



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



**Efecto de dieta alta en grasa y fructosa en la función
intestinal asociado a alteraciones metabólicas**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Microbiología

Presenta:

Carla Victoria Navarrete Molina

Dirigida por:

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Santiago de Querétaro, Qro. Mayo de 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto de dieta alta en grasa y fructosa en la función
intestinal asociado a alteraciones metabólicas

por

Carla Victoria Navarrete Molina

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: CNLIN-242840



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

“Efecto de dieta alta en grasa y fructosa en la función intestinal asociado a alteraciones metabólicas”.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Microbiología

Presenta:

Carla Victoria Navarrete Molina

Dirigido por:

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Sinodales:

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano
Presidente

Firma

M. en C. Perla Viridiana Ocampo Anguiano
Secretario

Firma

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez
Vocal

Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez
Suplente

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Suplente

Firma

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
1 de mayo de 2023
México

RESUMEN

La proporción cada vez mayor de grasa y azúcares en la dieta occidental ha contribuido al aumento de la incidencia de enfermedades metabólicas como la obesidad. Por lo que, con el objetivo de evaluar el impacto metabólico y sobre la función intestinal de este tipo de dieta en un modelo animal de obesidad, se alimentaron ratas Wistar macho con una dieta estándar de laboratorio (SD) o una dieta rica en grasa (20%) y fructosa (20%) (HFFD). Después de 16 semanas de alimentación, se encontró que el peso corporal de las ratas HFFD fue un $14.63 \pm 3.88\%$ más alto que el del grupo SD ($p < 0.05$), así como su IMC ($p < 0.005$) e índice de Lee ($p < 0.05$), indicando desarrollo de obesidad en estos animales. La glucosa en sangre a los 30, 60, 90 y 120 min fue más alta que la del grupo SD ($p \leq 0.005$) durante la administración por canulación intragástrica. Así mismo, el AUC fue 32.51% mayor en el grupo HFFD ($p \leq 0.005$), indicando intolerancia a la glucosa. El nivel de colesterol total fue de 84.62 ± 10.17 mg/dL, el de triglicéridos de 134.65 ± 9.20 mg/dL y el de glucosa de 130.94 ± 16.26 mg/dL para el grupo HFFD, lo que indicó el desarrollo de hipertrigliceridemia e hiperglucemia. Por otro lado, no hubo cambios significativos en la biometría hemática de los animales del grupo HFFD. Sin embargo, la IRM indicó que los animales del grupo HFFD presentaron tres veces más grasa visceral ($p = 0.0003$) y dos veces más grasa subcutánea ($p = 0.008$) que el grupo SD. Asimismo, el peso del hígado aumentó 21.14% ($p < 0.005$) en el grupo HFFD, mientras que la proporción del peso del intestino y el colón con respecto al peso corporal del animal disminuyeron 19.7% ($p < 0.05$) y 18% ($p < 0.05$), respectivamente, lo cual es indicativo de posibles desregulaciones metabólicas e intestinales asociadas a obesidad. Adicionalmente, el ensayo de permeabilidad intestinal con FICT-dextrano reveló un drástico aumento de ésta en el grupo HFFD ($p \leq 0.005$), lo cual ha sido asociado a disbiosis intestinal. Finalmente, se cultivaron bacterias intestinales a partir de heces de rata en medios de cultivo especializados para el aislamiento de *Clostridium* spp., *Bacteroidetes* spp. y *Lactobacillus* spp. A mediano plazo se busca asociar cambios en la presencia de estas bacterias en los intestinos de ratas alimentadas con la dieta hipercalórica de esta tesis.

Palabras clave: obesidad, dieta alta en grasa y fructosa, alteraciones metabólicas, disbiosis y permeabilidad intestinal.

SUMMARY

The increasing proportion of fat and sugars in the Western diet has contributed to the increased incidence of metabolic diseases such as obesity. Therefore, with the aim of evaluating the metabolic and intestinal impact of this type of diet in an animal model of obesity, male Wistar rats were fed a standard laboratory diet (SD) or a high-fat (20%) and fructose (20%) diet (HFFD). After 16 weeks of feeding, it was found that the body weight of the HFFD rats was $14.63 \pm 3.88\%$ higher than that of the SD group ($p < 0.05$), as well as their BMI ($p < 0.005$) and Lee index ($p < 0.05$), indicating the development of obesity in these animals. Blood glucose at 30, 60, 90 and 120 min was higher than that of the SD group ($p \leq 0.005$) during administration by intragastric cannulation. Similarly, the AUC was 32.51% higher in the HFFD group ($p \leq 0.005$), indicating glucose intolerance. Total cholesterol level was 84.62 ± 10.17 mg/dL, triglycerides 134.65 ± 9.20 mg/dL and glucose 130.94 ± 16.26 mg/dL for the HFFD group, indicating the development of hypertriglyceridemia and hyperglycemia. On the other hand, there were no significant changes in the hematic biometry of the animals in the HFFD group. However, the MRI indicated that the animals of the HFFD group presented three times more visceral fat ($p = 0.0003$) and two times more subcutaneous fat ($p = 0.008$) than the SD group. Likewise, the weight of the liver increased 21.14% ($p < 0.005$) in the HFFD group, while the proportion of the weight of the intestine and the colon with respect to the body weight of the animal decreased by 19.7% ($p < 0.05$) and 18% ($p < 0.05$), respectively, which is indicative of possible metabolic and intestinal dysregulations associated with obesity. Additionally, the intestinal permeability test with FICT-dextran revealed a drastic increase in it in the HFFD group ($p \leq 0.005$), which has been associated with intestinal dysbiosis. Finally, intestinal bacteria were cultured from rat feces in specialized culture media for the isolation of *Clostridium* spp., *Bacteroidetes* spp. and *Lactobacillus* spp. In the medium term, we seek to associate changes in the presence of these bacteria in the intestines of rats fed with the hypercaloric diet of this thesis.

Keywords: obesity, diet high in fat and fructose, metabolic disorders, dysbiosis and intestinal permeability.

DEDICATORIAS

A mi familia, que me enseñó que el éxito no es una cuestión de suerte o talento innato, sino el resultado del esfuerzo y los hábitos constantes practicados a lo largo del tiempo.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios y a mis padres por su infinito amor. Su orientación y motivación constantes han sido la fuerza impulsora detrás de mi éxito académico. Estoy eternamente agradecida por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi trayectoria académica, y especialmente durante la realización de mi tesis.

- A mi hermano, gracias por estar siempre ahí para mí. Los momentos divertidos y tus palabras de aliento me motivaron muchas veces para seguir adelante cuando los tiempos se pusieron difíciles.

- A mis abuelitos que han jugado un papel crucial en mi éxito y quiero agradecerles por su amor, apoyo y orientación a lo largo de mi vida. Su disciplina, consejos y oraciones me han dado la fuerza para lograr mis metas y mi mayor recompensa es que se sientan orgullosos de mí.

- A mis amigos sin quienes la carrera hubiese sido increíblemente difícil. Recordaré con mucho cariño todos los momentos que pasamos juntos a lo largo de estos años.

- A mis maestros, por su dedicación y compromiso con la educación. Su pasión por la ciencia y su esfuerzo por ayudar a sus alumnos a crecer académicamente han sido un ejemplo para mí.

-Al Fondo para el desarrollo del Conocimiento, FONDEC 2021, que financió el proyecto “Los compuestos bioactivos provenientes de la dieta disminuyen alteraciones en microbiota y en metabolismo hepático relacionados con inflamación, mediante regulación de Nrf2 sobre la expresión de PPAR α y NF κ B”, del cual fui becaria.

-A mi directora de tesis, la Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano, y a mi sinodal, la M. en C. Perla Viridiana Ocampo Anguiano, por su orientación, apoyo y disposición durante todo este tiempo. Su experiencia y conocimientos han sido invaluable para mí a lo largo del proceso de investigación.

- A mi comité sinodal integrado por el Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez, la Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez y el Dr. Fausto Arellano Carbajal, por sus comentarios y aportaciones.

- A la MVZ. Verónica Andrade Portillo del Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales y al M. en C. Josué López Martínez del Laboratorio de Biología Celular y Molecular por el apoyo brindado.

- Al Dr. Jesús Ortiz y al Dr. Luis Concha Loyola del Laboratorio Nacional de Imagenología y resonancia magnética, INB, UNAM Juriquilla por el servicio brindado.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	2
	2.1. Relación entre dieta y obesidad	2
	2.2. Dietas altas en grasa y fructosa en ratas	3
	2.3. Alteraciones fisiológicas y metabólicas en ratas asociadas al consumo de una HFFD	5
	2.4. Disbiosis intestinal en ratas asociada al consumo de una HFFD	8
	2.4.1. Alteraciones del eje metabólico huésped-microbiota inducidas por una HFFD	10
	2.4.2. Cambios especie-específicos de la microbiota intestinal de ratas inducidos por el consumo de una HFD	12
	2.4.3. Técnicas de cultivo para el estudio de la composición microbiana intestinal	13
III.	JUSTIFICACIÓN	18
IV.	HIPÓTESIS	18
V.	OBJETIVOS	19
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	6.1. Animales experimentales	19
	6.2. Dieta y grupos experimentales	19
	6.3. Peso corporal e ingesta de alimento	19
	6.4. Percentiles de peso y edad	19
	6.5. Curva de tolerancia a la glucosa	20
	6.6. Análisis de la permeabilidad intestinal <i>in vivo</i>	20
	6.7. Distribución y cuantificación de la grasa corporal (visceral y subcutánea)	22
	6.8. Obtención de muestras de sangre y órganos	22

6.9. Índices de Lee, orgánicos y riesgo cardiovascular	22
6.10. Cultivo de bacterias intestinales	23
6.10.1. <i>Clostridium</i> spp.	23
6.10.2. <i>Bacteroides</i> spp.	24
6.10.3. <i>Lactobacillus</i> spp.	25
6.11. Análisis estadístico	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1. Efecto de la HFFD sobre los parámetros corporales	26
7.2. Efecto de la HFFD sobre el consumo de alimento, agua y energía	30
7.3. Efecto de la HFFD sobre los parámetros de glucosa y lípidos	30
7.4. Efecto de la HFFD sobre los parámetros hematológicos	33
7.5. Efecto de la HFFD sobre el peso e índices orgánicos	36
7.6. Efecto de la HFFD sobre el tejido adiposo visceral y subcutáneo	38
7.7. Efecto de la HFFD sobre la permeabilidad intestinal	40
7.8. Cultivo de <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp.	41
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ANEXO

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Formulación del medio BHI-PRAS	23
Tabla 2	Formulación del agar BHI	24
Tabla 3	Formulación del medio BFS	24
Tabla 4	Formulación del medio PBS-PRAS	25
Tabla 5	Formulación del agar LAMAB	26
Tabla 6	Efecto de la HFFD en parámetros corporales	28
Tabla 7	Clasificación de los animales de acuerdo a los percentiles de peso y edad para ratas macho Wistar	29
Tabla 8	Consumo de alimento, energía y agua	30
Tabla 9	Efecto de la HFFD en las concentraciones de glucosa y lípidos en suero	31
Tabla 10	Efecto de la HFFD en la biometría hemática	35
Tabla 11	Efecto de la HFFD en el peso, longitud y volumen de órganos y tejidos	36
Tabla 12	Efecto de la HFFD en los índices de Lee y orgánicos	38
Tabla 13	Cultivo de <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp. en medios especializados.	42
Tabla 14	Colonias aisladas en medios especializados para el cultivo de <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp.	47
ANEXO		
Tabla 1A	Composición de las dietas estándar (SD) y alta en grasas y azúcares (HFFD)	
Tabla 2A	Contenido nutrimental de los ingredientes de las dietas experimentales	
Tabla 3A	Contenido de energía, nutrimentos y fibra de las dietas por cada 100 g de alimento	

