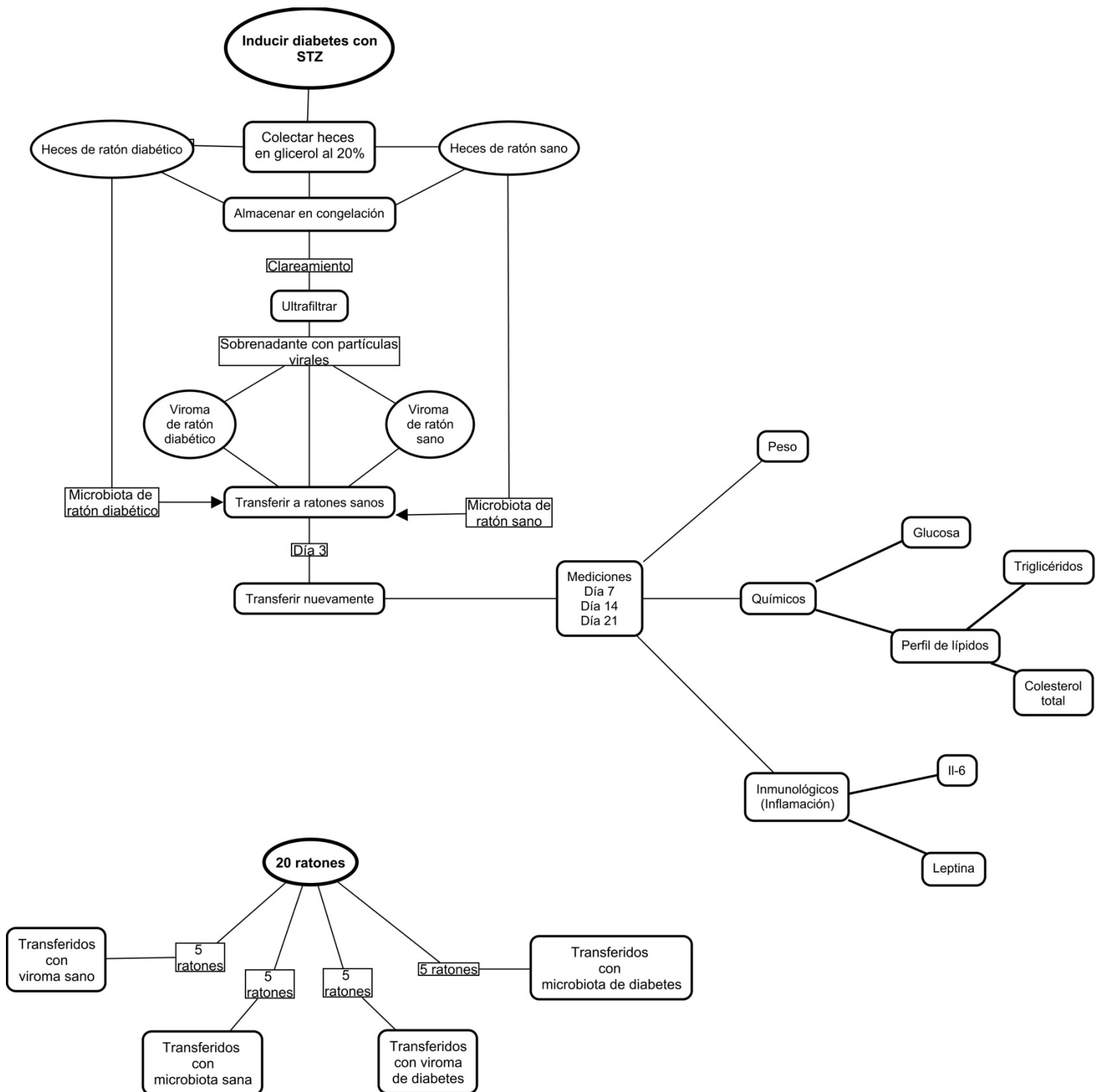


Fig 1. Diagrama de flujo de la estrategia general

8.8 Recolección de la información

8.8.1 Instrumentos de medición

- Balanza
- Glucómetro y tiras reactivas One Touch.
- Espectrofotómetro y reactivos para determinación de perfil de lípidos.
- Kits y lector de ELISA para determinación cuantitativa de IL-6 y leptina.

8.8.2 Validez y Consistencia

Los métodos utilizados para pesaje, medición de la glucosa, lípidos y factores inflamatorios en suero son comerciales y han sido reportados para su uso en experimentación con ratones.

8.9 Procesamiento y presentación de la información

8.9.1 Abordaje de análisis estadístico.

Los datos recolectados de los ratones en experimentación fueron analizados mediante la prueba de hipótesis no paramétrica de Kruskal-Wallis aplicada a los cuatro grupos experimentales manejados como variables independientes a modo de categorías, de la siguiente manera: (1) ratones transferidos con viroma de ratones sanos, (2) ratones transferidos con microbiota de ratones sanos, (3) ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos y (4) ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos. Las variables dependientes fueron los datos recolectados de niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos, IL-6 y leptina. Los resultados fueron interpretados realizando una comparación de las medias de los valores de las variables dependientes obtenidas a partir de las mediciones realizadas en los diferentes grupos y, por último, se realizaron gráficas de líneas y de cajas y bigotes para una interpretación visual. Para ello se utilizó el programa STATA SE versión 12.

En todas las pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza de 95% y se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando se encontró un valor $p < 0.05$.

9. Lugar de realización del Proyecto

El proyecto se realizó en el laboratorio de inmunología viral de la Facultad de Medicina de la UAEM, cuyo responsable es el Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, así como en el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, que está acondicionado de acuerdo a los lineamientos de bioseguridad y ambiente adecuado para la estancia de animales de laboratorio.

10. Aspectos bioéticos

Clasificación: investigación experimental con animales

La investigación cumple con las disposiciones correspondientes al título séptimo del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud “De la investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación”.

1. La investigación se diseñará a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.
2. Cuando sea necesario sacrificar a un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.
3. El bioterio se encuentra diseñado para la especie de ratón, su conformación corporal, hábitos posturales, características locomotoras y proporciona comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen otras situaciones.
4. Asimismo, es supervisado por profesionales calificados y competentes para permitir el crecimiento, maduración y comportamiento normal del ratón, de conformidad con las normas de UAEM. La titular del proyecto vigila el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, así como las medidas de profilaxis y vacunación necesarias para la protección del personal ocupacionalmente expuesto.

Se utilizará el mínimo de ratones necesarios para obtener resultados significativos estadísticamente $N=5$

10.1 Consentimiento Informado (anexar formato).

No aplica, no se trabajará con humanos.

11. Resultados

11.1 Efecto de la transferencia de viroma intestinal de ratones con diabetes tipo 2 inducida por estreptozotocina a ratones sanos.

a) Niveles de glucosa en ayuno durante 28 días.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los niveles de glucosa en sangre periférica son diferentes en los cuatro grupos de ratones en experimentación (1) ratones transferidos con viroma intestinal de ratones sanos (viroma sano), (2) ratones transferidos con microbiota de ratones sanos (microbiota sana), (3) ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos (viroma diabetes) y (4) ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos (microbiota diabetes). La prueba de Kruskal-Wallis demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de glucosa en ayuno entre los cuatro grupos, $X^2(3) = 13.256$, $p = 0.0041$. Por tanto, se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables y se acepta que los niveles de glucosa en ayuno son una variable dependiente de la transferencia de viroma intestinal de ratones diabéticos a ratones sanos. Por consiguiente, existe una asociación entre el viroma intestinal y los niveles de glucosa en ayuno, mismos que se utilizan para el diagnóstico de diabetes tipo 2.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Grupo	Obs	Rank Sum
Viroma sano	25	1004.00
Microbiota sana	25	976.00
Viroma diabetes	25	1263.00
Microbiota diabetes	20	1317.00

chi-squared = 13.256 with 3 d.f.
probability = 0.0041

chi-squared with ties = 13.261 with 3 d.f.
probability = 0.0041

Tabla 5. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para igualdad de niveles de glucosa en ayuno en los cuatro grupos de ratones en experimentación.

Se compararon las medias de los niveles de glucosa en ayuno medidas en los cuatro grupos de ratones en experimentación de manera inicial y en los días 7, 14, 21 y 28 después de la transferencia. La media de los niveles de glucosa en ayuno en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos fue de 134.08 mg/dl (± 17.72 mg/dl), en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos fue de 133.04 mg/dl (± 22.68 mg/dl), en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos fue de 150.32 mg/dl (± 39.8 mg/dl), y en los ratones transferidos con microbiota de diabetes fue de 168.8 mg/dl (± 36.98 mg/dl).

Los ratones transferidos con microbiota de ratón diabético tuvieron la media de niveles de glucosa en ayuno más alta, seguidos por los ratones transferidos con viroma de ratón diabético, esto se atribuyó a que la microbiota completa está compuesta por bacterias, hongos, protozoarios y virus, lo cual representa una mayor cantidad de elementos que pudieran tener un efecto hiperglucemiante en los ratones sanos; no obstante, los virus, principalmente los bacteriófagos, son un elemento regulador de las poblaciones bacterianas, por ello en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos se observó una media de niveles de glucosa en ayuno de 16 mg/dl más alta que en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos y una media de 15 mg/dl más alta que en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos.

Grupo	Summary of Glucosa		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
Viroma sa	134.08	17.724559	25
Microbiot	133.04	22.683474	25
Viroma di	150.32	39.860925	25
Microbiot	168.8	36.987338	20
Total	145.38947	33.036825	95

Tabla 6. Medias de niveles de glucosa en sangre periférica con ayuno de 4 horas los cuatro grupos experimentales.

Se realizaron gráficas de líneas con los resultados obtenidos de la medición de niveles de glucosa en ayuno por tiempos (inicial, día 7, día 14, día 21 y día 28) para cada uno de los cuatro grupos de ratones en experimentación.

Los ratones 1, 2 y 5 los niveles de glucosa en ayuno fueron menores el día 28 con respecto a los de la medición inicial, tal como se muestra en la fig. 2.

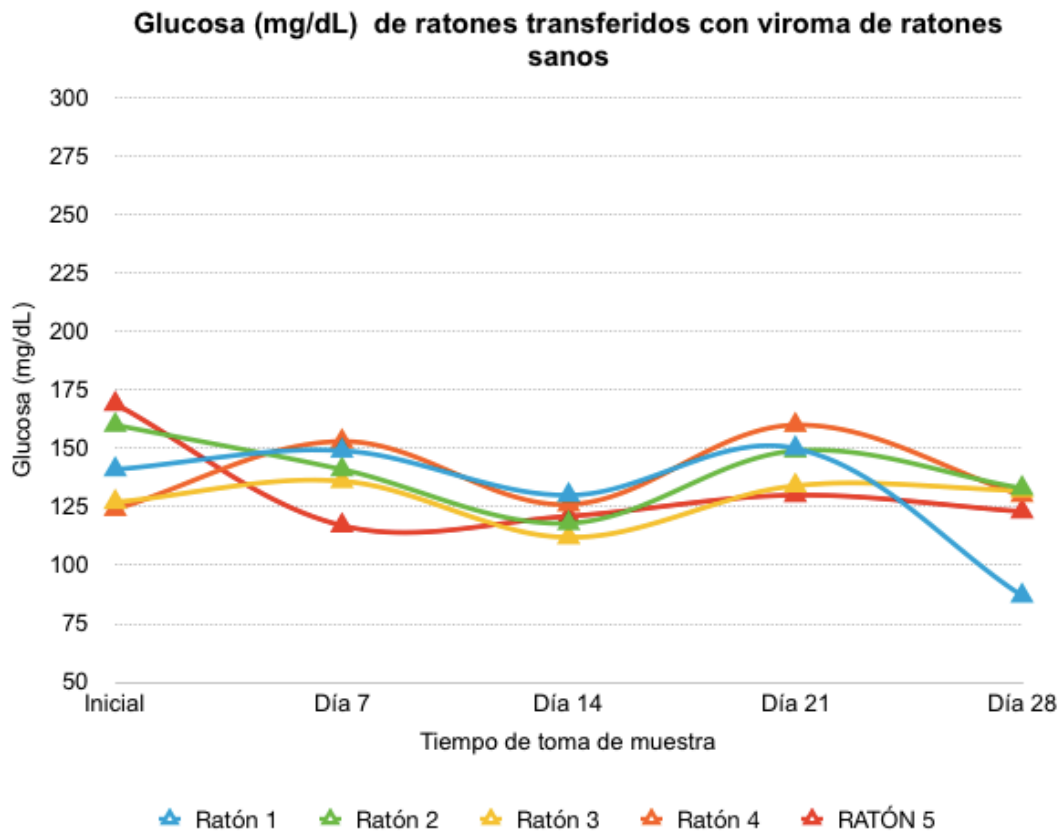


Fig 2. Niveles de glucosa en sangre periférica en ayuno medida a los 0, 7, 14, 21 y 28 días post transferencia en los cinco ratones transferidos con viroma intestinal de ratones sanos.