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Efecto de la HFFD en el peso corporal por semana	27
Figura 2	Efecto de la HFFD en el IMC por semana	29
Figura 3	Efecto de la HFFD en la respuesta de la glucemia posprandial	32
Figura 4	Área bajo la curva en la prueba de tolerancia glucémica intraperitoneal	33
Figura 5	Efecto de la HFFD sobre el tejido adiposo visceral y subcutáneo	40
Figura 6	Efecto de la HFFD sobre la permeabilidad intestinal	41

ANEXO

Figura 1A	Delta del peso y peso final	
Figura 2A	Circunferencias visceral, torácica e índice CV/CT	
Figura 3A	Consumo semanal y promedio de alimento, energía y agua	
Figura 4A	Curva de crecimiento de peso corporal de ratas machos Wistar en función de la edad	
Figura 5A	Curva estándar de la concentración de FICT-dextrano en suero sanguíneo	

I. INTRODUCCIÓN

La proporción cada vez mayor de grasa y azúcares en la dieta occidental se considera uno de los principales factores desencadenantes de las alteraciones metabólicas que conllevan al desarrollo de enfermedades como la obesidad (Serino *et al.*, 2012). Esta patología se ha convertido en un problema mundial que afecta la salud tanto de niños como de adultos, y representa uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como dislipidemias, hipertensión y diabetes tipo 2 (Serino *et al.*, 2012).

La obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa corporal ocasionada por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, por lo que los hábitos dietéticos son uno de los principales factores que desencadenan esta condición (Martínez *et al.*, 2002). Esto ha hecho necesaria la investigación sobre las repercusiones para la salud de la ingesta prolongada de dietas con una alta proporción grasa y azúcares, mediante el desarrollo de modelos animales que permitan estudiar los efectos de este tipo de patrones alimenticios sobre la composición corporal, el metabolismo y la función intestinal.

La obesidad también se caracteriza por la aparición de una inflamación generalizada leve y la producción de cambios en la microbiota del intestino (Forte *et al.*, 2020). Esta última tiene un rol fundamental en el metabolismo del huésped, ya que ayuda a degradar los nutrientes que de otro modo serían indigeribles (Forte *et al.*, 2020). Además, debido a que contribuye con el incremento de las reservas energéticas del huésped y la modulación de actividades hormonales a través de la producción de varios metabolitos, es capaz de influir en el metabolismo de la glucosa (Scheithauer *et al.*, 2020). En este sentido, los desequilibrios en la microbiota intestinal pueden desencadenar procesos patológicos como la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina hepática, aumentos de depósitos de grasa visceral y modificaciones del tejido adiposo blanco (Cani *et al.*, 2007; Backhed *et al.*, 2004). Por estas razones, la microbiota intestinal se ha perfilado como un factor para el desarrollo de la obesidad (Lecomte *et al.*, 2015), lo cual ha expuesto la necesidad de desarrollar métodos que permitan el aislamiento y la detección de cambios en la abundancia de especies bacterianas asociadas con esta enfermedad.

En esta tesis se empleó un modelo animal para estudiar el impacto sobre el metabolismo y la función intestinal del consumo prolongado de una dieta alta en grasa y fructosa (HFFD), con el fin de contribuir a comprender de forma más eficiente sus efectos perjudiciales sobre la salud. Además, se cultivaron bacterias intestinales aisladas de heces de rata en medios específicos para *Clostridium* spp., *Bacteroidetes* spp. y *Lactobacillus* spp. Ésto con el objetivo de que en estudios posteriores sea posible relacionar las alteraciones de la función intestinal observadas en este modelo de obesidad con la disbiosis de especies bacterianas pertenecientes a dichos géneros.

II. ANTECEDENTES

2.1. Relación entre dieta y obesidad

La obesidad es una enfermedad compleja que resulta de la mezcla de factores genéticos, metabólicos, hormonales, ambientales y conductuales (Martínez *et al.*, 2002). Sin embargo, el estilo de vida y la dieta son algunos de los principales factores desencadenantes de esta patología, sino es que los más relevantes. Las personas que consumen dietas altas en grasas (HFD), especialmente en ácidos grasos saturados, corren un mayor riesgo de padecer obesidad (Oyindasola, 2021). Del mismo modo, el consumo cotidiano de bebidas y alimentos ricos en azúcares está relacionado con el incremento de peso y tejido adiposo, principalmente visceral (Oyindasola, 2021).

Cuando la ingesta de energía excede el gasto energético se produce la obesidad. Las dietas ricas en grasas y azúcares, aportan una mayor proporción de energía que en las que predomina el consumo de carbohidratos complejos y proteínas (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013). Además, comúnmente las proporciones de grasas y carbohidratos complejos en la dieta se encuentran inversamente relacionadas (Oyindasola, 2021). Las dietas con un contenido de grasas bajo o moderado y altas en carbohidratos complejos (HCCD), tienden a aportar menos calorías que las HFD bajas en carbohidratos complejos (Oyindasola, 2021). Adicionalmente, los estudios en animales indican que las HFD provocan un efecto de menor saciedad en comparación con el que generan las HCCD, lo que conduce a una mayor ingesta de alimentos y el consecuente aumento de peso (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013).

El aumento del porcentaje de grasa y azúcares de la dieta también se asocia con un índice de masa corporal (IMC) elevado (Oyindasola, 2021). Esto se debe a que las HFD contribuyen al incremento de los depósitos de tejido graso del individuo (Martínez *et al.*, 2002); ya que cuando hay un exceso de energía proveniente de la dieta, el organismo favorece su almacenamiento en forma de lípidos, por ser macromoléculas con mayor densidad energética (9.3 Kcal/g) que la de los carbohidratos (3.79 Kcal/g) o las proteínas (3.12 Kcal/g) (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013). Además, el costo calórico de almacenar energía en forma de grasas es menor (3%), comparado al de hacerlo en forma de carbohidratos (28%) o proteínas (24%) (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013). Por otro lado, las dietas ricas en fibra y alimentos de origen vegetal contribuyen al control del peso corporal, por lo que las HCCD ($\geq 50\%$ de la ingesta energética total) se han asociado con la reducción del IMC en individuos sanos (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013).

En este sentido, la dieta mediterránea, caracterizada por el consumo de grandes cantidades de verduras, frutas, leguminosas, frutos secos, pan y pastas integrales; una moderada ingesta de aves, pescados, mariscos, huevos y productos lácteos; y un bajo consumo de carnes rojas; es considerada como el modelo alimentario más saludable del mundo (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013). Los países que siguen este patrón alimentario presentan tasas de morbilidad por enfermedades crónicas más bajas y mayor esperanza de vida que aquellos países con un patrón dietético occidental, en el que predomina el consumo de productos de origen animal y alimentos procesados ricos en grasas saturadas, trans y azúcares (Oyindasola, 2021). Por consiguiente, la dieta occidental contribuye a elevar el LDL-C y reducir el HDL-C, lo cual incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o sufrir un evento cerebrovascular (Oyindasola, 2021). Actualmente, se ha llegado a la conclusión de que las dietas bajas en grasa y ricas en fibra y carbohidratos complejos son las más adecuadas para prevenir la obesidad y otras enfermedades relacionadas como la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013; Oyindasola, 2021; Becerril-Campos, *et al.* 2022).

2.2. Dietas altas en grasa y fructosa en ratas

En modelos animales, el consumo prolongado de una HFFD puede inducir cambios fisiológicos, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, alteraciones de la

función intestinal, endotoxemia metabólica y una leve inflamación sistémica crónica; lo cual es similar a lo ocurre en la obesidad humana y el síndrome metabólico (Hamilton et al., 2015; Marques *et al.*, 2015). Las cepas de roedores más utilizadas para estudiar la fisiopatología de estas enfermedades son Wistar y Sprague-Dawley (SD), debido a su susceptibilidad para ganar peso y desarrollar resistencia a la insulina, además de que el tamaño de los individuos adultos facilita la toma de muestras y la evaluación de algunos parámetros metabólicos (Marques *et al.*, 2015). Sin embargo, la cepa Wistar manifiesta los efectos de la ingesta de una dieta hipercalórica en mayor magnitud y en un menor tiempo que la cepa SD, además de que posee una mayor capacidad para acumular tejido adiposo (Marques *et al.*, 2015).

En una revisión sobre el uso de roedores como modelos experimentales para estudiar la obesidad, se encontró que la mayoría de los estudios optan por emplear roedores machos de 21 días o más de edad, que el tipo de dieta más utilizado para inducir obesidad es la HFD (40-60% de grasa), y que el periodo de administración de la misma generalmente va de 11 a 16 semanas (Fernandes *et al.*, 2016). Además, se ha visto que los roedores muestran una clara preferencia por dietas con porcentajes de grasa entre 20-45% sobre dietas estándar con 10% de grasa (Kasper *et al.*, 2014).

En cuanto a la composición de las HFD, se observó que la mayoría utilizaban manteca de cerdo o aceite de soya, y que aquellas compuestas por un 40-60% de grasa animal, logran la inducción de obesidad más eficiente en todos los linajes de roedores (Fernandes *et al.*, 2016). Además, se encontró que las dietas con una proporción de lípidos del 60%, no solo conllevaban a un drástico aumento de peso y porcentaje de grasa epididimaria en los animales, sino al desarrollo de hiperglucemia, tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Fernandes *et al.*, 2016). Debido a estas razones, en muchos experimentos se opta por utilizar HFD del 60% para reducir el tiempo de engorde y los costos de mantenimiento (Speakman, 2019). Sin embargo, las dietas occidentales típicas contienen proporciones de grasa entre el 36 y 40%, por lo que, se ha planteado que los modelos con HFD del 45% podrían ser los más adecuados para relacionar las alteraciones fisiológicas observadas en roedores con la obesidad humana (Speakman, 2019).

Por otro lado, los modelos de obesidad inducida por una dieta rica en carbohidratos (HCD), generalmente contienen una proporción carbohidratos simples (sacarosa, fructosa y almidón de maíz) del 60-70% (Fernandes *et al.*, 2016). Este tipo de dietas también pueden provocar alteraciones fisiológicas y metabólicas relacionadas con la obesidad, como son el aumento del peso corporal, los niveles de triglicéridos y glucosa en sangre, así como de la hipertensión (Fernandes *et al.*, 2016). Además de lo anterior, se ha documentado que las HCD, pueden promover el aumento de tamaño del hígado (Lalanza *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, se ha llegado a la conclusión que, aunque los diferentes tipos de dietas pueden provocar efectos fisiológicos similares, el impacto sobre la respuesta metabólica puede ser significativamente diferente (Kasper *et al.*, 2014). Además de la proporción de grasa, el contenido de sacarosa de la dieta juega un papel clave en el fenotipo metabólico que el animal desarrolla (Speakman, 2019). En las HFD, la relación entre ambos componentes dietéticos generalmente es inversamente proporcional para equilibrar la composición nutricional de la dieta y ajustarla a las preferencias alimentarias de los animales, así como para evitar efectos metabólicos no deseados (Speakman, 2019). Por lo que, el contenido de sacarosa de las HFD con 60% de grasa, tiende a ser menor que el de las HFD con 45% de grasa, y éste a su vez es menor que el de la dieta estándar con 10% de grasa (Speakman, 2019). Esto resulta inconveniente, si lo que se busca es emular la composición de una dieta occidental, en la que predomina el consumo de alimentos ricos en grasa y azúcares (Oyindasola, 2021). Por lo que, se requiere que los modelos animales actuales que busquen reproducir con mayor fidelidad las alteraciones fisiológicas y metabólicas asociadas a los hábitos alimentarios occidentales, consigan equilibrar las proporciones de grasa y azúcares de las dietas experimentales.

2.3. Alteraciones fisiológicas y metabólicas en ratas asociadas al consumo de una HFFD

En modelos animales el consumo prolongado de una HFD se ha asociado con cambios fisiológicos y metabólicos que guardan similitud con los observados en la obesidad humana, entre ellos, el aumento de los depósitos de tejido adiposo corporal (Hamilton *et*

al., 2015; Martínez *et al.*, 2002). El tejido adiposo es una clase de tejido conectivo formado por adipocitos; que almacena la grasa obtenida de la dieta en forma de triglicéridos, en un proceso denominado lipogénesis, los cuales posteriormente son liberados como glicerol y ácidos grasos en sangre, lo que se conoce como lipólisis (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021).

Existen dos tipos de tejido adiposo (blanco y marrón) cuya función está determinada por su distribución en el cuerpo (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021). El tejido adiposo blanco (TAB) capta los ácidos grasos de la dieta que son transportados mediante lipoproteínas (VLDL y quilomicrones) en la sangre, que contribuyen a la acumulación de lípidos en los tejidos y órganos (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021). Gracias a este proceso, el TAB funge como reservorio energético del organismo (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021). Además, el TAB secreta adipocinas que intervienen en el metabolismo, como la leptina (hormona reguladora del consumo dietético), adiponectina (hormona supresora de la gluconeogénesis hepática, lo que aumenta la sensibilidad a la insulina) y la resistina (hormona que promueve la resistencia a la insulina y reduce la tolerancia a la glucosa) (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021). Estas hormonas actúan como señales endocrinas del sistema de regulación de la acumulación de grasa corporal o lipostato (Gil, 2002).

Por otro lado, el tejido adiposo marrón (TAM) se especializa en la producción de energía a través de la oxidación de lípidos (Gil, 2002). Esta energía es disipada a través de la termogénesis y contribuye a regular la temperatura corporal (Gil, 2002). En los roedores el TAM es escaso, pero permanece constante durante toda la vida del individuo y se localiza en regiones superficiales (cervical, interescapular y axial) o profundas (perirrenal, pericárdica e inguinal). Mientras que, la mayor proporción de grasa corporal corresponde al TAB (Gil, 2002). El tejido adiposo subcutáneo (TAS) es el más abundante, seguido por el tejido adiposo visceral (TAV) que circunda a los órganos, especialmente a los riñones (perirrenal), corazón (epi y pericárdico), vasos sanguíneos (perivascular), intestinos (mesentérico y omental) y gónadas (epididimal y parametrial) (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021). Se ha demostrado que, en modelos murinos de obesidad inducida a través de la dieta, los adipocitos marrones se convierten en blancos, por lo

que, la presencia de un mayor número de adipocitos marrones en TAB se ha relacionado con un riesgo más bajo de desarrollar obesidad (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2021).

Otras alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad son los desequilibrios de los sistemas encargados de la producción y consumo de glucosa (Zhang et al., 2015). Estos desbalances afectan la concentración sanguínea de glucosa, así como el apetito del individuo, por ejemplo, se ha visto que en ratas la sensación de hambre aumenta cuando la glucemia cae un 10% (Hernández-Jiménez, 2004). Sin embargo, la glucosa no modula de forma directa el apetito, sino la insulina (Zhang et al., 2015).

La insulina es una hormona secretada por las células beta del páncreas que permite a las células asimilar la glucosa plasmática (Rodríguez, 2003). En condiciones normales, cuando el organismo obtiene glucosa a través de la dieta y se produce la hiperglucemia, el nivel basal de insulina aumenta, lo cual contribuye a promover la sensación de saciedad (Rodríguez, 2003; Rosado *et al.*, 2006). Por el contrario, la hipoglucemia desencadena la disminución del nivel de insulina en sangre y promueve el apetito (Rodríguez, 2003; Rosado *et al.*, 2006).

La insulina también promueve la saciedad debido a que la activación de sus receptores y otras señales, inducen a los adipocitos del tejido graso a secretar leptina, la cual se une a sus receptores en el hipotálamo y ayuda a suprimir el apetito (Zhang et al., 2015). Asimismo, se ha encontrado que la concentración de insulina está positivamente correlacionada con los niveles de leptina en circulación sanguínea, el peso corporal y el porcentaje de tejido adiposo del individuo (Molero-Conejo *et al.*, 2006; Zhang et al., 2015).

En condiciones de enfermedad, como la diabetes tipo 1, la falta de insulina en el organismo incrementa las concentraciones de glucosa en sangre, debido a que este azúcar depende de la insulina para ser aprovechada por las células (Rodríguez, 2003). En otros casos, como en la diabetes tipo 2, la acción de la insulina a nivel celular está reducida, lo cual conlleva a que el organismo secrete una mayor cantidad de insulina (hiperinsulinemia), a esto se le conoce como resistencia a la insulina (RI) y también provoca altas concentraciones de glucosa (Rodríguez, 2003; Pérez M. R. & Medina-

Gómez, 2011). La obesidad inducida por una dieta alta en grasas y azúcares es un factor de riesgo para desarrollar RI y otras enfermedades hepáticas crónicas de etiología metabólica (Pérez M. R. & Medina-Gómez, 2011; Molero-Conejo *et al.*, 2006; Becerril-Campos, *et al.* 2022).

Otro punto importante, es que la insulina influye directamente sobre el lipostato (Zhang *et al.*, 2015). Después de cada comida la insulina suprime la liberación de ácidos grasos por lipólisis y favorece la síntesis de triglicéridos por lipogénesis (Molero-Conejo *et al.*, 2006). La restricción de la liberación de ácidos grasos evita que éstos contribuyan a la gluconeogénesis que se lleva a cabo en el hígado (Molero-Conejo *et al.*, 2006). Mientras que, el incremento de la lipogénesis promueve que el tejido adiposo capte glucosa y que ésta se transforme en grasa (Molero-Conejo *et al.*, 2006).

2.4. Disbiosis intestinal en ratas asociada al consumo de una HFFD

La disbiosis intestinal hace referencia a alteraciones en la composición microbiana que repercuten en la distribución, diversidad, abundancia y funciones metabólicas de los microorganismos que habitan en el intestino (Wei *et al.*, 2021). Debido a que la microbiota intestinal es distinta en cada individuo, la disbiosis no es una condición bien definida, sin embargo, numerosos estudios han asociado ciertos patrones de diversidad y abundancia bacteriana con condiciones de salud (Cani *et al.*, 2008; Serino *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2021). En la gran mayoría de los casos, la disbiosis intestinal ha sido caracterizada en función de los cambios en la diversidad y abundancia bacteriana debido a que la microbiota intestinal se encuentra dominada por bacterias (Forte *et al.*, 2020).

En humanos y roedores, los filos bacterianos más abundantes y diversos de la microbiota del intestino son Firmicutes (30%-50%) y Bacteroidetes (20%-40%), por lo cual se determinó que los cambios en su proporción podrían ser útiles para caracterizar a los diferentes fenotipos metabólicos que son inducidos por el consumo de distintas dietas (Serino *et al.*, 2012; Gagnière *et al.*, 2016). El aumento de la proporción de Firmicutes con respecto a Bacteroidetes (F/B) incluso ha sido denominado como la "firma bacteriana de la obesidad" en humanos y roedores (Ley *et al.*, 2006), debido a que altera el equilibrio energético (Yang *et al.*, 2020). Además, este desequilibrio favorece el predominio de

taxones microbianos capaces de alterar la función intestinal al favorecer la degradación del moco entérico y el adelgazamiento de la barrera intestinal (Forte *et al.*, 2020).

El epitelio del intestino es una barrera que permite la absorción de los nutrientes adquiridos a través de la dieta y la separación del huésped de la microbiota presente en esta región (Xie *et al.*, 2020). Una dieta rica en grasas y carbohidratos (HFCD) puede alterar la función del epitelio intestinal al inducir disbiosis en la microbiota, lo cual se evidencia a través del aumento de la permeabilidad intestinal, así como de la concentración plasmática de lipopolisacáridos (LPS) (Cani *et al.*, 2008). El LPS es un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas, por lo que su presencia en plasma podría indicar el aumento de la proporción de bacterias Gram negativas con respecto a la de Gram positivas (Cani *et al.*, 2008). La endotoxemia por LPS induce la inflamación del organismo a través del receptor CD14 de macrófagos, lo que desencadena el aumento de peso y la resistencia a la insulina tanto en humanos como roedores (Cani *et al.*, 2007).

El impacto de las HFCD sobre la microbiota intestinal y los metabolitos que producen, depende del tipo y porcentaje de grasa utilizados en la dieta (Yang *et al.*, 2020). Por ejemplo, las dietas con porcentajes de grasa entre el 44 y 72%, aumentan significativamente la proporción F/B a corto plazo (Yang *et al.*, 2020). Aunado a ello, la ingesta de grasas saturadas también contribuye a incrementar dicha proporción, así como la abundancia de especies bacterianas asociadas con la progresión de la obesidad y la diabetes tipo 2, pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacteroidetes* y *Ruminococcus* (Yang *et al.*, 2020). El consumo de una HFD también reduce las poblaciones de bacterias asociadas con una buena salud intestinal, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Fecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* y *Blautia*, los cuales se han correlacionado negativamente con la permeabilidad intestinal y la endotoxemia metabólica (Cani *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2020).

Por otra parte, el tipo de carbohidratos presentes en la dieta también influye en la composición de la microbiota intestinal (Yang *et al.*, 2020). Las dietas ricas en carbohidratos simples, disminuyen la abundancia de géneros bacterianos característicos de dietas ricas en fibra, como *Prevotella* (Shi *et al.*, 2020). También, se ha visto que el

consumo de una HFD enriquecida con sacarosa, puede desencadenar alteraciones metabólicas que promueven el estrés oxidativo, la disbiosis intestinal y el daño cognitivo en ratas (Avila-Nava *et al.*, 2016). Por el contrario, las dietas ricas en carbohidratos accesibles a la microbiota (MAC), previenen la disbiosis de la misma, especialmente la drástica reducción de *Bacteroidetes* spp. y el aumento de *Proteobacteria* spp. observado tras la alimentación con una HFD deficiente en fibra (Shi *et al.*, 2020). Los MAC de la dieta también contribuyen a incrementar el grosor de la mucosa del colon y la expresión de proteínas de unión estrecha que regulan el paso de moléculas y iones a través de los espacios intercelulares y mantienen la integridad del epitelio intestinal, así como a disminuir la endotoxemia metabólica y la inflamación (Shi *et al.*, 2020).