En los cinco ratones los niveles de glucosa en ayuno fueron menores el día 14 con respecto a los de la medición inicial, y en los ratones 1, 2, 3 y 4 fueron menores el día 28 con respecto a los de la medición inicial, tal como se muestra en la fig. 3.

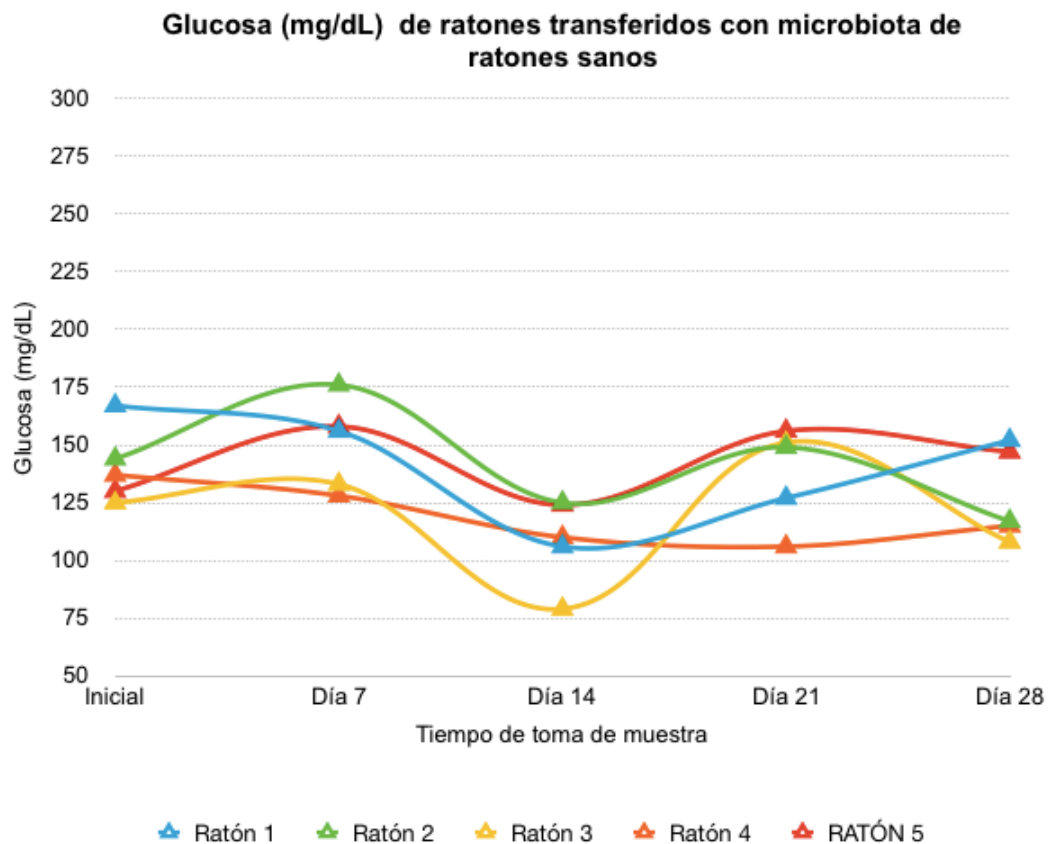


Fig 3. Niveles de glucosa en sangre periférica en ayuno medida a los 0, 7, 14, 21 y 28 días post transferencia en los cinco ratones transferidos con microbiota intestinal de ratones sanos.

Como se muestra en la fig.4, en los cinco ratones los niveles de glucosa en ayuno fueron mayores el día 21 con respecto a la medición inicial, al día 7 y al día 14. Se observó un efecto hiperglucemiante hasta el día 21, atribuyendo este hecho al tiempo que requiere la replicación de los virus, particularmente los bacteriófagos, en cantidades suficientes para regular a las poblaciones bacterianas por medio de efectos líticos o lisogénicos y ocasionar finalmente una disbiosis que contribuyó al aumento observado de los niveles de glucosa en ayuno. Estos niveles bajaron el día 28, esto se atribuyó a un mejoramiento de la disbiosis por medio del genotipo del ratón sano.

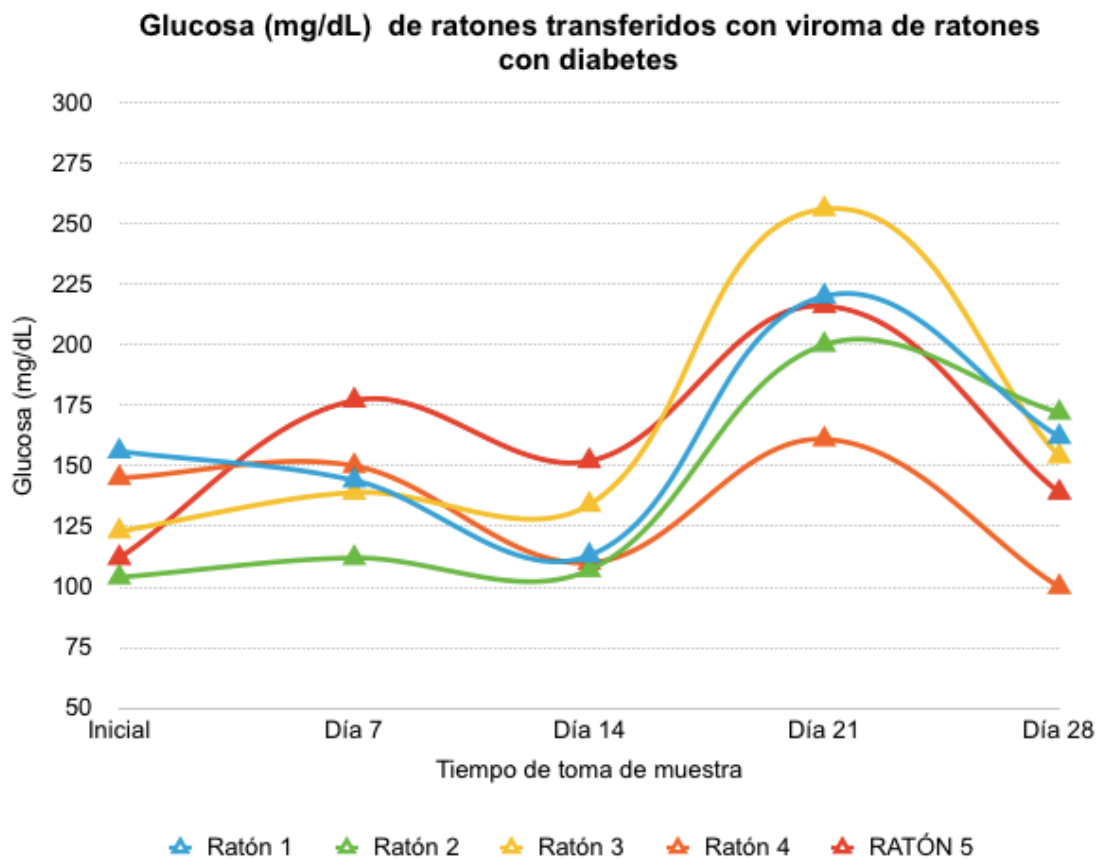


Fig 4. Niveles de glucosa en sangre periférica en ayuno medida a los 0, 7, 14, 21 y 28 días post transferencia en los cinco ratones transferidos con viroma intestinal de ratones diabéticos.

Uno de los ratones del grupo de transferidos con microbiota de ratones con diabetes fue eliminado del experimento. Como se muestra en la fig. 4, en los cuatro ratones los niveles de glucosa en ayuno aumentaron para el día 7 y 21 con respecto a la medición inicial. Se observó un efecto hiperglucemiante desde el día 7, atribuyendo este hecho a la transferencia de la microbiota completa de ratones diabéticos, por lo que la diabiosis se estableció en poco tiempo. Estos niveles bajaron el día 28, esto se atribuyó a un mejoramiento de la disbiosis por medio del genotipo del ratón sano.

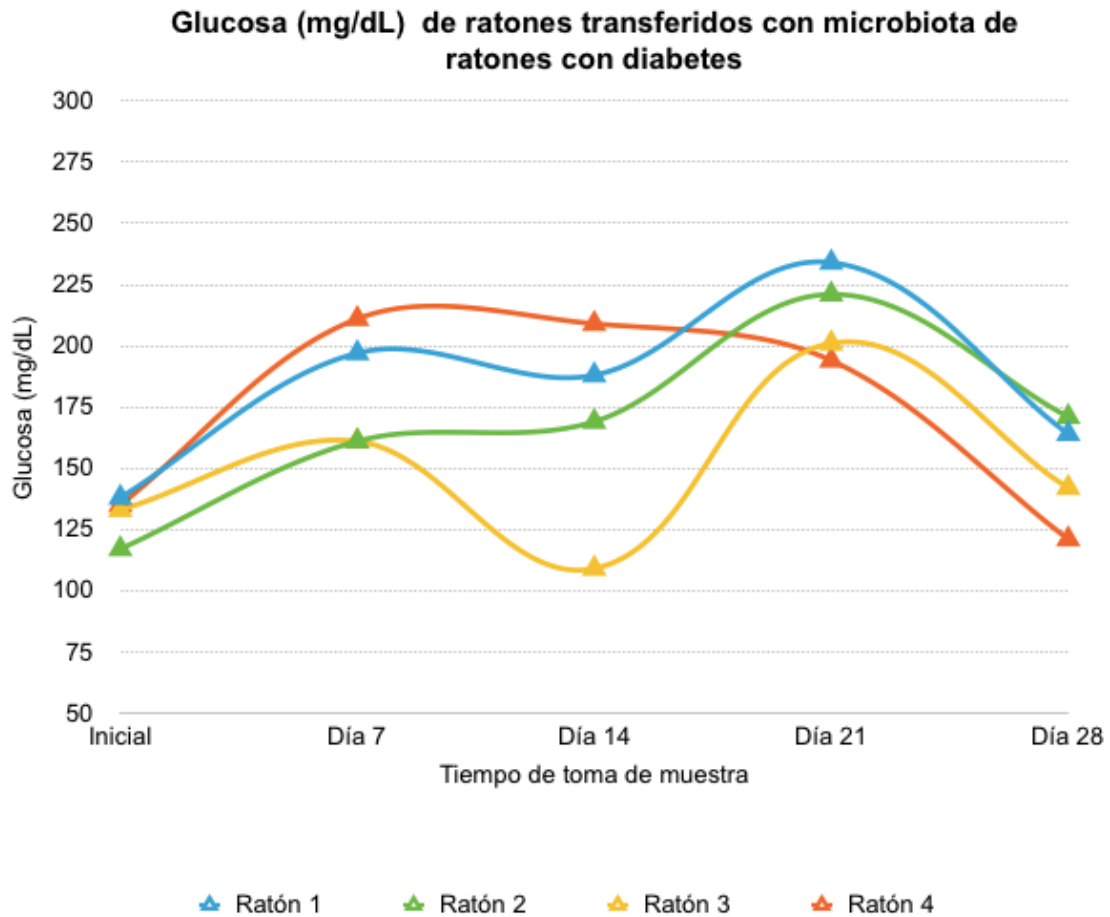


Fig 5. Niveles de glucosa en sangre periférica en ayuno medida a los 0, 7, 14, 21 y 28 días post transferencia en los cuatro ratones transferidos con microbiota intestinal de ratones diabéticos.

Los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos aumentaron sus niveles de glucosa en ayuno desde el día 7, alcanzando un aumento máximo en el día 21. Mientras tanto, los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos no aumentaron de manera importante sino hasta el día 21, alcanzando los mismos niveles de los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos, tal como se muestra en la fig.5. Como ya se mencionó anteriormente, este hecho se atribuyó al tiempo que

requiere la replicación de los virus, particularmente los bacteriófagos, en cantidades suficientes para regular a las poblaciones bacterianas por medio de efectos líticos o lisogénicos y ocasionar finalmente una disbiosis que contribuyó al aumento observado de los niveles de glucosa en ayuno. Estos niveles bajaron el día 28, esto se atribuyó a un mejoramiento de la disbiosis por medio del genotipo del ratón sano.

Se realizó una gráfica de líneas para comparar los promedios de los niveles de glucosa en ayuno medidos por tiempos (inicial, día 7, día 14, día 21 y día 28) en los cuatro grupos de ratones, para una interpretación visual.

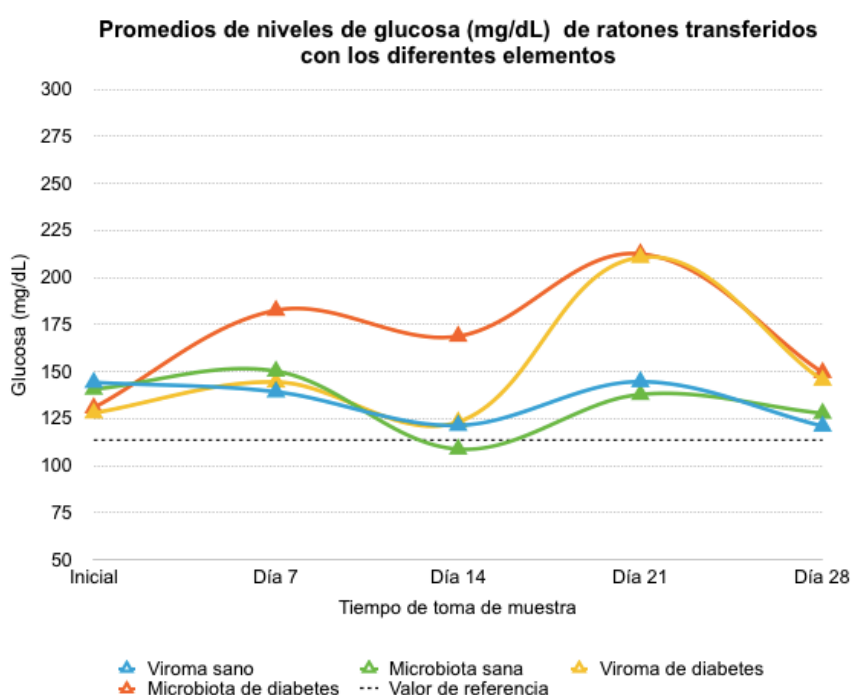


Fig 6. Promedios del nivel de glucosa en sangre periférica en ayuno de 4 horas de los ratones que conformaron a cada grupo de experimentación con base en los tiempos en que se realizaron las mediciones (inicial, día 7, día 14, día 21 y día 28). Asimismo se indica con la línea punteada el valor de referencia para ratón hembra de la cepa c57, que corresponde a 113.7 mg/dl.

Se realizó una gráfica de cajas y bigotes con los niveles de glucosa en ayuno para los cuatro grupos de ratones en experimentación, para una interpretación visual de las medianas por grupo, así como de los cuartiles y niveles máximos y mínimos (fig.7).

La mediana de los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos es mayor que la mediana de los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos. Los niveles mínimo y máximo de los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos son mayores comparados con los de los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos.

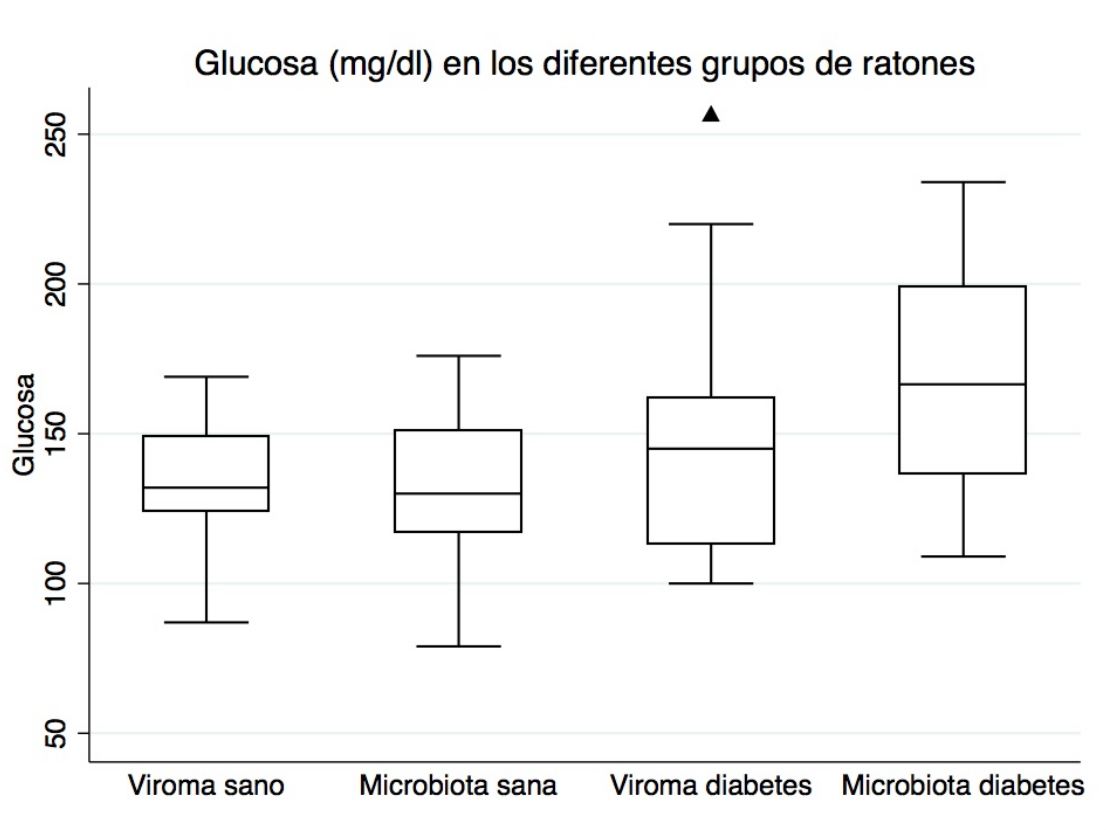


Fig 7. Niveles de glucosa en sangre periférica en ayunode 4 horas en los cuatro grupos de ratones experimentales.

b) Niveles séricos de IL-6.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los niveles de IL-6 fueron diferentes en los cuatro grupos de ratones en experimentación (1) ratones transferidos con viroma de ratones sanos (viroma sano), (2) ratones transferidos con microbiota de

ratones sanos (microbiota sana), (3) ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos (viroma diabetes) y (4) ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos (microbiota diabetes). La prueba de Kruskal-Wallis demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de glucosa en ayuno entre los cuatro grupos, $X^2(3) = 3.821$, $p = 0.2815$. Por lo tanto, existe una independencia de la variable y no existe asociación entre los niveles séricos de IL-6 y la transferencia de viroma intestinal de ratones diabéticos a ratones sanos.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Grupo	Obs	Rank Sum
Viroma sano	3	24.00
Microbiota sana	3	22.00
Viroma diabetes	3	23.00
Microbiota diabetes	3	9.00

chi-squared = 3.821 with 3 d.f.

probability = 0.2815

chi-squared with ties = 3.821 with 3 d.f.

probability = 0.2815

Tabla 7. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para igualdad de niveles séricos de IL-6 en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se compararon las medias de los niveles séricos de IL-6 medidas en los cuatro grupos de ratones en experimentación de manera inicial y en los días 7 y 21 después de la transferencia. La media de los niveles séricos de IL-6 en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos fue de 72.41 pg/ml (± 15.35 pg/ml), en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos fue de 77.8 pg/ml (± 54.22 pg/ml), en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos fue de 63.88 pg/ml (± 29.74 pg/ml), y en los ratones transferidos con microbiota de diabetes fue de 22.21 pg/ml (± 17.03 pg/ml).

Los ratones transferidos con microbiota de ratón sano tuvieron la media de niveles séricos de IL-6 más alta, seguidos por los ratones transferidos con viroma sano. Por ello, no se encontró una asociación entre la transferencia de viroma intestinal de ratones diabéticos a ratones sanos con los niveles séricos de IL-6.

Grupo	Summary of Il6		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
Viroma sa	72.411764	15.353392	3
Microbiot	77.803923	54.22969	3
Viroma di	63.882352	29.740807	3
Microbiot	22.215687	17.039374	3
Total	59.078431	36.22401	12

Tabla 8. Resumen de medias de niveles séricos de IL-6 con sus respectivas desviaciones estándar en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se realizó una gráfica de cajas y bigotes con los niveles séricos de IL-6 para los cuatro grupos de ratones en experimentación, para una interpretación visual de las medianas por grupo, así como de los cuartiles y niveles máximos y mínimos (fig.8).

La mediana de los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos es ligeramente mayor que la mediana de los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos, así como de la mediana de los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos.

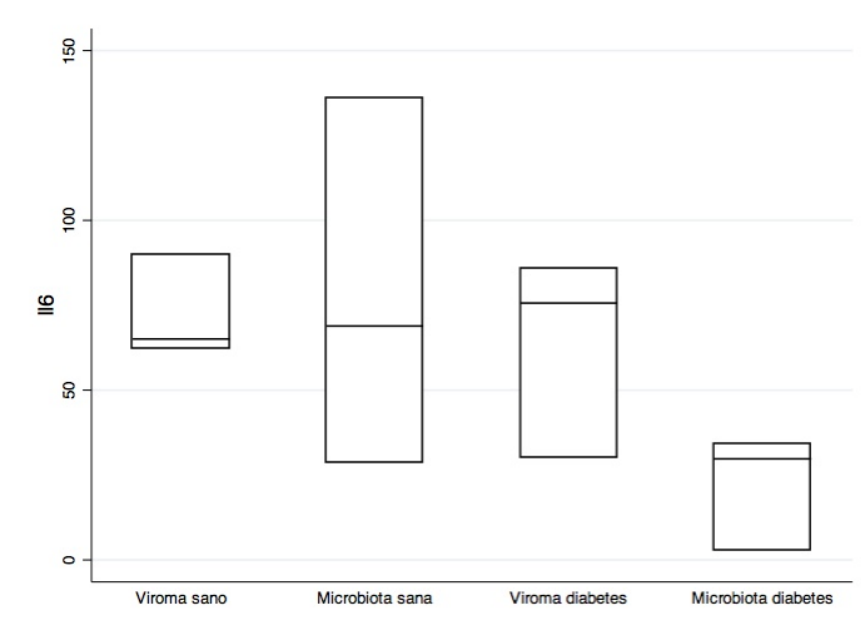


Fig 8. Niveles séricos de IL-6 en los cuatro grupos de ratones experimentales.

c) Niveles séricos de leptina.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los niveles séricos de leptina fueron diferentes en los cuatro grupos de ratones en experimentación (1) ratones transferidos con viroma de ratones sanos (viroma sano), (2) ratones transferidos con microbiota de ratones sanos (microbiota sana), (3) ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos (viroma diabetes) y (4) ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos (microbiota diabetes). La prueba de Kruskal-Wallis demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de leptina entre los cuatro grupos, $X^2(3) = 9.051$, $p = 0.02$. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables y se acepta que los niveles séricos de leptina son una

variable dependiente de la transferencia de viroma intestinal de ratones diabéticos a ratones sanos.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Grupo	Obs	Rank Sum
Viroma sano	3	14.00
Microbiota sana	3	7.00
Viroma diabetes	3	30.00
Microbiota diabetes	3	27.00

chi-squared = 9.051 with 3 d.f.
probability = 0.0286

chi-squared with ties = 9.051 with 3 d.f.
probability = 0.0286

Tabla 9. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para igualdad de niveles séricos de leptina en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se compararon las medias de los niveles séricos de leptina medidas en los cuatro grupos de ratones en experimentación de manera inicial y en los días 7 y 21 después de la transferencia. La media de los niveles séricos de leptina en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos fue de 4.51 ng/ml (± 1.35 ng/ml), en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos fue de 1.83 ng/ml (± 2.81 ng/ml), en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos fue de 18.78 ng/ml (± 17.6 ng/ml), y en los ratones transferidos con microbiota de diabetes fue de 8.63 ng/ml (± 2.38 ng/ml).

De este modo, se demuestra que el grupo de ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos mostró una mayor diferencia con respecto a los otros grupos de ratones. Los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos tuvieron la media de niveles séricos de leptina más alta. Este grupo de ratones presentaron hiperleptinemia.

Grupo	Summary of Leptina		
	Mean	Std. Dev.	Freq.
Viroma sa	4.5166666	1.353083	3
Microbiot	1.8333334	2.8112868	3
Viroma di	18.783333	17.665031	3
Microbiot	8.6333335	2.3844985	3
Total	8.4416666	10.238671	12

Tabla 10. Resumen de medias de niveles séricos de leptina con sus respectivas desviaciones estándar en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se realizó una gráfica de cajas y bigotes con los niveles séricos de leptina para los cuatro grupos de ratones en experimentación, para una interpretación visual de las medianas por grupo, así como de los cuartiles y niveles máximos y mínimos (fig.9).

La mediana de los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos es mayor que la mediana de los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos, así como de la mediana de los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos.