2.4.1. Alteraciones del eje metabólico huésped-microbiota inducidas por una HFFD

La microbiota intestinal se comunica continuamente con el huésped, a través de la producción de señales químicas que intervienen en vías celulares específicas (Nicholson *et al.*, 2012). Las bacterias en el intestino fermentan la fibra dietética y producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC) capaces de incrementar las reservas energéticas del huésped (Duncan *et al.*, 2008), así como de modular su metabolismo (Nicholson *et al.*, 2012) y su sistema inmunológico (Vinolo *et al.*, 2011).

Diversos factores pueden impactar el eje metabólico huésped-microbiota, sin embargo, uno de los más relevantes es la dieta (Nicholson *et al.*, 2012). En relación con esto, las HFFD inducen la producción de metabolitos microbianos derivados de la fructosa (acetato, propionato, butirato y ácido butírico), capaces de desencadenar la lipogénesis *de novo* en hígado (Siyu *et al.*, 2021). La microbiota intestinal es la primera en consumir la fructosa de la dieta, por lo que, en un inicio, protege al hígado del exceso de este azúcar, lo que previene el desarrollo de enfermedades hepáticas (Siyu *et al.*, 2021). Sin embargo, el consumo prolongado de fructosa puede provocar la reorganización de las comunidades microbianas del intestino y modular la actividad de enzimas intestinales como la fructocinasa, la enzima que regula la rapidez con la que la fructuosa se consume (Siyu *et al.*, 2021). Esto contribuye a que el huésped absorba una mayor cantidad de energía de la dieta y acumule lípidos tanto en hígado, como en tejido adiposo (Siyu *et al.*, 2021).

Asimismo, la ingesta de una dieta rica en fructosa puede influir en la producción de AGCC (Siyu *et al.*, 2021). Los AGCC actúan como inhibidores del factor adiposo inducido por el ayuno (FIAF), una enzima que se produce en el hígado, tejido adiposo e intestino y es capaz de inhibir a la lipoproteinlipasa (LPL) (Duncan *et al.*, 2008). La LPL es una enzima que hidroliza los triglicéridos que componen al VLDL y los quilomicrones en ácidos grasos y glicerol (Duncan *et al.*, 2008). La supresión del inhibidor promueve la actividad de la LPL, lo que resulta en la acumulación de grasa en hígado y la eventual esteatosis hepática (Siyu *et al.*, 2021). Por el contrario, se ha demostrado que las dietas ricas en fibra (p. ej. celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina) inducen cambios en la microbiota intestinal que promueven la actividad de la LPL y otras enzimas hepáticas, como la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, que regula la velocidad de la síntesis del colesterol (Chai *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2020). La mejora del metabolismo de los lípidos evita la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia hepáticas, así como la ganancia de peso y el aumento de tejido graso (Chai *et al.*, 2003).

Otro punto importante es que, los AGCC sirven como señales para receptores de ácidos grasos libres (FFAR) acoplados a proteína G (GRP) de células del sistema enteroendocrino (Mishra *et al.*, 2020). Por ejemplo, la activación del GPR41/FFAR3 incrementa la velocidad del tránsito intestinal a través de la activación del péptido YY (PYY), lo cual, a su vez, disminuye los niveles de energía extraídos de la dieta (Yeon & Lee, 2015). Por otra parte, la activación del GPR43/FFAR2 incrementa la sensibilidad a la insulina a través del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), lo que reduce la sensación de hambre y previene la acumulación de grasa (Yeon & Lee, 2015). Adicionalmente, la activación del GPR43/FFAR2 en adipocitos inhibe la lipólisis, lo cual suprime la liberación de ácidos grasos en sangre (Ge *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2020).

Por otro lado, los AGCC también son capaces de influir sobre el eje intestino-cerebro para inducir la gluconeogénesis intestinal (Yeon & Lee, 2015). Este efecto sobre el metabolismo de la glucosa disminuye el hambre y previene la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina tanto en humanos como roedores (Yeon & Lee, 2015). Por lo que, no cabe duda de que la microbiota intestinal contribuye al fenotipo metabólico del huésped y, por ende, su alteración representa un importante factor de riesgo para el

desarrollo de enfermedades, como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Nicholson *et al.*, 2012).

2.4.2. Cambios especie-específicos de la microbiota intestinal de ratas inducidos por el consumo de una HFD

La gran mayoría de estudios sobre microbiota intestinal se han enfocado en caracterizar las diferencias en la abundancia bacteriana a nivel de género tras el consumo de una determinada dieta. Sin embargo, la diversidad de resultados publicados aún no permite establecer si algunos géneros son favorables o no para la salud del huésped (Lecomte *et al.*, 2015). Por lo que se ha propuesto que los efectos sobre el metabolismo y la función intestinal podrían deberse a determinadas especies bacterianas (Lecomte *et al.*, 2015).

En un modelo de rata SD alimentado con HFD (45%) durante 16 semanas, se encontró que más del 50% de la disimilitud con el grupo control se debía a cambios especie-específicos que correlacionaban directamente con parámetros metabólicos asociados con obesidad (aumento del peso corporal, porcentaje de masa grasa, concentraciones de triglicéridos, leptina e insulina, tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina) (Lecomte *et al.*, 2015). En este estudio se encontró una correlación negativa entre la abundancia de *Lactobacillus intestinalis* (filo Firmicutes), el aumento del peso corporal y la masa grasa del animal, lo cual se atribuyó a que dicha bacteria previene el aumento de especies productoras de propionato o acetato (*Phascolarctobacterium*, *Proteus mirabilis* y *Veillonellaceae*), para las cuales se encontró una correlación positiva entre su abundancia y los parámetros metabólicos asociados con obesidad mencionados anteriormente (Lecomte *et al.*, 2015).

En otros modelos animales de obesidad inducida por medio de dietas hipercalóricas, se ha detectado la disminución de otra especie particular del filo Firmicutes. En ratas SD alimentadas con una HFD (60%) por 10 semanas se reportó la reducción de *Clostridium leptum* (Cowan *et al.*, 2014). Asimismo, el consumo de una HFD enriquecida con oligofruktuosa al 10% durante 6 semanas, disminuyó la abundancia de esta bacteria en ratas Wistar (Cluny *et al.*, 2017). Por el contrario, la abundancia de *C. leptum* aumentó en animales alimentados con dietas ricas en fibra o almidón butirilado (Le Leu *et al.*, 2015).

Debido a lo anterior, este microorganismo se ha clasificado como de importancia para la salud intestinal del huésped (Kabeerdoss *et al.*, 2013). En este sentido, se ha reportado que pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, presentan una menor abundancia de *C. leptum* que individuos sanos (Kabeerdoss *et al.*, 2013). La reducción de la población de esta especie bacteriana podría explicar la limitada producción de AGCC, especialmente butirato, que caracteriza a dichas enfermedades (Kabeerdoss *et al.*, 2013).

Otra especie asociada con el desarrollo de este tipo de enfermedades es *Bacteroides fragilis* (filo Bacteroidetes), una bacteria comensal del intestino que presenta dos cepas distintas: no toxigénica y enterotoxigénica (Gagnière *et al.*, 2016). La cepa no toxigénica es capaz de incrementar la expresión de proteínas de unión estrecha y, por ende, aminorar la permeabilidad intestinal en roedores con HFD (Hsiao *et al.*, 2013). Esto además de evitar la endotoxemia por LPS, se ha asociado con la prevención del daño de las funciones cognitivas producto de la respuesta neuroinflamatoria (Hsiao *et al.*, 2013). Las características de esta cepa incluso la han convertido en un prometedor candidato a probiótico (Fengting *et al.*, 2019). Por otro lado, la presencia de la cepa enterotoxigénica de *B. fragilis* se ha visto en pacientes con cáncer colorrectal (Gagnière *et al.*, 2016). La asociación de dicha cepa con el proceso de carcinogénesis colónica temprana, se debe a que su toxina (BFT) puede intervenir en las vías de señalización que regulan la proliferación celular y la liberación de factores proinflamatorios (Gagnière *et al.*, 2016).

Los hábitos dietéticos pueden afectar la abundancia de especies bacterianas estrechamente relacionadas con la salud metabólica e intestinal del huésped (Fengting *et al.*, 2019), como *L. intestinalis*, *C. leptum* y *B. fragilis*. Por lo que, para darle continuidad a este proyecto sería interesante que en un futuro se realicen estudios que permitan cuantificar la abundancia de éstas y otras especies en los modelos de obesidad. Esto con la finalidad de asociar los cambios en la abundancia bacteriana, con los perfiles metabólico e intestinal de los animales, tras la administración de una dieta hipercalórica basada en el patrón alimenticio occidental.

2.4.3. Técnicas de cultivo para el estudio de la composición microbiana intestinal

En la última década, la secuenciación de nueva generación (NGS) y los análisis metagenómicos, han permitido estudiar a profundidad la composición de la microbiota

intestinal (Ito *et al.*, 2019). Estos estudios han ayudado a esclarecer el importante papel que algunos microorganismos desempeñan en el desarrollo de distintas enfermedades (Ito *et al.*, 2019). Sin embargo, estas técnicas presentan algunas desventajas, por ejemplo, los análisis metagenómicos suelen ser costosos y difíciles de realizar debido a la complejidad de los datos genómicos obtenidos de las miles de especies bacterianas de la microbiota intestinal, para cuyo análisis se requiere un amplio conocimiento sobre bioinformática (Ito *et al.*, 2019). Por otra parte, la secuenciación del gen ARNr 16S no permite la identificación de la bacteria a nivel de cepa y presenta ciertas limitaciones en cuanto a la información que puede ofrecer sobre sus funciones metabólicas (Ito *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, los métodos de cultivo continúan siendo una opción conveniente y necesaria para comprender más a fondo los requisitos nutricionales, nichos ecológicos y perfiles metabólicos de los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal (Ito *et al.*, 2019).

Lamentablemente, la mayoría de las bacterias intestinales no son cultivables o requieren de condiciones nutricionales y ambientales específicas para crecer (Ito *et al.*, 2019). Por esta razón, diversos estudios se han enfocado al desarrollo de medios de cultivo que permitan el crecimiento y la identificación de microorganismos intestinales (Ito *et al.*, 2019). En algunas metodologías se trata de emular las condiciones nutricionales del intestino, al añadir peptona, extracto de levadura o carne, distintos carbohidratos y factores de crecimiento (p. ej. vitaminas, minerales y AGCC) al medio de cultivo (Goodman *et al.*, 2011). Algunos estudios incluso han demostrado que es posible cultivar un alto porcentaje de la microbiota fecal mediante el uso de medios de cultivo comerciales, enriquecidos con los nutrientes mencionados anteriormente (Lau *et al.*, 2016; Ito *et al.*, 2019). Del mismo modo, el uso de antibióticos y otros reactivos disponibles comercialmente ha facilitado la selección de bacterias específicas que anteriormente se consideraban como no cultivables (Rettedal *et al.*, 2014). La mayor parte de las bacterias anaerobias intestinales son resistentes a antibióticos aminoglucósidos y β -lactámicos, como la ampicilina y penicilina (Bacic & Smith, 2008).