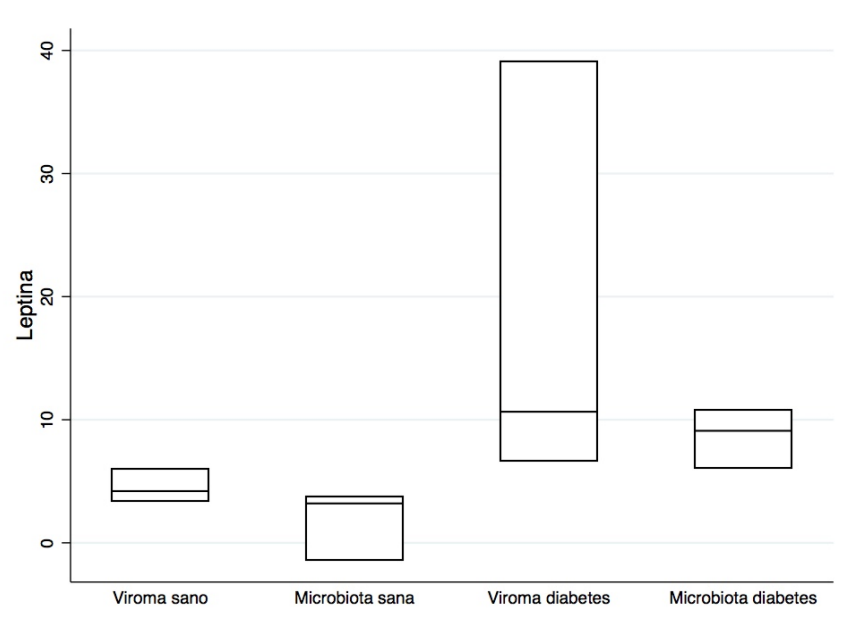


Fig 9. Niveles séricos de leptina en los cuatro grupos de ratones experimentales.

d) Niveles séricos de triglicéridos.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los niveles séricos de triglicéridos fueron diferentes en los cuatro grupos de ratones en experimentación. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de triglicéridos entre los cuatro grupos, $X^2(3) = 0.993$, $p = 0.80$. Por lo tanto, existe una independencia de la variable y no existe asociación entre los niveles séricos de triglicéridos y la transferencia de viroma intestinal de ratones diabéticos a ratones sanos.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Grupos	Obs	Rank Sum
Viroma sano	4	28.00
Microbiota sana	4	37.00
Viroma de diabetes	4	40.00
Microbiota de diabetes	4	31.00

chi-squared = 0.993 with 3 d.f.
probability = 0.8030

chi-squared with ties = 0.993 with 3 d.f.
probability = 0.8030

Tabla 11. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para igualdad de niveles séricos de triglicéridos en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se compararon las medias de los niveles séricos de triglicéridos medidas en los cuatro grupos de ratones en experimentación de manera inicial y en los días 7, 21 y 36 después de la transferencia. La media de los niveles séricos de triglicéridos en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos fue de 102.95 mg/dl (± 16.96 mg/dl), en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos fue de 116.95 mg/dl (± 32.50 mg/dl), en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos fue de 119.32 mg/dl (± 16.84 mg/dl), y en los ratones transferidos con microbiota de diabetes fue de 112.12 mg/dl (± 28.42 mg/dl).

Grupos	Summary of Triglicéridos		
	Mean	Std. Dev.	Freq.
Viroma sa	102.95	16.96084	4
Microbiot	116.95	32.506256	4
Viroma de	119.325	16.845451	4
Microbiot	112.125	28.425151	4
Total	112.8375	23.003388	16

Tabla 12. Resumen de medias de niveles séricos de triglicéridos con sus respectivas desviaciones estándar en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se realizó una gráfica de líneas para comparar los niveles séricos de triglicéridos medidos por tiempos (inicial, día 7, día 21 y día 36) en los pools de los cuatro grupos de ratones, para una interpretación visual.

Los ratones transferidos con viroma intestinal de ratones diabéticos presentan niveles de triglicéridos superiores en el día 36 comparados con los niveles iniciales, lo mismo ocurre con los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos, pero también con los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos, tal como se muestra en la fig. 10. Como ya se mencionó, la diferencia no es estadísticamente significativa entre los cuatro grupos de ratones.

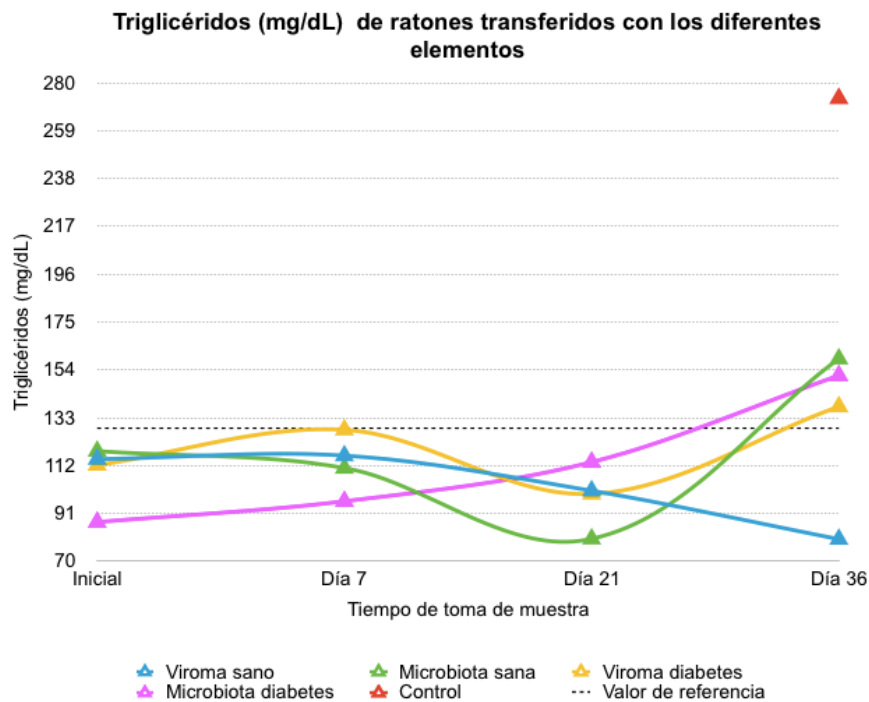


Fig 10. Niveles séricos de triglicéridos en los pools de los ratones que conformaron a cada grupo de experimentación con base en los tiempos en que se realizaron las mediciones (inicial, día 7, día 21 y día 36). Asimismo, se indica con la línea punteada el valor de referencia para ratón hembra de la cepa C57/B6, que corresponde a 128.4 mg/dl.

Se realizó también una gráfica de cajas y bigotes con los niveles séricos de triglicéridos para los cuatro grupos de ratones en experimentación, para una interpretación visual de las medianas por grupo, así como de los cuartiles y niveles máximos y mínimos (fig.11).

La mediana de los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos es mayor que la mediana de los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos así como de la mediana de los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos.

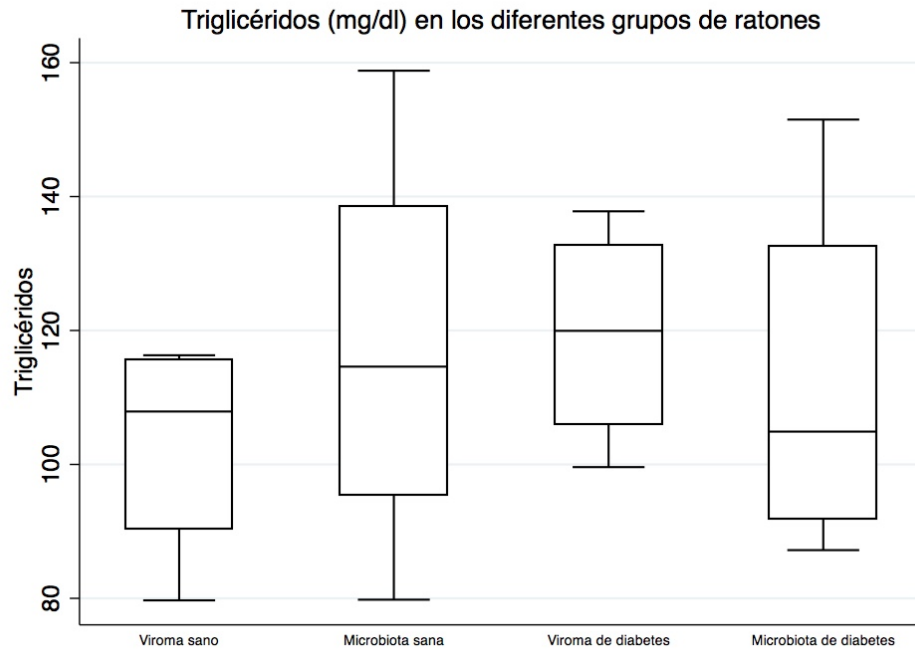


Fig 11. Niveles séricos de triglicéridos en los cuatro grupos de ratones experimentales.

e) Niveles séricos de colesterol.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los niveles séricos de colesterol fueron diferentes en los cuatro grupos de ratones en experimentación. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de colesterol entre los cuatro grupos, $X^2(3) = 1.84$, $p = 0.60$. Por lo tanto, existe una independencia de la variable y no existe asociación entre los niveles séricos de colesterol y la transferencia de viroma intestinal de ratones diabéticos a ratones sanos.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Grupos	Obs	Rank Sum
Viroma sano	4	27.00
Microbiota sana	4	28.50
Viroma de diabetes	4	42.50
Microbiota de diabetes	4	38.00

chi-squared = 1.847 with 3 d.f.

probability = 0.6047

chi-squared with ties = 1.850 with 3 d.f.

probability = 0.6041

Tabla 13. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para igualdad de niveles séricos de colesterol en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se compararon las medias de los niveles séricos de colesterol medidas en los cuatro grupos de ratones en experimentación de manera inicial y en los días 7, 21 y 36 después de la transferencia. La media de los niveles séricos de colesterol en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos fue de 79.97 mg/dl (± 18.24 mg/dl), en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos fue de 87.15 mg/dl (± 6.89 mg/dl), en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos fue de 95.85 mg/dl (± 12.58 mg/dl), y en los ratones transferidos con microbiota de diabetes fue de 93.9 mg/dl (± 14.61 mg/dl). La media fue superior en ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos; sin embargo, esto no es estadísticamente significativo.

Grupos	Summary of Colesterol		
	Mean	Std. Dev.	Freq.
Viroma sa	79.972498	18.241079	4
Microbiot	87.15	6.8941994	4
Viroma de	95.85	12.583191	4
Microbiot	93.9	14.613922	4
Total	89.218124	13.854369	16

Tabla 14. Resumen de medias de niveles séricos de colesterol con sus respectivas desviaciones estándar en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se realizó una gráfica de líneas para comparar los niveles séricos de colesterol medidos por tiempos (inicial, día 7, día 21 y día 36) en los pools de los cuatro grupos de ratones, para una interpretación visual (fig.12). Los ratones transferidos con viroma intestinal de ratones diabéticos presentan niveles de triglicéridos superiores en el día 7 comparados con los niveles iniciales, lo mismo ocurre con los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos, los cuales continuaron aumentando sus niveles de colesterol para el día 21; no obstante, para este día, los ratones transferidos con viroma intestinal de ratón diabético bajaron sus niveles. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de colesterol y la transferencia de viroma de ratones diabéticos a ratones sanos.

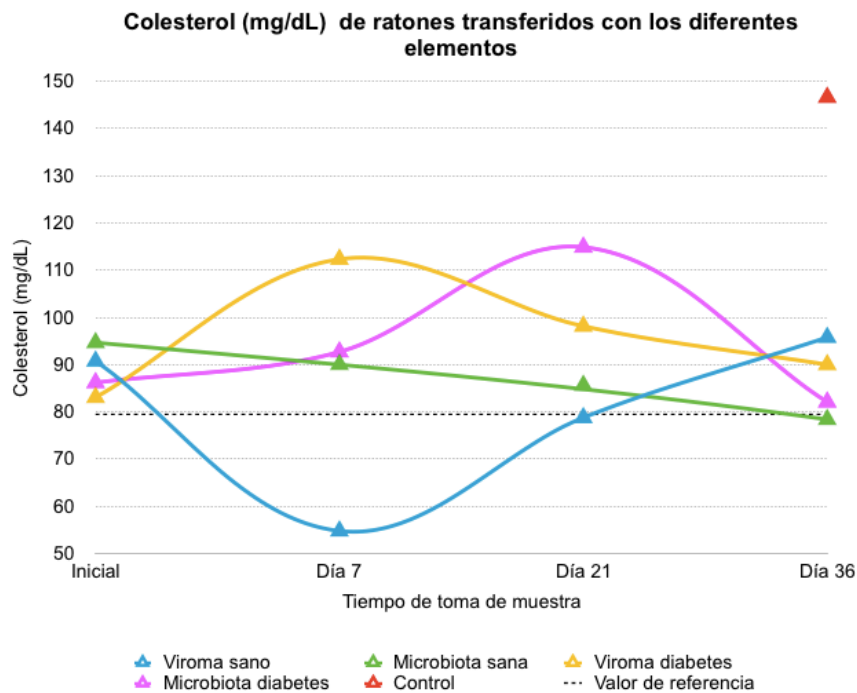


Fig 12. Niveles séricos de colesterol en los pools de los ratones que conformaron a cada grupo de experimentación con base en los tiempos en que se realizaron las mediciones (inicial, día 7, día 21 y día 36).