En general, la metodología más utilizada para el aislamiento de microorganismos intestinales a partir de heces consiste en tomar la muestra fecal directamente del ano del

animal (Ito *et al.*, 2019). Posteriormente, ésta se suspende en una solución tampón fosfato salino pre-reducida (PBS-PRAS, 10% p/v), con la cual se inoculan medios de cultivo especializados (Ito *et al.*, 2019). El PBS-PRAS contiene L-cisteína, un agente reductor del NAD⁺ a NADH, el cual establece un ambiente reductor en el medio, capaz de promover el metabolismo fermentativo de las bacterias anaerobias (Caycedo-Lozano *et al.*, 2021). Finalmente, para acercarse lo más posible a las condiciones ambientales del intestino, los medios son incubados a 37°C en una cámara anaeróbica (5-20% de CO₂, 5.5-10% de H₂ y 74.5-85% de N₂) por un tiempo aproximado de 24 a 48 h (Ito *et al.*, 2019). Además de la L-cisteína, a los medios de cultivo sólidos se les agrega un indicador redox, llamado resazurina, el cual pierde su coloración una vez que adopta su forma reducida, luego de haber permanecido en condiciones anaerobias (Bacic & Smith, 2008).

Actualmente, el enfoque más exitoso para el cultivo de microorganismos intestinales ha sido la fabricación de medios de cultivo adecuados al fenotipo bacteriano de interés, el cual se puede conocer a través estudios genómicos y bioinformáticos (Browne *et al.*, 2016). Por ejemplo, para el aislamiento de bacterias intestinales exigentes del género *Clostridium*, se ha optado por el uso de medios de cultivo generales, como agar BHI, a los que se les añade 1-nitropireno (Rafil *et al.*, 1991; Moura *et al.*, 2020). Esto debido a que algunas especies de *Clostridium* (*C. leptum*, *C. paraputrificum* y *C. clostridiiforme*) son capaces de producir nitrogenasa, una enzima que degrada este reactivo y forma una zona clara alrededor de las colonias, lo que permite su identificación (Rafil *et al.*, 1991; Moura *et al.*, 2020). Además de estas especies de *Clostridium*, *Bacteroides* spp. y *Eubacterium* spp. también pueden metabolizar el 1-nitropireno, por lo que la identificación de estas bacterias se complementa con la morfología colonial, tinción de Gram, pruebas bioquímicas y la amplificación de la región del gen ARNr 16S por PCR (Rafil *et al.*, 1991; Moura *et al.*, 2020). Para optimizar la recuperación de *Clostridium* spp. en medio BHI, también se recomienda la incorporación de agentes selectivos como moxalactam, norfloxacin y taurocolato de sodio (Connor *et al.*, 2018).

Otro ejemplo de esto es el género *Bacteroides*, compuesto por bacilos Gram negativos capaces de hidrolizar esculina, por lo que su aislamiento a partir de muestras de heces

se puede realizar directamente en agar *Bacteroides bilis esculina* (BBE) (Ignacio *et al.*, 2015). Las colonias de *Bacteroides* spp. en agar BBE son grises y vuelven la placa negra debido a que la hidrólisis de esculina genera subproductos que reaccionan con el citrato férrico del medio (Ignacio *et al.*, 2015). Adicionalmente, el agar BBE contiene sales biliares que actúan como agentes selectivos de *Bacteroides* spp., por lo que su recuperación en este medio es altamente eficiente (Ignacio *et al.*, 2015).

Por otro lado, se han desarrollado otros medios de cultivo selectivos para el aislamiento específico de *B. fragilis*, como el agar BFS (Ho *et al.*, 2017). El cual consiste en una base de agar BHI adicionado con distintos nutrientes (glucosa, extracto de levadura, vitamina K y hemina), agentes reductores (cisteína), selectivos (sales biliares, gentamicina, kanamicina y novobiocina) y diferenciales (azul de bromotimol, esculina y citrato de amonio férrico) (Ho *et al.*, 2017). En agar BFS, las colonias de *B. fragilis* son amarillas y también producen un precipitado negro en el fondo de la placa (Ho *et al.*, 2017). Este medio incluso ha demostrado mejorar la recuperación de *B. fragilis* en muestras clínicas, ya que la incorporación de dichos antibióticos inhibe el crecimiento de otras bacterias con reacciones de esculina positivas, como enterococos y lactobacilos (Ho *et al.*, 2017).

Otra manera de aislar microorganismos intestinales consiste en modificar el pH del medio. Por ejemplo, se ha utilizado la inoculación de muestras fecales en caldo MRS acidificado (pH 2.5), previo a la siembra en medios de cultivo sólidos, para seleccionar lactobacilos ácido-tolerantes (Jena *et al.*, 2013). Para el cultivo de *Lactobacillus* spp., el medio más utilizado es el agar MRS (pH 5), al cual se puede añadir vancomicina para inhibir el crecimiento de enterococos, estreptococos y bifidobacterias (Hartemink *et al.*, 1997). Así como lactosa púrpura de bromocresol (medio MRS-BCP) o verde de bromocresol (medio LAMVAB), que permiten seleccionar e identificar bacterias productoras de ácido láctico por su coloración (Jena *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015). La siembra de muestras fecales de rata en medio LAMVAB, ha permitido la recuperación selectiva de especies intestinales de lactobacilos, incluso de aquellas presentes en cantidades relativamente bajas en heces, como *L. intestinalis* (Hartemink *et al.*, 1997; Jena *et al.*, 2013). Por lo que, la especialización de los medios de cultivo comerciales es

un enfoque prometedor para el aislamiento de bacterias intestinales difíciles de cultivar (Ito *et al.*, 2019).

Toda la información citada anteriormente se puede resumir en que, la gran mayoría de los casos de obesidad se deben a un desbalance energético positivo entre la energía adquirida a través de la dieta y el gasto de la misma. Las dietas ricas en carbohidratos simples y grasas saturadas, como la HFFD, inducen el aumento de peso debido a su alta densidad calórica y la disminución de la sensación de saciedad. Por lo que, el consumo prolongado de una HFFD puede promover el aumento de los niveles de lípidos en circulación (dislipidemia), así como la acumulación de lípidos en hígado (esteatosis hepática), tejido adiposo visceral y subcutáneo. Asimismo, puede conllevar a la pérdida de eficiencia para controlar los niveles sistémicos de glucosa, lo que resulta en el desarrollo de resistencia a la insulina.

Por otro lado, el desarrollo de obesidad también implica el reclutamiento y activación de células inmunitarias en tejido adiposo e hígado, lo cual desencadena el estado inflamatorio leve y generalizado característico de esta enfermedad. Otro efecto negativo de las HFFD sobre la salud del organismo es que inducen la disbiosis de la microbiota intestinal al promover el crecimiento de taxones microbianos que contribuyen a la reducción de la expresión de las proteínas de unión estrecha y al aumento de la permeabilidad del intestino. La microbiota intestinal también desempeña un rol crucial en la regulación de procesos relacionados con la adquisición de energía de la dieta, el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la ganancia de tejido adiposo y la inflamación, por lo que, existe amplia evidencia su contribución al desarrollo de la obesidad en roedores.

Actualmente, se han logrado grandes avances hacia la comprensión de la diversidad de la microbiota gastrointestinal mediante el uso de técnicas dependientes de cultivo, la NGS y la metagenómica. El aislamiento de bacterias intestinales que antes no podían cultivarse ha sido posible gracias a la especialización de medios disponibles comercialmente. Estas técnicas han demostrado tener un rendimiento suficiente para cultivar bacterias intestinales y ofrecen información sumamente útil acerca de las

características y funciones de estos microorganismos. Por lo que en este proyecto se utilizaron ratas Wistar como modelo para estudiar el impacto sobre el metabolismo y la función intestinal del consumo prolongado de una dieta alta en grasa y fructosa (HFFD). Además, se cultivaron bacterias intestinales aisladas de heces de estos animales en medios de cultivo especializados para el aislamiento de bacterias de los géneros *Clostridium*, *Bacteroidetes* y *Lactobacillus*.

III. JUSTIFICACIÓN

La incorporación de alimentos ricos en grasas y azúcares a la dieta occidental representa uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de obesidad y otras enfermedades crónicas no infecciosas caracterizadas por la alteración del metabolismo y la función intestinal. La obesidad es actualmente una de las principales problemáticas de salud en el mundo. Por esta razón, el desarrollo de modelos animales que caractericen los efectos sobre la salud del consumo prolongado de una dieta que trata de emular el patrón de alimentación occidental, como la que se propone en este estudio, resulta necesario y útil para ampliar el entendimiento sobre dicha enfermedad.

Así mismo, comprender el mecanismo por el cual una HFFD altera la permeabilidad intestinal, requiere de la combinación de métodos cultivo-dependientes y moleculares que permitan analizar los cambios en la composición de las comunidades de la microbiota intestinal. Especialmente, aquellos que afectan la abundancia de especies bacterianas que caracterizan al fenotipo metabólico inducido por el consumo de este tipo de dieta. Debido a que, se ha descubierto que existe una correlación directa entre la abundancia de determinadas especies bacterianas y parámetros metabólicos asociados con obesidad. Más adelante, se espera que los resultados obtenidos con este modelo animal, contribuyan a cuantificar los cambios en la abundancia de algunas especies pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Bacteroides* y *Lactobacillus*, para las cuales se probó una metodología de cultivo.

IV. HIPÓTESIS

El consumo prolongado de una dieta rica en grasa (20%) y fructosa (20%) induce daño metabólico y de la función intestinal en ratas macho Wistar.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto sobre el metabolismo y la función intestinal del consumo prolongado de una HFD en un modelo de rata, y desarrollar en conjunto una metodología para el cultivo de bacterias intestinales aisladas de heces.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las diferencias en la composición corporal (peso, longitud y proporción de tejido adiposo) y otros parámetros corporales (relación entre la circunferencia abdominal y torácica, IMC e índices de Lee, hepático y renal) de los animales del grupo HFFD con respecto al SD.
2. Caracterizar los cambios en los perfiles lipídico, glucémico y hemático de los animales del grupo HFFD con respecto al SD.
3. Determinar el grado de daño sobre la función intestinal inducido por HFFD mediante un ensayo de permeabilidad intestinal *in vivo* con FITC-dextrano.
4. Cultivar bacterias intestinales aisladas de heces de rata en medios específicos para *Clostridium* spp., *Bacteroidetes* spp. y *Lactobacillus* spp.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales experimentales

Durante el experimento se trabajó con diez ratas Wistar macho de 6 semanas de edad (peso corporal $\mu = 178.77 \pm 3.97$ g), adquiridas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM Campus Juriquilla), que fueron alojados individualmente en jaulas estándar (27 x 37 x 15 cm) con cama sanitaria de viruta estéril, bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad relativa ($60 \pm 5\%$) y un ciclo regulado de luz-oscuridad de 12 h. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN) de la Universidad Autónoma de Querétaro (100FCN2021).

6.2. Dieta y grupos experimentales

Después de una semana de alimentación con dieta estándar (RLC 5001), los animales se dividieron aleatoriamente en un grupo de control con dieta estándar (3 ratas) y un grupo con dieta alta en grasas y fructuosa (7 ratas). El alimento fue administrado durante 16 semanas a ambos grupos para su consumo *ad libitum*, acompañado de agua limpia y fresca disponible en todo momento. A las ratas del grupo SD se les suministró el alimento comercial *Rodent Lab Chow 5001* (RLC 5001) para animales de laboratorio, con un aporte energético de 3.4 Kcal/g (proteínas: 23.87%; hidratos de carbono: 48.5%; lípidos: 5%; y fibra: 5.3%). Por otro lado, la dieta del grupo HFFD consistió en una mezcla de la dieta estándar con manteca de cerdo (20%), fructosa (20%), salvado, aceite y colato de sodio (0.15%), que favorece la emulsificación y absorción de lípidos. Esta dieta trata de emular una dieta occidental en el humano, ya que tiene un aporte energético de 4.4 Kcal/g (proteínas: 21.75%; hidratos de carbono: 43.51%; lípidos: 21.88%; y fibra: 3.6%). Los ingredientes de cada dieta, así como su contenido nutrimental y energético se pueden encontrar en las tablas 1A, 2A y 3A del Anexo.

6.3. Peso corporal e ingesta de alimento

Las ratas se pesaron y midieron semanalmente para reportar el aumento de peso, así como de las circunferencias torácica y visceral. Así mismo, la ingesta de alimentos de las ratas se calculaba cada 3 días con una balanza con precisión de 0.1 g. Debido a que la composición de la HFFD imposibilitaba convertirla en pellets, se optó por moler el alimento estándar, de tal forma que ambas dietas fueron administradas a los animales en forma de polvo. Por esta razón, para calcular con mayor exactitud la ingesta diaria de alimento (IDA) de cada animal se tomó en consideración tanto el alimento que las ratas tiraban en la caja con aserrín como el sobrante que se encontraba en los comederos, mediante la siguiente fórmula:

$$IDA \left(\frac{g}{d} \right) = \frac{[\text{Alim. inicial} - (\text{Alim. en comedero} + \text{Alim. en aserrín})]}{3 \text{ días}}$$

6.4. Percentiles de peso y edad

A partir de las tablas de referencia del peso corporal en función de la edad cronológica para ratas machos Wistar (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013), se construyeron las curvas para

los percentiles 3, 10, 25, 50, 75, 90 y 97. La ecuación de la curva para cada percentil fue obtenida mediante la regresión lineal de los mínimos cuadrados (LMS), con el fin de calcular el peso promedio para animales de 140 días. El valor de R² de las ecuaciones de todas las curvas fue ≥ 0.99 (Figura 4A).

6.5. Curva de tolerancia a la glucosa

En las semanas 14 y 16 de alimentación, luego de un ayuno de 8 h, se administró glucosa (2 g glucosa por cada Kg peso corporal de la rata) a los animales por canulación intragástrica. Antes de colocar la sonda (0 min) y 15, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa, se extrajo sangre de los animales a través del corte de la punta de la cola y se midió el nivel de glucosa en plasma (PG) con tiras reactivas y un medidor *ACCU-CHEK Active, Roche*. La glucemia se estimó a partir del área bajo la curva (AUC), de acuerdo con el método de los trapezoides (Sakaguchi *et al.*, 2016), con la siguiente ecuación:

$$AUC \left(\frac{mg \cdot h}{dl} \right) = \frac{PG(0 \text{ min}) + PG(30 \text{ min}) \times 2 + PG(60 \text{ min}) \times 3 + PG(120 \text{ min}) \times 2}{4}$$

6.6. Análisis de la permeabilidad intestinal *in vivo*

Se administró por sonda gástrica isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano de 4000 Da (600 mg/Kg de peso corporal) disuelto en PBS estéril (125 mg/mL) a ratas con 8 h de ayuno. Se recolectó sangre de la vena caudal de las ratas en tubos con EDTA en intervalos de 1 h por 4 h consecutivas. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C por 15 min para obtener el plasma, el cual se almacenó a -80°C para su posterior análisis. Para determinar las concentraciones plasmáticas del FITC-dextrano (ng/mL), el plasma se mezcló con un volumen igual de PBS y se añadió a una microplaca de 96 pocillos. Luego se analizó la concentración del FITC-dextrano a la 1, 2, 3 y 4 h con un espectrofotómetro de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 490 nm y de emisión de 520. La curva estándar se obtuvo a partir de las mediciones de la densidad óptica de una concentración creciente (1 - 8 μ g/mL) de un *pool* de suero con FITC-dextrano de los animales de cada grupo (Figura 5A). Una vez obtenida la ecuación de la

recta, los valores correspondientes a las muestras de los animales SD y HFFD se interpolaron.

6.7. Distribución y cuantificación de la grasa corporal (visceral y subcutánea)

En la semana 16 se llevaron a cabo las resonancias magnéticas de 6 animales. El análisis de la distribución y cantidad de tejido adiposo visceral y subcutáneo, así como los modelos tridimensionales, se realizaron mediante el software ITK-SNAP (Paul *et al.*, 2006).

6.8. Obtención de muestras de sangre y órganos

Al final de la semana 16, se les dio muerte a las ratas mediante la liberación directa de CO₂ desde cilindros de gas comprimido hacia las jaulas. El efecto depresivo y anestésico de este gas conduce a una rápida e indolora muerte por hipoxia. La sangre de los animales se recolectó para la posterior determinación de los perfiles lipídico y glucémico. El hígado, riñones, estómago, ciego, intestino delgado, colon y tejido adiposo epididimal se extrajeron para ser pesados y medidos. Posteriormente, se colocaron en una solución de formaldehído al 10% para su fijación.

6.9. Índices de Lee, orgánicos y riesgo cardiovascular

Al final de la semana 16, se midió el peso y la longitud nariz-ano (LNA) de las ratas con el objetivo de calcular el índice de Lee, que permite realizar el diagnóstico de obesidad en modelos animales. Adicionalmente, se pesaron varios órganos con el fin de obtener los índices orgánicos que indican la proporción del peso del órgano con respecto a la masa corporal del animal. Mientras que el riesgo cardiovascular (RC) se calculó como la razón de las concentraciones de colesterol total (CT) y HDL-C séricos. Los índices y el riesgo se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de Lee} = \sqrt[3]{\frac{\text{Peso del órgano (g)} \times 10^3}{\text{LNA (cm)}}}$$

$$\text{Índice orgánico} = \frac{\text{Peso del órgano (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \times 100\%$$

$$RC = \frac{CT}{HDL} \text{ medidas ambas en mg/dL}$$

6.10. Cultivo de bacterias intestinales

Se recolectaron heces directamente del ano de 5 animales (*pool*) y se colocaron inmediatamente en un recipiente estéril y con cierre hermético. A partir de estas muestras se realizó el cultivo para cada una de las tres especies bacterianas de interés, como se menciona a continuación.

6.10.1. *Clostridium* spp.

De acuerdo con la metodología de Rafil y colaboradores (1991) para el aislamiento de cepas intestinales de *Clostridium* a partir de heces, del *pool* de muestras se tomó 1 g del material fecal que se añadió a 9 mL de caldo infusión cerebro corazón prerreducido (BHI-PRAS) y esterilizado anaerómicamente y se incubó a 37°C por 24 h para enriquecer la muestra (Tabla 1). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del medio BHI-PRAS hasta 10⁻⁹ UFC/mL. Se esparció 0.1 mL de las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ y 10⁻⁹ en placas de agar BHI (pH 7.5 a 8) enriquecido con los siguientes ingredientes (1L): agar bacteriológico (2 g), extracto de levadura (0.5 g), vitamina K (1 mg) y cisteína (0.5 g) (Tabla 2).

Tabla 1. Formulación del medio BHI-PRAS (pH 7.4 ± 0.2 a 25°C).

Ingrediente	Cantidad (1L)
Caldo BHI	37.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cisteína	0.5 g
Resazurina	1.0 mg
Vitamina K	0.5 mg
Norfloxacino	12.0 mg

Las placas con agar BHI se incubaron a 37°C por 24 h en un recipiente cerrado y previamente enjuagado con CO₂ para establecer las condiciones atmosféricas necesarias para el crecimiento de mesófilos anaerobios intestinales. Las colonias blancas de bacilos Gram positivos se transfirieron a nuevas placas con agar BHI hasta aislar colonias individuales. Todos los ingredientes del medio, excepto la vitamina K y el

norfloxacin, se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 7.4 ± 0.2 usando hidróxido de sodio (1N). Luego, el medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min y se enfrió a 50°C para añadir asépticamente la vitamina K y el antibiótico. Una vez aisladas, las colonias se colocaron en caldo BHI-PRAS para su almacenamiento a -4°C .

Tabla 2. Formulación del agar BHI (pH 7.4 ± 0.2 a 25°C).

Ingrediente	Cantidad (1L)
Agar BHI	40.0 g
Agar bacteriológico	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cisteína	0.5 g
Vitamina K	1.0 mg

6.10.2. *Bacteroides* spp.

De acuerdo con la metodología de Ho y colaboradores (2017) para aislamiento de *B. fragilis* a partir de muestras clínicas, se cultivó anaeróticamente 1 g de la muestra fecal en caldo BHI (pH 7.4 ± 0.2) a 37°C por 24 h para enriquecer la muestra. Se colocó 1 mL de la dilución en agar BHI modificado y enriquecido con vitamina K para mejorar el aislamiento de *B. fragilis* (BFS) y se incubó a 37°C por 48 h en condiciones anaeróbicas (Tabla 3). Las colonias grises y elevadas de cocobacilos Gram negativos, esculina positivos (coloración negra), catalasa negativos fueron seleccionadas para su aislamiento en agar BFS. Todos los ingredientes del medio, excepto la vitamina K, se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 7.2 ± 0.2 usando hidróxido de sodio (1N). Luego, el medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min y se enfrió a 50°C para añadir asépticamente la vitamina K y la gentamicina. Una vez aisladas, las colonias se colocaron en placas de agar BHI para su mantenimiento a -4°C .

Tabla 3. Formulación del medio BFS (pH 7.2 ± 0.2 a 25°C).

Ingrediente	Cantidad (1L)
Agar bacteriológico	15.0 g
Caldo BHI	37.0 g
Extracto de levadura	5.0 g

Cisteína	0.5 g
Hidrato de colato de sodio	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Azul de bromotimol	0.24 g
Vitamina K	0.05 g
Gentamicina	4.0 mg

6.10.3. *Lactobacillus* spp.

De acuerdo con la metodología de Sun y colaboradores (2016) para el aislamiento de *Lactobacillus* spp. a partir de heces de rata, se diluyó 1 g del material fecal en 9 mL de PBS-PRAS hasta 10^{-8} y se incubó a 37°C por 24 h (Tabla 4). Se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-5} y 10^{-8} , y se inocularon en 15 mL de caldo MRS acidificado (pH 2.5) por 2 h a 37°C para seleccionar a los lactobacilos ácido-tolerantes. Posteriormente, se tomaron 0.1 mL de cada una de las diluciones con pipeta o asa bacteriológica y se inocularon en agar MRS anaeróbico con verde de bromocresol (LAMAB) y se incubaron por 72 h a 37°C en anaerobiosis (Tabla 5). Todos los ingredientes del medio se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 5 ± 0.1 usando ácido clorhídrico (1N). Luego, el medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Las colonias azul-verdosas de bacilos Gram positivos que mostraron reacciones catalasa negativas se seleccionaron para su aislamiento en agar MRS. Los aislados seleccionados se mantuvieron a -4°C en agar MRS.

Tabla 4. Formulación del medio PBS-PRAS (pH 7 ± 0.2 a 25°C).

Ingrediente	Cantidad (1L)
Cloruro de sodio	8.5 g
Fosfato de potasio monobásico	0.3 g
Fosfato de sodio dibásico	0.6 g
Cisteína	0.25 g
Resazurina	1.0 mg

Tabla 5. Formulación del agar LAMAB (pH 5 ± 0.1 a 25°C).