Se realizó también una gráfica de cajas y bigotes con los niveles séricos de colesterol para los cuatro grupos de ratones en experimentación, para una interpretación visual de las medianas por grupo, así como de los cuartiles y niveles máximos y mínimo (fig.13).

La mediana de los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos es mayor que la mediana de los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos, así como de la mediana de los ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos. Esta diferencia no es estadísticamente significativa.

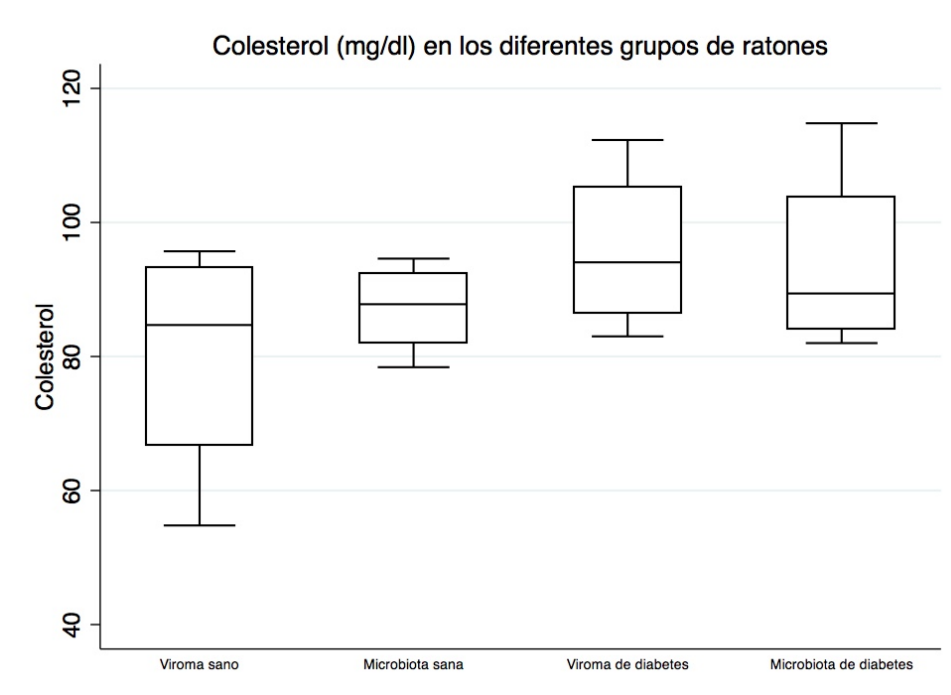


Fig 13. Niveles séricos de colesterol en los cuatro grupos de ratones experimentales.

f) Peso.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si el peso fue diferente en los cuatro grupos de ratones en experimentación. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa en el peso entre los cuatro grupos, $X^2(3) = 9.910$, $p = 0.01$. Por lo tanto, las variables no son independientes, existe un grupo con una diferencia significativa a los demás. Para ello se realizará una tabla de comparación de medias.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Grupo	Obs	Rank Sum
Viroma sano	25	1343.50
Microbiota sana	25	855.50
Viroma diabetes	25	1203.00
Microbiota diabetes	20	1158.00

chi-squared = 9.910 with 3 d.f.
probability = 0.0193

chi-squared with ties = 9.917 with 3 d.f.
probability = 0.0193

Tabla 15. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para igualdad de pesos en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se compararon las medias de los pesos medidas en los cuatro grupos de ratones en experimentación de manera inicial y en los días 7, 14 y 21 después de la transferencia. La media de los pesos en los ratones transferidos con viroma de ratones sanos fue de 23.7 g (± 1.4 g), en los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos fue de 22.0 g (± 3.1 g), en los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos fue de 23.4 g (± 1.2 g), y en los ratones transferidos con microbiota de diabetes fue de 24 g (± 1.1 g). La media fue inferior de manera estadísticamente significativa en ratones transferidos con microbiota de ratones sanos, por lo tanto, este grupo es el que presenta una diferencia con los otros grupos de acuerdo a la prueba Kruskal-Wallis.

Grupo	Summary of Peso		
	Mean	Std. Dev.	Freq.
Viroma sa	23.764	1.4247454	25
Microbiot	22.036	3.1075015	25
Viroma di	23.428	1.2775366	25
Microbiot	24	1.1290423	20
Total	23.270526	2.0610817	95

Tabla 16. Medias de pesos con sus respectivas desviaciones estándar en los cuatro grupos de ratones experimentales.

Se realizó también una gráfica de cajas y bigotes con los pesos para los cuatro grupos de ratones en experimentación, para una interpretación visual de las medianas por grupo, así como de los cuartiles y niveles máximos y mínimo (fig. 14). La mediana de los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos es menor que las medianas de los demás grupos.

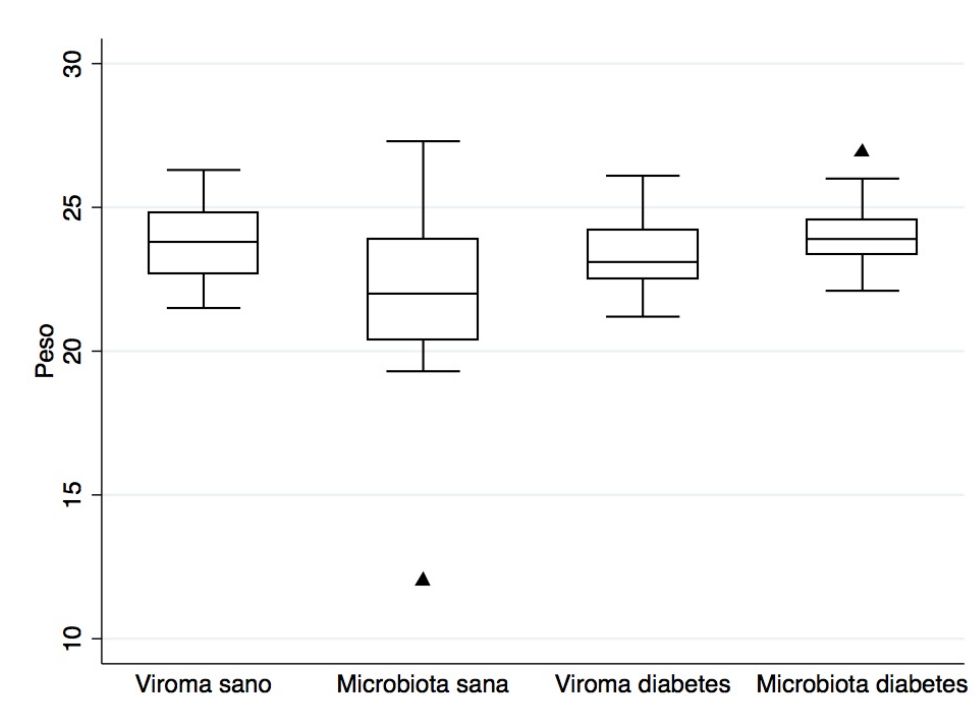


Fig 14. Pesos en los cuatro grupos de ratones en experimentación tomado en gramos antes y después de la transferencia.

12. Discusión

La composición de la microbiota intestinal ha sido relacionada con la etiología y desarrollo de diversas enfermedades, tales como la diabetes, enfermedad multisistémica, crónico degenerativa de carácter multifactorial que se caracteriza por hiperglucemia y presencia de comorbilidades como dislipidemias, enfermedad cardiovascular y obesidad, lo cual implica un riesgo de mortalidad. Para su estudio se han desarrollado modelos animales que permiten la evaluación de los distintos factores que intervienen en su desarrollo y mantenimiento. Gracias a ello, en el presente trabajo se logró inducir hiperglicemia moderada de manera transitoria a ratones sanos transferidos con un filtrado obtenido a partir de un homogenizado de heces fecales proveniente de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina. Este filtrado se denominó como viroma; sin embargo, en el desarrollo de este proyecto no fue posible secuenciar las partículas virales, debido al tiempo y al costo, por lo que se trabajó con partículas virales de las cuales no fue posible determinar su composición. No obstante; fueron transferidas vía oral, obteniendo resultados, que nos sugieren que la parte no bacteriana, en su mayoría partículas virales, podrían estar participando como uno de los factores en la etiología y desarrollo de la diabetes tipo 2.

El principal objetivo de este estudio fue determinar el grado de asociación del viroma intestinal de ratones con diabetes tipo 2 transferido a ratones sanos en el desarrollo y mantenimiento de diabetes tipo 2.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos, todos los ratones transferidos con partículas virales de heces de ratones diabéticos mostraron una intolerancia a la glucosa en la tercera semana después de la transferencia, ya que se obtuvieron valores de glucosa en ayuno >145 mg/dl; no obstante, el concepto de intolerancia a la glucosa y diabetes son diferentes. En ratón se considera diabetes cuando los niveles de glucosa en ayuno son >243 mg/dl, únicamente uno de los ratones en este grupo experimental presentó valores superiores a dicha cifra. Por tanto, a partir de este estudio, se puede inferir que existe una asociación entre el viroma intestinal y la hiperglucemia e intolerancia a la glucosa.⁴⁰

Al contribuir el viroma a elevar los niveles de glucemia, contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2, ya que, como se mencionó en los antecedentes, la diabetes es una enfermedad multifactorial; es decir, tiene causas genéticas y ambientales, entre las cuales se encuentra la alimentación, la actividad física, el estilo de vida, la composición de la microbiota y de acuerdo a este estudio, muy probablemente, a la composición del viroma intestinal.³³

No obstante, se requieren estudios para determinar si el viroma contribuye al mantenimiento de la diabetes tipo 2, ya que, en este estudio, los ratones sanos transferidos con viroma de ratón diabético, no presentaban diabetes en un inicio, desarrollaron hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, se requeriría realizar otro estudio en ratones con diabetes ya establecida, pues en este estudio, la hiperglucemia e intolerancia a la glucosa no se mantuvieron en la cuarta semana.

En la cuarta semana, la hiperglucemia de los ratones en este grupo experimental mejoró ligeramente, esto se debe, como se mencionó en los antecedentes, a que el genotipo del ratón también determina la composición de su microbiota intestinal, por lo tanto, se especuló que la disbiosis comenzó a mejorar y por consiguiente, también mejoraron los niveles de glucosa en ayuno, pues no existió otra variable que contribuyera a la hiperglucemia.

El grupo de ratones transferidos con microbiota de ratón diabético comenzó a elevar sus niveles de glucosa en ayuno desde la primera semana, ya que la disbiosis se estableció rápidamente, pues contiene todos los elementos presentes en la microbiota, incluyendo las bacterias, de tal manera que la inoculación de bacterias de ratones diabéticos a ratones sanos establece la disbiosis más rápido que los transferidos con la fracción no bacteriana. Al igual que los ratones transferidos con viroma intestinal de ratones diabéticos, alcanzaron un nivel máximo de glucosa en ayuno en la tercera semana y se obtuvieron niveles inferiores a la cuarta semana, hecho que también se atribuye al genotipo del ratón y a la alimentación, pues los ratones sanos fueron alimentados con dieta balanceada, lo cual contribuye a una mejora en la disbiosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los niveles séricos de IL-6 no se encontraron elevados en los ratones transferidos con viroma intestinal de ratones diabéticos, se requieren realizar más estudios para comprobar que el viroma intestinal de ratones diabéticos no eleva las concentraciones de esta citocina inflamatoria, pues otros

estudios sugieren que la inflamación juega un papel crucial en la patogénesis de la diabetes y se tiene una sustancial evidencia experimental de que la IL-6 es un marcador fisiológico de inflamación sistémica asociada con hiperglucemia, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.⁴⁵

Con respecto a las concentraciones de leptina sérica, se observó que los ratones transferidos con viroma intestinal de ratón diabético presentaron niveles superiores que los ratones transferidos con viroma y microbiota de ratones sanos; no obstante, estos ratones presentaron en todas las mediciones por tiempos concentraciones superiores a los demás grupos, incluso antes de la transferencia, por lo que se requieren más estudios para verificar y afirmar que el viroma intestinal es causa de la elevación de los niveles séricos de leptina. Sin embargo; después de la transferencia, este grupo de ratones ingirió mayor cantidad de alimento, esta afirmación es basada en observaciones subjetivas, por lo que en estudios posteriores se sugiere medir cuantitativamente la ingesta de alimentos de todos los grupos de ratones para realizar comparaciones.

En cuanto a los resultados obtenidos en peso, se esperaba que los ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos disminuyeran su peso con respecto al tiempo; sin embargo, únicamente dos ratones de este grupo disminuyeron ligeramente su peso y los ratones restantes lo aumentaron. Se observó que existen diferencias entre los grupos con respecto al peso de una manera estadísticamente significativa; no obstante, el grupo que presentó diferencia en su peso fue el de los ratones transferidos con microbiota de ratones sanos, estos ratones mantuvieron su peso durante todo el estudio, por ello sus pesos iniciales y finales fueron muy semejantes comparados con los demás grupos que lo aumentaron. Se observó que los ratones transferidos con viroma intestinal de ratones sanos aumentaron su peso en un inicio, pero comenzaron a mantenerlo en la tercera y cuarta semana, hecho que se atribuye al tiempo necesario para la replicación y actividad lítica y lisogénica de los bacteriófagos para regular a las poblaciones bacterianas y establecer una microbiota simbiótica relacionada con la salud y el mantenimiento del peso.

No se encontró asociación entre la transferencia de viroma de ratones diabéticos a ratones sanos y la elevación de triglicéridos y colesterol. En la diabetes tipo 2 es frecuente encontrar dislipidemias; no obstante, estas están asociadas principalmente al genotipo, al estilo de vida y a la alimentación. Aunque los ratones con diabetes inducida

por fármaco presentaron hipertrigliceridemia (la media de sus niveles séricos de triglicéridos fue de 273 mg/dl siendo el valor de referencia de 128.4 mg/dl), se requiere realizar estudios cuyo objetivo principal sea determinar la asociación del viroma intestinal con las dislipidemias, realizando una transferencia de viroma intestinal de ratones con dislipidemias establecidas a partir de una dieta alta en hidratos de carbono y lípidos, a ratones sanos, pues se especuló que la hipertrigliceridemia de los ratones inducidos por fármaco se desarrolló a partir de la hiperglucemia mantenida por la diabetes inducida por fármaco. Los ratones en experimentación no mantuvieron hiperglucemias tan elevadas, pues no fueron inducidos por fármaco.⁴⁰

Por otra parte, cabe destacar que los ratones de los cuatro grupos experimentales fueron hembras de la cepa C57/B6, mientras que los ratones diabéticos inducidos por fármaco fueron machos de la cepa CD1, esto debido a que el modelo de diabetes se encuentra estandarizado para esta cepa, por lo que se sugiere establecer las condiciones de inducción por estreptozotocina en la cepa C57/B6, para tener una mayor precisión en el estudio.

Finalmente, cabe mencionar que es necesario repetir el estudio para confirmar los resultados obtenidos y aumentar su impacto, así como probar el estudio en otros modelos animales y estudiar con mayor detalle sus posibles aplicaciones en el humano.

Con base en los resultados obtenidos se puede inferir que existe una asociación entre el viroma intestinal y los niveles de glucosa en ayuno en ratones. La transferencia de la fracción no bacteriana, la cual sugerimos que en su mayoría son partículas virales, principalmente bacteriófagos, conduce al aumento de los niveles de glucosa en ayuno, hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, observable en la tercera semana posterior a la primera transferencia, probablemente por el que se requiere para la replicación y acción lítica y lisogénica de los bacteriófagos para regular a las poblaciones bacterianas, es decir, para causar la disbiosis. De la misma manera, la transferencia de partículas virales de heces de ratones diabéticos a ratones sanos conduce al mantenimiento de niveles elevados de leptina sérica y, por lo tanto, a un aumento en la ingesta energética; sin embargo, al ser la diabetes una enfermedad crónica multifactorial, se requiere de un mayor tiempo de análisis y modificación de otros factores como la dieta, para ver si la combinación de estos factores aumenta la sintomatología y el desarrollo de la diabetes tipo 2.

13. Conclusión

La transferencia de partículas virales provenientes de ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina a ratones sanos induce niveles transitorios de hiperglucemia en la tercera semana post transferencia. No se encontró asociación con dislipidemias ni cambios significativos en la producción de IL-6 y leptina bajo estas condiciones.

14. Perspectivas

Los resultados obtenidos sugieren que hay una participación de las partículas virales en la inducción de estados de hiperglucemia, muy probablemente por la inducción de disbiosis en la microbiota residente, por lo que es necesario la repetición de estos estudios utilizando partículas virales purificadas por gradientes a partir de homogeneizados de heces fecales para garantizar que únicamente se transfieran partículas virales y no se transfiera algún factor soluble presente en el filtrado que pueda influir en los resultados.

Por otra parte, es necesario realizar la secuenciación de a las partículas virales obtenidas de ratones sanos y de ratones con diabetes a fin de conocer la composición del viroma intestinal murino, determinando las poblaciones de bacteriófagos y de virus eucariotes que podrían estar contribuyendo a la patología.

Se pretende alargar el tiempo de ensayo, aumentar la dosis y demostrar la actividad del viroma en ensayos en placas líticas antes de la transferencia, con la finalidad de establecer una medida cuantitativa para la transferencia.

Otra de las perspectivas es secuenciar la microbiota antes y después de la transferencia del viroma intestinal para demostrar su participación en la generación de disbiosis que se asemeje a la que se presenta en la diabetes.

Por otra parte, se podría realizar un estudio en el que se utilice la transferencia de viroma de ratones sanos a ratones diabéticos a modo de tratamiento para analizar si existe un efecto que revierta o al menos reduzca los niveles de glucosa en los ratones diabéticos.

15. Referencias

1. Focà, A., Liberto, M. C., Quirino, A., Marascio, N., Zicca, E., & Pavia, G. (2015). Gut inflammation and immunity: what is the role of the human gut virome? 2015: 1-7.
2. Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B., H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3), 447–460.
3. Upadhyaya, S., & Banerjee, G. (2015). Type 2 diabetes and gut microbiome: At the intersection of known and unknown. *Gut Microbes*, 6(2), 85–92.
4. WHO. (2017). Diabetes. 10 de noviembre de 2016, de WHO Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
5. Hugo Humberto Montoya Villafañe. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Antioquía: Universidad de Antioquía.
6. Romero Cabello Raúl. (2007). Generalidades de la Virología. En *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etimológicas de las enfermedades infecciosas* (109-111). México, D.F.: Médica Panamericana.
7. Murray Rosenthal Pfaller. (2014). Introducción a la microbiología médica. En *Microbiología Médica*(9). Barcelona: Elsevier.
8. Romero Cabello Raúl. (2007). Morfología y composición química de los virus. En *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etimológicas de las enfermedades infecciosas* (112-113). México, D.F.: Médica Panamericana.
9. Janet Melnick y Adalberg. (2011). La ciencia de la microbiología. En *Microbiología Médica*(1-2). México, D.F.: Manual Moderno.
10. Murray Rosenthal Pfaller. (2014). Clasificación, estructura y realización vírica. En *Microbiología Médica*(55-57). Barcelona: Elsevier.
11. Paez-Espino, D., Eloie-Fadrosh, E. A., Pavlopoulos, G. A., Thomas, A. D., Huntemann, M., Mikhailova, N., ... Kyrpides, N. C. (2016). Uncovering Earth's virome. *Nature*, 536(7617), 425–430.
12. Paul G. Engelkirk and Janet Duben-Engelkirk. (2015). Microbial Diversity. En *Burton's Microbiology for the Health Sciences* (45-47). Philadelphia: Wolters Kluwer Health.

13. Romero Cabello Raúl. (2007). Clasificación viral. En Microbiología y Parasitología Humana. Bases etimológicas de las enfermedades infecciosas (115-117). México, D.F.: Médica Panamericana.
14. The Human Microbiome Project. (2012). About the Human Microbiome Project. 24 de octubre de 2016, de The Human Microbiome Project Sitio web: <http://hmpdacc.org/overview/about.php>
15. Janet Melnick y Adalberg. (2011). Propiedades generales de los virus. En Microbiología Médica(373-374). México, D.F.: Manual Moderno.
16. Shirley Bikel, Alejandra Valdez-Lara, Fernanda Cornejo-Granados, Karina Rico, Samuel Canizales-Quinteros, Xavier Soberón, Luis Del Pozo-Yauner, Adrián Ochoa-Leyva. (2015). Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. Computational and Structural Biotechnology Journal, 13, 390-401.
17. Geo F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. (2008). Propiedades generales de los virus. En Microbiología médica (389-409). México, D.F.: Manual Moderno.
18. Minot, S., & Bryson, A. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. 110(30), 12450–12455.
19. Debasis, Swaroop, M. B. (2015). Probiotics and prebiotics. Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods, 3(1), 42–47.
20. Reyes, A., Semenkovich, N. P., Whiteson, K., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2013). Phage Populations, 10(9), 607–617.
21. Martin J, Sykes S, Young S, Kota K, Sanka R, Sheth N, Orvis J, Sodergren E, Wang Z, Weinstock GM, Mitreva M. (2013). Optimizing read mapping to reference genomes to determine composition and species prevalence in microbial communities. 7(6): e36427
22. Germán Bonilla Rosso, Valeria Souza y Luis E. Eguiarte. (2008). Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 11, 41-51.
23. Paul G. Engelkirk and Janet Duben-Engelkirk. (2015). MicrobialEcology and Microbial Biotechnology. En Burton's Microbiology for the Health Sciences (173-180). Philadelphia: Wolters Kluwer Health.

24. Makrides, M., Ochoa, J. B., & Morris, C. R. (2012). La importancia de la inmunonutrición, 77: 1-3
25. Bröls, T., & Weissenbach, J. (2011). The human metagenome: Our other genome? *Human Molecular Genetics*, 20(R2), 142–148.
26. Prados-Bo, A., Gómez-Martínez, S., Nova, E., & Marcos, A. (2015). El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 10–18.
27. Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. A., Wu, G. D., ... Bushman, F. D. (2011). The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet, 1616–1625.
28. Herbert W. (2014) The virome in mammalian physiology and disease; 157: 142-150.
29. Karthik Kota and Makedonka Mitreva. (2012). Reference genomes database. 24 de octubre de 2016, de The Genome Institute, Washington University School of Medicine Sitio web: http://hmpdacc.org/doc/ReferenceGenomesDB_SOP.pdf
30. CORDIS. (2013). Final Report Summary - METAHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract). 24 de octubre de 2016, de Comisión Europea. Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo Sitio web: http://cordis.europa.eu/result/rcn/56365_es.html
31. Olivier Telle and Yohanan Winogradsky. (2010). The project objectives: association of bacterial genes with human health a disease. 24 de octubre de 2016, de Metahit Sitio web: <http://www.metahit.eu/index.php?id=351>
32. Dennis A. Benson, Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell and David L. Wheeler. (2008). GenBank. 24 de octubre de 2016, de National Center for Biotechnology Information Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
33. NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos, México D.F. Secretaría de Salud, 23 de noviembre de 2010.
34. WHO. (2017). Diabetes. 10 de noviembre de 2016, de WHO Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
35. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

36. Balibrea, J. A. J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2, 22(2), 160–168.
37. Urzúa Z. (2011) Efectos crónicos de la cafeína sobre el nivel y tolerancia a la glucosa en ratas sanas y con diabetes mellitus experimental (tesis de maestría). Universidad de Colima, Colima, México.
38. Beatriz, D., Hernandorena, H., Julio, L., Rodríguez, C., & Julio, L. (2002). Enfoque actual. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2; 13(2): 160–168.
39. Ramos H., Domingo J. (1994) Diabetes mellitus experimental; 6: 347-371.
40. Fuentes M., Acosta L., Rodríguez P. (2008) Perfil lipídico, protéico y glicemia en ratones NMRI, C57BL / 6 y Balb / c producidos en la UCLA . Venezuela; 13(3): 92–103.
41. William Rojas M., Juan-Manuel Anaya C., Beatriz H. Aristizábal B., Luz Elena Cano R., Luis Miguel Gómez O., Damaris Lopera H. (2012). Inflamación. En Inmunología de Rojas (77-98). Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.
42. Iván Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. (2000). Migración celular e inflamación. En Inmunología de Rojas (61-69). Madrid: Harcourt.
43. Arthur C. Guyton, John E. Hall. (2006). Resistencia del organismo a la infección: I. Leucocitos, granulocitos, sistema monolito-macrófago e inflamación. En Tratado de Fisiología Médica (429-438). Madrid: Elsevier.
44. Fragoso Lona, José Manuel; Sierra Martínez, Mónica; Vargas Alarcón, Gilberto; Barrios Rodas, Angélica; Ramírez Bello, J., & Fragoso, J. M. (2013). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares. Biología Molecular Y Genética, 149(5), 521–530.
45. Pradhan A., Manson J., Rifai N., Buring J., Ridker P. (2001) C-Reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. 86(3): 327-334.
46. Heinrich P., Castell J., Andus T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. 265: 621-636
47. Simón, E., & Del Barrio, A. S. (2002). Leptina y obesidad. Anales Del Sistema Sanitario de Navarra, 25(1): 53–64.
48. Valladares, M., Obregón, A. M., Weisstaub, G., Burrows, R., Patiño, A., Ho-Urriola, J., & Santos, J. L. (2014). [Association between feeding behavior, and