Ingrediente	Cantidad (1L)
Caldo MRS	55.0 g
Cisteína	0.5 g
Verde de bromocresol	0.05 g
Agar bacteriológico	40 g

6.11 Análisis estadístico

Se utilizó el lenguaje de programación R para el análisis estadístico de los resultados, los datos que se ajustaban a la distribución normal se expresaron como la media ± error estándar (EE), debido a la diferencia del número de muestras por grupo. Para cuantificar la significancia de la diferencia entre el promedio de dos grupos se utilizó la prueba t de Student y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$ (Madhwa & Marappa-Ganeshan, 2023).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Efecto de la HFFD sobre los parámetros corporales

Después de 16 semanas, la ingesta de la HFFD promovió el aumento del peso corporal de este grupo ($p < 0.05$), el cual fue $14.63 \pm 3.88\%$ más alto que el del grupo SD (Figuras 1 y 1A). El peso corporal inicial de los animales de ambos grupos fue cercano a los 200 g y, luego de la alimentación con las diferentes dietas, el peso corporal final fue de 590.44 g y 515.06 g para HFFD y SD, respectivamente (Tabla 6). La HFFD promovió las diferencias del peso corporal entre grupos a partir de la tercera semana de alimentación ($p < 0.05$). En modelos de rata, se considera que hay obesidad cuando el peso corporal del grupo experimental con la dieta rica en grasas es 10% mayor al peso corporal promedio del grupo control con la dieta estándar (Zhang et al., 2020). Asimismo, otros artículos han reportado un incremento del peso corporal final cercano al 15%, tras la administración de una HFFD en este mismo modelo (Becerril-Campos, et al. 2022).

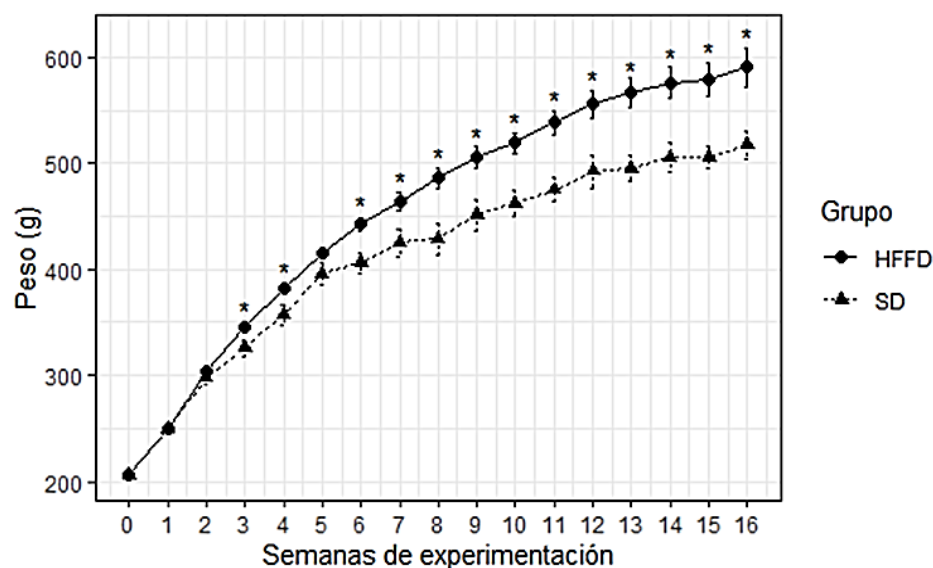


Figura 1. Efecto de la HFFD en el peso corporal por semana. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$, $n=10$. * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

Además de la ganancia de peso corporal, el aumento de las circunferencias visceral (CV), torácica (CT) y el índice CV/CT, se han asociado al desarrollo temprano de alteraciones metabólicas (Gerbaix, 2010). Las ratas del grupo HFFD mostraron un aumento del 2.8% en la LNA, 4.6% en la CV y 4.5% en el índice CV/CT, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 2A). Por otro lado, se encontró que el IMC del grupo HFFD ($0.92 \pm 0.03 \text{ g/cm}^2$) fue significativamente mayor al del grupo SD ($0.80 \pm 0.02 \text{ g/cm}^2$) en la semana 16 ($p \leq 0.005$) (Figura 3). El aumento de IMC debido una HFFD ha sido reportado anteriormente, alcanzando valores de hasta $0.75 \pm 0.1 \text{ g/cm}^2$ después de la administración por 6 semanas (Becerril-Campos, *et al.* 2022). Sin embargo, este incremento no se explica únicamente por la proporción de grasa (20% de manteca) de la dieta experimental, sino al efecto en conjunto con la proporción de azúcares (20% de fructuosa) de la misma. Un estudio en ratas demostró que el consumo *ad libitum* de una SD acompañada de una solución de sacarosa al 30%, provocó que el IMC de estos animales ($0.82 \pm 0.1 \text{ g/cm}^2$) fuera significativamente mayor al del grupo control alimentado con SD y agua ($0.60 \pm 0.01 \text{ g/cm}^2$) (Novelli *et al.*, 2007). En este mismo estudio se determinó que el rango normal de IMC para ratas Wistar macho adultas podía ir de 0.63 a 0.73 g/cm^2 (Novelli *et al.*, 2007). Las diferencias entre los valores de IMC reportados en estos artículos y los obtenidos en este estudio pueden deberse a la densidad energética de cada dieta, las tasas de consumo de los animales y el tiempo de duración de los experimentos. Tanto, los incrementos de la CV, el índice CV/CT y el IMC en un modelo con HFFD se asocian con un mayor porcentaje de grasa visceral, el desarrollo de

obesidad y un mayor riesgo de padecer una enfermedad metabólica (Paredes *et al.*, 2009; Becerril-Campos, *et al.* 2022).

Por otro lado, el índice de Lee se emplea de forma habitual para el diagnóstico de obesidad, debido a que se encuentra estrechamente correlacionado con la proporción de grasa corporal en ratas (Suárez Román *et al.*, 2013). El índice de Lee del grupo HFFD (28.56 ± 0.31) fue significativamente mayor que el del grupo SD (27.27 ± 0.27) ($p < 0.05$). Para un modelo de obesidad en ratas Wistar inducido por la administración de glutamato monosódico (GMS), un índice de Lee ≤ 30.0 era considerado como normal, mientras que cuando el valor era ≥ 30 , las ratas se clasificaban como obesas (Suárez Román *et al.*, 2013). Sin embargo, otro estudio en el que la obesidad también fue inducida por el consumo de una dieta HFD por 12 semanas, reportó un índice de Lee de 29.20 ± 0.71 para este grupo y de 26.93 ± 0.50 para el grupo control con SD (Zhang *et al.*, 2020). El valor más alto del índice de Lee del grupo con HFD obtenido en un menor tiempo, puede explicarse por el porcentaje de grasa de la dieta, que en el caso de Zhang y colaboradores (2010) fue del 45%, mientras que el utilizado en el presente estudio fue del 20%. La diferencia estadísticamente significativa entre grupos del índice de Lee, permite clasificar a los animales del grupo HFFD como obesos.

Tabla 6. Efecto de la HFFD en parámetros corporales

	SD	HFFD
Peso inicial (g)	205.16 ± 2.39	206.3 ± 0.97
Peso final (g)	515.06 ± 16.17	590.44 ± 18.66 *
Ganancia de peso (g)	309.9 ± 16.52	384.14 ± 19.29 *
LNA (cm)	25.36 ± 0.60	25.28 ± 0.18
Circunferencia visceral (cm)	23.83 ± 0.93	24.93 ± 0.60
Circunferencia torácica (cm)	21.57 ± 0.57	21.46 ± 0.44
Índice CV/CT	1.11 ± 0.04	1.16 ± 0.01
IMC (g/cm^2)	0.80 ± 0.02	0.92 ± 0.03 **
Índice de Lee	27.27 ± 0.27	28.56 ± 0.31 *

Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa

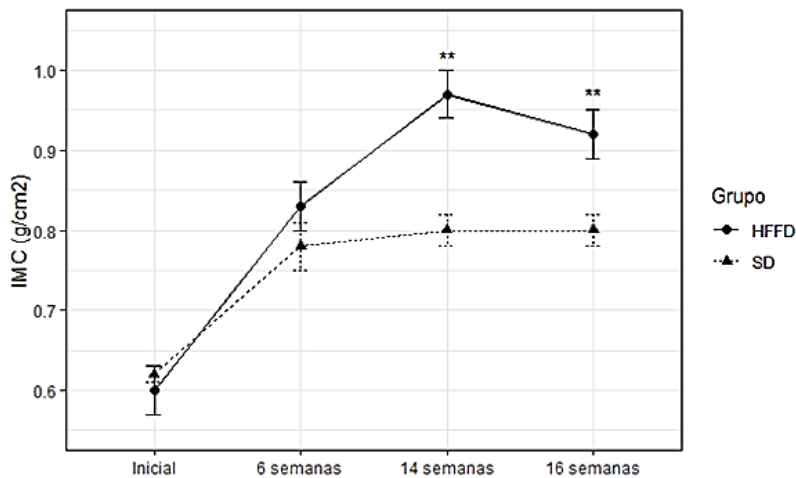


Figura 2. Efecto de la HFFD en el IMC por semana. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa; IMC= índice de masa corporal.

Adicionalmente, a partir de las curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar publicadas por Cossio-Bolaños y colaboradores (2013), se determinó que el peso promedio de los percentiles 3, 10, 25, 50, 75, 90 y 97 para animales de 140 días era de aproximadamente 401.5, 426, 450, 473.8, 496.8, 519.6 y 542 g, respectivamente. Los puntos de corte para los percentiles se interpretan como: <P3 desnutrición, P3-P10 delgadez, P10-P90 eutrófico, P90-P97 sobrepeso y >P97 obesidad (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013). De acuerdo con estos parámetros, el peso del 100% de los animales del grupo HFFD superó el peso promedio del P97 y entraron en la clasificación de obesidad (Tabla 7). En cuanto al grupo SD, todos los animales entraron en la categoría de eutróficos, a excepción de uno que superó ligeramente (5 g) el límite de peso para el P90, por lo que entró en la categoría de sobrepeso.

Tabla 7. Clasificación de los animales de acuerdo a los percentiles de peso y edad para ratas macho Wistar

Animal	Grupo	Peso (g)	Percentil	Clasificación
1	SD	519.9	90	Eutrófico
2	SD	535.0	<97	Sobrepeso
3	SD	490.3	75	Eutrófico
4	HFFD	543.1	97	Obesidad
5	HFFD	560.0	>97	Obesidad
6	HFFD	675.1	>97	Obesidad
7	HFFD	560.0	>97	Obesidad
8	HFFD	580.0	>97	Obesidad
9	HFFD	582.7	>97	Obesidad
10	HFFD	632.2	>97	Obesidad

7.2. Efecto de la HFFD sobre el consumo de alimento, agua y energía

No hubo diferencias significativas en la ingesta diaria de alimentos entre los grupos, pero sí en la de energía ($p < 0.05$) (Tabla 8 y Figura 3A). Lo anterior se explica por las diferencias en la composición y densidad energética de cada dieta (Tabla 1A, 2A y 3A). Las grasas aumentan la densidad energética de la dieta, disminuyen la sensación de saciedad y poseen un buen sabor, lo que contribuye al consumo de mayores cantidades de energía (Ello-Martin *et al.*, 2005). Por otra parte, el consumo diario promedio de agua disminuyó en el grupo HFFD, al igual que en otros estudios en los que se alimentó a los animales con este tipo de dieta (Marques *et al.*, 2015; Becerril-Campos, *et al.* 2022). Lo cual puede ser consecuencia de la falta de un sabor dulce en el agua o al efecto de las grasas sobre la saciedad (Pahua-Ramos *et al.*, 2014).