- genetic polymorphism of leptin and its receptor in obese chilean children]. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1044–51.
49. Gcg, N. P., Factor, N., Schéle, E., Grahnmemo, L., Anesten, F., Hallén, A., & Bäckhed, F. (2013). the Expression of the Obesity-Suppressing, 154(October), 3643–3651.
 50. Cadwell K. (2015) The virome in host health and disease. 42: 805-813.
 51. Scarpellini, E., Ianiro, G., Attili, F., Bassanelli, C., De Santis, A., & Gasbarrini, A. (2015). The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 47(12), 1007–1012.
 52. Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G. Y., Nagy, A., ... Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–23.
 53. Sbahi, H., & Palma, J. A. Di. (2016). Faecal microbiota transplantation: applications and limitations in treating gastrointestinal disorders, 3: e000087.
 54. Shaw, K. A., Bertha, M., Hofmekler, T., Chopra, P., Vatanen, T., Srivatsa, A., ... Kugathasan, S. (2016). Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Genome Medicine*, 8(75): 2-13.
 55. Merete Ellekilde, Ellika Selfjord, Christian S. Larsen, Maja Jakesevic, Ida Rune, Britt Trangberg, Finn K. Vogensen, Dennis S. Nielsen, Martin I. Bahl, Tine R. Licht, Axel K. Hansen, Camilla H. F. Hansen. (2014). Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Scientific Reports*, 10: 241-245.
 56. Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Alexis, E., Kau, A. L., ... Walters, W. A. (2014). Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science*, 341(6150), 1–22.
 57. Borody, T. J., Brandt, L. J., & Paramsothy, S. (2014). Therapeutic faecal microbiota transplantation: current status and future developments; 30(1): 97-105
 58. Cammarota G., Masucci L., Laniro G., Dinoi G., Costamagna G., Sanguinetti M., Gasbarrini A. (2015) Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation

- by colonoscopy vs. Vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. 41(9): 835-843.
59. Vrieze A., Van Noos E., Salojärvi J., Kootte RS., Bartelsman JF., Dallinga-Thie GM., Ackermans MT., Serlie mj, Oozer R., Derrien M., Druessne A., Van Hylckama JE., Blocks VW., Groen AK, Heiling HG, Zoetendal EG. (2012) Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome; 143(4):913-916.
60. Brandt LJ., Aroniadis OC., Mellow M., Kanatzar A., Kelly C., Park T., Stollman N., Rohlke F., Surawicz C. (2012) Long.term follow-up of coloscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection; 107(7): 1079-1087.
61. Balibrea, J. A. J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2, 22(2), 160–168.
62. Pozo A., Mancera R., Pérez M., Fernández A., López F. Recomendaciones de buena práctica en el tratamiento de la dislipidemia en diabetes, 2: 89-98
63. Abedon S., Kuhl S., Blasdel B., Martin E. (2011). Phage treatment of human infections, 1(2): 66-85
64. Baltimore D. (1971) Expression of animal virus genomes, 35(3): 235-241

16. Anexos

15.1 Instrumento de recolección de información

Medición -----	Inicial	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 36
Grupo 1: ratones transferidos con viroma de ratones sanos						
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						
Ratón 5						
Grupo 2: ratones transferidos con microbiota de ratones sanos						
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						
Ratón 5						
Grupo 3: ratones transferidos con viroma de ratones diabéticos						
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						
Ratón 5						
Grupo 4: ratones transferidos con microbiota de ratones diabéticos						
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						

16.2 Instructivos

16.2.1 Instructivo para uso de Glucómetro One Touch Ultra Mini

Configuración del sistema

Manejo del medidor de glucosa en sangre OneTouch® UltraMini™ y las tiras reactivas

VISTA FRONTAL Pantalla: La unidad de medida predeterminada es el mg/dL.

VISTA POSTERIOR con la tapa del compartimento de la pila abierta.

Botones de navegación: Encienden y apagan el medidor. Permiten seleccionar o modificar información.

Tira reactiva: Se insertan en el puerto de análisis.

Puerto de datos.

Encendido del medidor

Para realizar un análisis, inserte una tira reactiva hasta que no avance más. La pantalla se encenderá y el medidor realizará unas breves comprobaciones del sistema. **O bien**, para cambiar la hora y la fecha, con el medidor apagado, mantenga pulsado el botón **▼** durante cinco segundos hasta que aparezca la pantalla de comprobación inicial. Después de la pantalla de comprobación, aparecerán en la pantalla la hora y la fecha predeterminadas. **O bien**, si desea encender el medidor para consultar resultados anteriores, con el medidor apagado, pulse el botón **▼**.

Cada vez que encienda el medidor, aparecerá una pantalla de comprobación inicial durante dos segundos. Todos los elementos de la pantalla deberían aparecer brevemente durante la comprobación, lo que indica que el medidor está funcionando correctamente. Para comprobar que funcionan todos los segmentos de la pantalla, en cuanto aparezca la pantalla de comprobación inicial, mantenga pulsado el botón **▲** para que esta pantalla no desaparezca. Suelte el botón **▲** para continuar con el siguiente paso.

Apagado del medidor

Si el medidor no se enciende, pruebe cambiándole la pila. Consulte las páginas 37-39.

Existen distintas formas de apagar el medidor:

- Si está consultando resultados anteriores, mantenga pulsado el botón **▼** durante dos segundos.
- Si no se usa durante dos minutos, el medidor se apaga solo.
- Antes o después de un análisis, extraiga la tira reactiva.

PRECAUCIÓN: Si faltan segmentos en la pantalla de comprobación inicial, puede que el medidor no funcione correctamente. Llame gratuitamente a la Línea de Atención al Cliente OneTouch® respectiva para su país.

Inicio del proceso de análisis

PRECAUCIÓN: El frasco de las tiras reactivas contiene desecantes que podrían ser nocivos si se inhalan o ingieren y producir irritaciones en la piel o en los ojos.

Paso 1

Inserte una tira reactiva para encender el medidor

Comience con el medidor apagado. Si lo ha encendido para modificar la configuración o consultar resultados anteriores, apáguelo. Saque una tira reactiva del frasco. Con las manos limpias y secas, puede tocar la tira reactiva en cualquier parte de su superficie. No doble, corte, ni modifique las tiras reactivas de manera alguna. Utilice la tira reactiva inmediatamente después de haberla sacado del frasco.

Sujete el medidor como se indica en la figura e inserte la tira reactiva en el puerto de análisis. Asegúrese de que las tres barras de contacto estén de cara a usted. Presione la tira reactiva hacia el interior hasta que no avance más. No doble la tira reactiva.

PRECAUCIÓN: Las tiras reactivas OneTouch® Ultra® son para un solo uso. No reutilice nunca una tira reactiva sobre la que se haya aplicado previamente sangre o solución control.

Después de la pantalla de comprobación inicial, aparecerá el código del análisis más reciente. Si en lugar del código aparecen una **C** constante y **---** parpadeando como si fuera la primera vez que usa el medidor, consulte las instrucciones de la página siguiente para cambiar el código numérico.

Nota: Si aparece la pantalla con el icono de la gota de sangre que parpadea **▲** antes de haber comprobado que los códigos coinciden, saque la tira reactiva, espere hasta que se apague el medidor y, a continuación, vuelva a empezar por el paso 1, consulte la página 7.

Si pulsa el botón **▲** por error, de modo que aparezca el símbolo de análisis con solución control **CTL** en la pantalla, vuelva a pulsar **▲** para volver a la pantalla con el icono de la gota de sangre que parpadea **▲**.

PRECAUCIÓN: Para obtener resultados exactos, es fundamental que el código del medidor y de las tiras reactivas coincidan. Cada vez que realice un análisis, asegúrese de que los números de los códigos coincidan.

Información sobre los mensajes de error y otros mensajes

El medidor OneTouch® UltraMini™ muestra diferentes mensajes cuando hay problemas con la tira reactiva o el medidor, o bien si sus niveles de glucosa en sangre superan los 600 mg/dL o son inferiores a 20 mg/dL. No todos los problemas se indican a través de mensajes. Pueden obtenerse resultados incorrectos sin que aparezcan mensajes de advertencia.

Mensaje	Significado	Qué hacer
LO 31-8 mg/dL	Es posible que tenga un nivel de glucosa en sangre muy bajo (hipoglucemia severa), inferior a 20 mg/dL.	Es posible que necesite un tratamiento inmediato, según las indicaciones de su médico . Aunque este mensaje podría deberse a un error al realizar el análisis, es más seguro administrar el tratamiento primero y después repetir el análisis.
HI 8-18 mg/dL	Puede que tenga un nivel de glucosa en sangre muy alto (hiperglucemia severa), superior a 600 mg/dL.	Vuelva a comprobar su nivel de glucosa. Si el resultado vuelve a ser HI (glucosa alta), consulte a su médico en cuanto sea posible y siga sus indicaciones.

Mensaje

Significado

Qué hacer

HI

El medidor ha detectado que la temperatura es superior al intervalo de funcionamiento del sistema. No realice ningún análisis hasta que el medidor y las tiras reactivas hayan alcanzado una temperatura dentro del intervalo de funcionamiento del sistema (6-44°C).

Repita el análisis cuando el medidor y las tiras reactivas hayan alcanzado una temperatura dentro del intervalo aceptado por el sistema.

LO

El medidor ha detectado que la temperatura es inferior al intervalo de funcionamiento del sistema. No realice un análisis hasta que las temperaturas del medidor y de las tiras reactivas hayan alcanzado una temperatura dentro del intervalo de funcionamiento del sistema (6-44°C).

Repita el análisis cuando el medidor y las tiras reactivas hayan alcanzado una temperatura dentro del intervalo aceptado por el sistema.

Mensaje

Significado

Qué hacer

--- mg/dL

No hay resultados en la memoria; como la primera vez que usa el medidor. O bien, el medidor no ha podido guardar el resultado.

Er1

Este mensaje de error indica que existe algún problema con el medidor.

Er2

Este mensaje de error puede deberse a que la tira reactiva ya está usada o indicar un problema en el medidor.

No use el medidor. Llame gratuitamente a la Línea de Atención al Cliente OneTouch® respectiva para su país.

Repita el análisis con una tira reactiva nueva; consulte las páginas 22-25. Si sigue apareciendo este mensaje, llame gratuitamente a la Línea de Atención al Cliente OneTouch® respectiva para su país.

Mensaje

Significado

Qué hacer

Er3

Este mensaje de error indica que la muestra de sangre o la solución control se aplicó antes de que el medidor estuviera preparado.

Er4

Puede darse uno de los siguientes casos:

- Puede que tenga un nivel de glucosa alto y se haya realizado el análisis en un lugar cuya temperatura ambiente esté próxima al límite inferior del intervalo de funcionamiento del sistema (6-44°C).
- O bien,

Si ha realizado el análisis en un lugar frío, repita en un sitio más cálido empleando una tira reactiva nueva; consulte las páginas 22-25. Si sigue apareciendo este mensaje, llame gratuitamente a la Línea de Atención al Cliente OneTouch® respectiva para su país.

continúa en la siguiente página

16.2.2 Instructivo para determinación cuantitativa de IL- 6 por ELISA


CERTIFICATE OF ANALYSIS
Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!

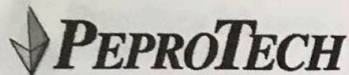
Ref #: 88-7064-88
Lot #: 4313553
Set Expiration Date: 01/2018
Contents:

- 1. Capture Antibody: Anti-Mouse IL-6 Purified (250X)**
Ref #: 14-7061-68 **Lot #: 4313607**
0.5 mL, 1 vial
Dilution: Per plate, add 48 µL of Capture Antibody to 12 mL of 1X Coating Buffer.
- 2. Standard: Mouse IL-6 Lyophilized Standard**
Ref #: 29-8061-60 **Lot #: 4309864**
10 vials
Reconstitution: Add 1 mL of DI water to vial. Allow to sit for 15 minutes with gentle agitation prior to dilution. The concentration of reconstituted Standard is 15 ng/mL.
Dilution: Add 100 µL of Standard to 2900 µL of 1X ELISA/ELISPOT Diluent to prepare the top standard concentration (500 pg/mL).
Note: Single-use vials. Use within 4 hours of reconstitution and discard after use. Dilute only as shown above to ensure accurate recovery.
- 3. Detection Antibody: Anti-Mouse IL-6 Biotin (250X)**
Ref #: 13-7062-68A **Lot #: 4309016**
0.5 mL, 1 vial
Dilution: Per plate, add 48 µL of Detection Antibody to 12 mL of 1X ELISA/ELISPOT Diluent.
- 4. Enzyme: Avidin-HRP (250X)**
Ref #: 00-4100-94 **Lot #: 4298336**
0.5 mL, 1 vial
Dilution: Per plate, add 48 µL of Enzyme to 12 mL of 1X ELISA/ELISPOT Diluent.
- 5. 5X ELISA/ELISPOT Diluent**
Ref #: 00-4202-55 **Lot #: 4298344**
150 mL, 1 bottle
Dilution: Add 10 mL of 5X ELISA/ELISPOT Diluent to 40 mL of DI water.
- 6. Substrate: 1X TMB Solution**
Ref #: 00-4201-56 **Lot #: E096438**
100 mL, 1 bottle
Working concentration.
- 7. 10X Coating Buffer**
Ref #: 00-0000-53 **Lot #: 4307659**
12 mL, 1 bottle
Dilution: Add 12 mL of 10X Coating Buffer to 108 mL of DI water.

Note: Use only the components included in the set. Changing components may cause a change in signal.

Quality Assurance Approval/Date: MPA 09/28/16
88-7064-88 C_09 c/o 42379 (08/24/2016)

Affymetrix, Inc. • 10255 Science Center Drive, San Diego, CA 92121 • Tel: 888-999-1371 • Fax: 858-642-2046 • ebioscience.affymetrix.com



Data Sheet

Princeton Business Park, 5 Crescent Ave., P.O. Box 275
Rocky Hill, NJ 08553 USA
Tele: 609.497.0253 Fax: 609.497.0321
www.peprotech.com Email: info@peprotech.com

Murine Leptin Standard ABTS ELISA Development Kit

Catalog# 900-K76

Lot# 0608076

Expiration one year from date of receipt

Description: Murine Leptin ELISA development kit contains the key components required for the quantitative measurement of natural and/or recombinant Murine Leptin in a sandwich ELISA format within the range of 20–1250pg/ml. Using the ELISA protocol described below, the recommended microplates, reagents and solutions, the components supplied in this kit are sufficient to assay Murine Leptin in approximately 1000 ELISA plate wells.

RECONSTITUTION & STORAGE

Capture Antibody: 100µg of Rabbit Anti-Murine Leptin + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Detection Antibody: 100µg of Biotinylated Rabbit Anti-Murine Leptin + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Murine Leptin Standard: 1µg of Recombinant Murine Leptin + 2.2mg BSA + 11.0mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 1µg/ml.

Note: The reconstituted components are stable for 2 weeks when stored at 2–8°C. Components that have been reconstituted and aliquoted can be stored at –20°C for up to 6 months.

Avidin-HRP Conjugate: 60µl vial. Upon receipt, avidin-HRP conjugate should be aliquoted into ten 6µl vials and stored at ≤–20°C. Aliquots stored frozen at ≤–20°C are stable for up to 2 years from date of receipt. Avoid more than one freeze-thaw cycle.

Avidin should be used in conjunction with ABTS only.

RECOMMENDED MATERIALS

ELISA microplates (Nunc MaxiSorp Prod. # 439454, or Corning Prod # 3590);
Tween-20 (Sigma Cat. # P-7949);
BSA (Sigma Cat # A-7030);
ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. # A3219);
Dulbecco's PBS [10x] (Gibco BRL Cat. # 14200-075).

RECOMMENDED SOLUTIONS

All solutions should be at ambient temperature prior to use.

PBS: dilute 10xPBS to 1xPBS, pH 7.20 in sterile water.

Wash Buffer: 0.05% Tween-20 in PBS

Block Buffer: 1% BSA in PBS *

Diluent: 0.05% Tween-20, 0.1% BSA in PBS *

* Sterile filter and store at 4°C for up to 1 week.

PLATE PREPARATION

1. Dilute capture antibody with PBS to a concentration of 1.0µg/ml. Immediately, add 100µl to each ELISA plate well. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate the wells to remove liquid and wash the plate 4 times using 300µl of wash buffer per well. After the last wash invert plate to remove residual buffer and blot on paper towel.
3. Add 300µl block buffer to each well. Incubate for at least 1 hour at room temperature.
4. Aspirate and wash plate 4 times.

ELISA PROTOCOL

Standard/Sample: Dilute standard from 1.25ng/ml to zero in diluent. Immediately add 100µl of standard or sample to each well in triplicate. Incubate at room temperature for at least 2 hours.

Detection: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute detection antibody in diluent to a concentration of 1.0µg/ml. Add 100µl per well. Incubate at room temperature for 2 hours.

Avidin-HRP Conjugate: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute 5.5µl of avidin-HRP conjugate 1:2000 in diluent for a total volume of 11ml. Add 100µl per well. Incubate 30 minutes at room temperature.

ABTS Liquid Substrate:

(ABTS Substrate should be at ambient temperature prior to use)

Aspirate and wash plate 4 times. Add 100µl of substrate solution to each well. Incubate at room temperature for color development. Monitor color development with an ELISA plate reader at 405nm with wavelength correction set at 650nm.

NOTE: Reliable standard curves are obtained when either O.D. readings do not exceed 0.2 units for the zero standard concentrations, or 1.2 units for the highest standard concentration. The plate should be monitored at 5-minute intervals for approximately 30 minutes. *O.D. readings may vary.*

CROSS REACTIVITY

When tested at 50ng/ml the following antigens exhibited complete O.D. saturation:

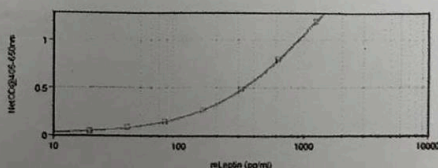
Rat Leptin

When tested at 50ng/ml the following antigens exhibited less than 2% cross reactivity:

Human Leptin

When tested at 50ng/ml the following antigens did not exhibit significant cross reactivity:

Human GLP-1, IL-1α, IL-1β, Resistin, Visfatin
Murine IL-1α, IL-1β, Resistin
Rat IL-1α, IL-1β





TRIGLYCERIDES -LQ

Triglicéridos-LQ

GPO-POD. Líquido

Determinación cuantitativa de triglicéridos

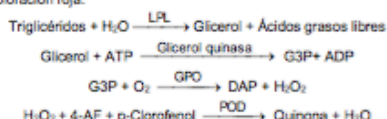
IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada^{1,2,3}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre. Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos. Su aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias, como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitus, pueden estar asociadas con su elevación^{4,5,7}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R (Nota 2)	GOOD pH 6.3	50 mmol/L
	p-Clorofenol	2 mmol/L
	Lipoprotein lipasa (LPL)	150000 U/L
	Glicerol quinasa (GK)	500 U/L
	Glicerol-3-oxidasa (GPO)	3500 U/L
	Peroxidasa (POD)	440 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,1 mmol/L
ATP		0,1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL Patrón primario acuoso		200mg/dL

PREPARACIÓN

El reactivo y el patrón están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Deterioro de los reactivos

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del blanco a 505 nm $\geq 0,26$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero y plasma¹.
Estabilidad de la muestra: 5 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 (490-550) nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
 - Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
 - Pipetear en una cubeta (Nota 4):
- | | Blanco | Patrón | Muestra |
|----------------------------|--------|--------|---------|
| R (mL) | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Patrón (Nota 3) (μ L) | — | 10 | — |
| Muestra (μ L) | — | — | 10 |
- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 min. a 15-25°C.

- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CÁLCULOS

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dL de triglicéridos en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL $\times 0,0113$ = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINCONTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, el reactivo y el material de calibración. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Hombres:	40 – 160 mg/dL
Mujeres:	35 – 135 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,00 mg/dL hasta el límite de linealidad 1600 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Exactitud:

	Intraserie (n=20)	Interserie (n=20)
Media (mg/dL)	109	224
SD	0,64	1,01
CV (%)	0,58	0,45

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0013 (A).

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r^2): 0,99810.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,9176x - 0,5426$

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con bilirrubina < 170 μ mol/L, hemoglobina < 10 g/L².

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de los triglicéridos^{4,5}.

NOTAS

- TRIGLYCERIDES CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- LCF (Lipid Clearing Factor) está integrado en el reactivo.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19 (5): 476-482.
- Fossati P et al. Clin. Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
- Kaplan A et al. Tryglycerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

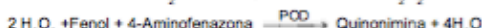
Ref. 41030	R:1 x 50 mL, CAL: 1 x 2 mL
Ref. 41031	R:2 x 150 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref. 41032	R:1 x 100 mL, CAL: 1 x 2 mL
Ref. 41033	R:1 x 500 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref. 41034	R:1 x 1000 mL, CAL: 1 x 5 mL

Determinación cuantitativa de colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{3,6}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	PIPES pH 6.9	90 mmol/L
	Fenol	26 mmol/L
	Colesterol esterasa (CHE)	1000 U/L
	Colesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
	Peroxidasa (POD)	650 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0.4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Patrón primario acuoso de Colesterol	

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias (A) del Blanco a 505 nm ≥ 0.26 .

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma^{1,2}. Estabilidad de la muestra 7 días a 2-8°C y 3 meses si se mantiene la muestra congelada (-20°C).

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (500-550).
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (Nota 1-2) (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

CÁLCULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0258 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Evaluación del riesgo^{3,6}:

Menos de 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Moderado
240 o más	Alto

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,113 mg/dL hasta el límite de linealidad 750 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	99.789	185.309	96.346	184.962
SD (mg/dL)	1.213	1.405	4.196	12.773
CV (%)	1.216	0.758	4.355	6.906

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0015 (A).

Exactitud: Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,9968.

Ecuación de la recta de regresión: y = 0.9797x + 2.2803.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias de hemoglobina hasta 5 g/L y bilirrubina hasta 10 mg/dL^{1,2}. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol^{3,4}.

NOTAS

- CHOLESTEROL CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- LCF (Lipid Clearing Factor) está integrado en el reactivo.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1194-11206 and 437.
- Meiattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24 (12): 2161-2165.
- Young D.S. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young D.S. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 41020	Cont.	2 x 50 mL
Ref: 41022		2 x 100 mL
Ref: 41021		2 x 250 mL
Ref: 41019		1 x 1000 mL



IMPORTADORES EXCLUSIVOS: LAB CENTER DE MEXICO S.A. DE C.V.
Colina de las Termas #35 Fracc. Boulevard Naucalpan Edo. de México C.P. 53140
TEL: 01 (55) 5360-6772 LADA SIN COSTO 01 800 500 SPIN (7746)
www.spinreact.com.mx info@spinreact.com.mx



16.3 HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

No aplica, no se trabajó con humanos.

16.4 Hoja de registro de protocolo en institución



CARTA COMPROMISO DE ASESOR PRINCIPAL DE TESIS

Puebla, Pue. a 30 de agosto de 2018

H. Comité Académico del Posgrado
Presente:

Por medio de la presente hago llegar a ustedes la postulación del C. Elisa Morales Montes, que en caso de ser aceptado en el

Programa académico: Maestría en Ciencias de la Salud
Maestría en Nutrición Clínica ☒

Desarrollará su trabajo de tesis bajo mi asesoría, supervisión y dirección; el tema de investigación propuesto es:

Asociación del vírcoma intestinal con la diabetes tipo 2 en
un modelo murino.

Me comprometo a dar seguimiento permanente a las actividades del estudiante derivadas de esta propuesta, y manifiesto contar con la infraestructura requerida para lograr los objetivos propuestos en el tiempo programado, en caso de que el postulante sea admitido y el comité tutorial apruebe el proyecto de tesis. También me comprometo a revisar y autorizar los seminarios de Investigación semestrales que el estudiante presentará, así como atender las recomendaciones que el comité académico emita; manifiesto que conozco el plan de estudios y acordaré con el estudiante las asignatura optativa que deberá cursar, de tal forma que fortalezca el proyecto de investigación y su formación profesional, en los tiempos más pertinentes para ello. Así como favorecer todas las acciones pertinentes para que obtenga el grado en un plazo máximo a 6 meses posteriores a la terminación de los créditos académicos.

Atentamente

Dr. Delia Vanessa López Guerrero

Nombre y Firma.

(Grado académico, puesto, Institución, dirección y teléfono)

Profesor Investigador de tiempo completo
en la Facultad de nutrición UAEM

UPAEP
21 Sur 1103
Barrio de Santiago
Puebla, Pue. México
C.P. 72410

Tel: 01 (222) 239 9400
Fax: 01 (222) 238 5251
01 800 224 2200
www.upaep.mx