Tabla 8. Consumo de alimento, energía y agua.

	SD	HFFD
Alimento (g/día)	27.07 ± 0.74	25.80 ± 1.37
Energía (Kcal/día)	92.04 ± 2.52	113.55 ± 6.03 *
Agua (mL/día)	54.08 ± 3	44.23 ± 3.75

Media ± EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ ($n=3$ para SD y $n=7$ para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

7.3. Efecto de la HFFD sobre los parámetros de glucosa y lípidos

Los animales del grupo HFFD mostraron un incremento del 32% en el colesterol total (CT), 150% en el LDL-C ($p < 0.05$), 74% en el VLDL-C y 35% en los triglicéridos ($p < 0.05$), así como una disminución del 20% en el HDL-C en suero sanguíneo, en comparación con el grupo SD (Tabla 9). Asimismo, el índice CT/HDL-C, asociado con el riesgo cardiovascular, aumentó en un 18% en el grupo HFFD; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios en los que también se ha asociado el consumo de una HFFD con el incremento de los niveles de CT y triglicéridos (Becerril-Campos, *et al.* 2022), así como con la reducción del HDL-C (Oyindasola, 2021).

Tabla 9. Efecto de la HFFD en las concentraciones de glucosa y lípidos en suero.

	SD	HFFD
Glucosa (mg/dL)	92.48 ± 13.48	130.94 ± 16.26 *
Colesterol (mg/dL)	64.10 ± 6.68	84.62 ± 10.17
Triglicéridos (mg/dL)	99.42 ± 10.96	134.65 ± 9.20 *
HDL-C (mg/dL)	54.67 ± 5.14	43.94 ± 8.46
LDL-C (mg/dL)	2.67 ± 0.88	6.67 ± 0.80 *
VLDL-C (mg/dL)	10.67 ± 3.53	18.57 ± 3.68
CT/HDL-C	1.56 ± 0.05	1.84 ± 0.17

Media ± EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructuosa; CT= colesterol total.

La relación entre el CT, LDL-C y HDL-C, así como los niveles de triglicéridos son un conjunto de indicadores bioquímicos que permiten identificar individuos con riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (García-Muñoz *et al.*, 2020). Tanto el LDL-C como el VLDL-C son partículas aterogénicas que contribuyen a la acumulación de placa en la pared arterial (Carvajal *et al.*, 2014). El LDL-C al transportar colesterol hacia las células y el VLDL-C al transportar triglicéridos al tejido adiposo, músculo esquelético y corazón (Carvajal *et al.*, 2014). En contraste, el HDL-C elimina el colesterol de las células al transportarlo de vuelta al hígado, por lo que se considera una partícula anti-aterogénica (Carvajal *et al.*, 2014). La presencia de niveles altos de triglicéridos en conjunto con niveles bajos de HDL-C, también son factores de riesgo característicos de otras enfermedades metabólicas asociadas a obesidad (García-Muñoz *et al.*, 2020).

Los animales con HFFD también presentaron niveles de glucosa en sangre más elevados que los del grupo SD ($p < 0.05$) (Tabla 8). La glucemia promedio del grupo HFFD sobrepasó el rango considerado normal (90-130 mg/dL) (Vílchez-Cáceda & Flores-López, 2018), sin embargo, no cumplió con uno de los criterios utilizados para el diagnóstico de diabetes (≥ 200 mg/dl) en un modelo de rata macho Wistar (Figuroa *et al.*, 2013). Aunque, cabe mencionar, que el hallazgo aislado de este criterio no es suficiente para diagnosticar la enfermedad (Figuroa *et al.*, 2013).

El grupo HFFD también mostró una disminución de la tolerancia a los azúcares, como lo indica la respuesta glucémica tras la administración intraperitoneal de glucosa (Figura 4). El nivel basal de glucosa (NBG) en ayunas fue de 113.50 ± 3.34 y 92.80 ± 3.12 mg/dl para los grupos HFFD y SD, respectivamente. De acuerdo con un estudio en el que se caracterizó un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar, se estableció que un NBG entre los 70 y 100 mg/dL era considerado normal, un NBG entre los 100 y 125 mg/dL era un signo de prediabetes y un NBG ≥ 126 mg/dL era un signo de diabetes (Figuroa *et al.*, 2013). De igual forma, los niveles de glucosa del grupo HFFD fueron mayores a los 30, 60, 90 y 120 min, respectivamente, en comparación con el grupo SD ($p < 0.05$).

Finalmente, la respuesta global, es decir, el AUC de la glucosa fue un 32.51% más alta en los animales del grupo HFFD (343.87 ± 15.51 mg·h/dl) que en los del grupo SD (259.5 ± 12.23 mg·h/dl) (Figura 5). Las alteraciones del AUC implican una respuesta anormal del organismo a los cambios en el nivel de glucosa en sangre tras una comida (glucemia posprandial), lo cual se considera una fase inicial de la resistencia a la insulina (Sakaguchi *et al.*, 2016). Un valor de AUC ≥ 290 mg·h/dl es un indicador de intolerancia a la glucosa (Sakaguchi *et al.*, 2016). Estos resultados en conjunto, sugieren que la HFFD provoca alteraciones en el metabolismo de los lípidos y la glucosa.

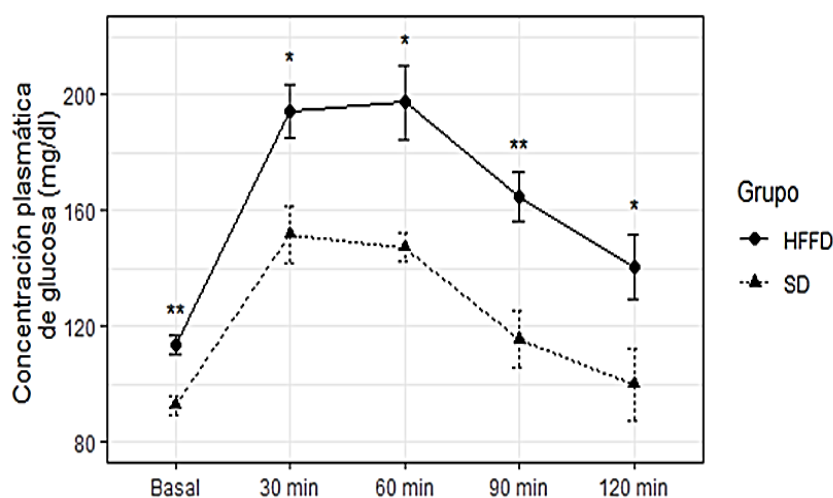


Figura 3. Efecto de la HFFD en la respuesta de la glucemia posprandial. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ ($n=3$ para SD y $n=7$ para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

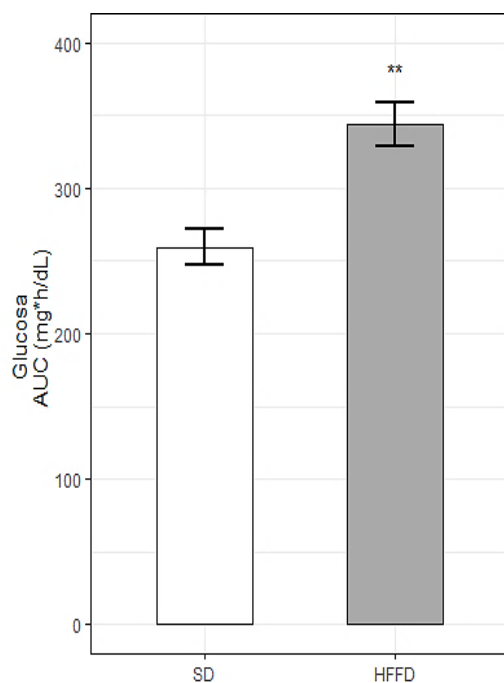


Figura 4. Área bajo la curva en la prueba de tolerancia glucémica intraperitoneal. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.005$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). ** HFFD vs. SD. AUC= área bajo la curva.

7.4. Efecto de la HFFD sobre los parámetros hematológicos

La biometría hemática, es un examen de laboratorio que analiza tres tipos celulares de importancia clínica (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), que permiten realizar el diagnóstico de patologías hematológicas y enfermedades que afectan distintos órganos y sistemas (López-Santiago, 2016). Estos parámetros ayudan a evaluar el estado higiénico y fisiológico de los animales experimentales, sobre todo cuando estos están sometidos a distintos tratamientos (León-Goñi *et al.*, 2011). Diversos factores pueden alterar dichos parámetros, entre ellos, la dieta (León-Goñi *et al.*, 2011).

Un artículo reportó que ratones alimentados por 6 meses con una HFD presentaron un incremento en el recuento total de eritrocitos, leucocitos, linfocitos y neutrófilos en sangre, así como del volumen corpuscular medio y la amplitud de la distribución eritrocitaria (Maysami *et al.*, 2015). El incremento del número total de células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos) aumenta la viscosidad de la sangre en personas con obesidad, lo que impide su flujo a través de los vasos sanguíneos y termina por provocar trastornos cardiovasculares (Dworzański *et al.*, 2021). Adicionalmente, se ha encontrado que la proporción de grasa en la dieta puede modificar la función plaquetaria de animales y humanos, lo cual en conjunto con las alteraciones que induce sobre el perfil lipídico, contribuye al desarrollo de aterosclerosis (Paredes *et al.*, 2009).

El consumo de una HFD también puede incrementar el número de neutrófilos en circulación sanguínea (Dworzański *et al.*, 2021). Un estudio reportó que, la administración de una HFD a ratas macho Wistar durante 8 semanas, no alteró el número de eritrocitos y plaquetas, pero si aumentó el de neutrófilos (Dworzański *et al.*, 2021). Los neutrófilos son células leucocitarias que desempeñan un importante papel en la defensa antimicrobiana, por lo que su recuento en sangre se incrementa dramáticamente durante una infección o inflamación (Lokuta & Huttenlocher, 2005). El consumo a largo plazo de una HFFD puede resultar en el desarrollo de obesidad, la cual se caracteriza por la inflamación crónica generalizada (Forte *et al.*, 2020). Dicho estado es promovido por el incremento del número de adipocitos, que secretan leptina y resistina en sangre, las cuales estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias; así como los macrófagos que se aglomeran en el tejido adiposo y también secretan este tipo de citoquinas, específicamente TNF- α y IL-6 (Dworzański *et al.*, 2021). TNF- α e IL-6 se han implicado en el reclutamiento y la regulación del tráfico de los neutrófilos a las zonas de inflamación, respectivamente (Lokuta & Huttenlocher, 2005; Fielding *et al.*, 2008). Las dietas altas en fructuosa también son capaces de inducir inflamación a través de la reprogramación del fenotipo metabólico de las células del hígado (hepatocitos, macrófagos hepáticos o células de Kupffer, y células NK) (Siyu *et al.*, 2021).

Los resultados de este experimento (Tabla 10), muestran que el grupo HFFD presentó un incremento en el recuento total de eritrocitos, leucocitos, linfocitos y plaquetas en sangre, así como del volumen corpuscular medio y la amplitud de la distribución eritrocitaria. Sin embargo, ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa, y todos los parámetros evaluados en la biometría hemática cayeron dentro de los rangos normales de referencia para ratas establecidos por León-Goñi y colaboradores (2011). Además, no se detectaron neutrófilos ni eosinófilos en ninguna de las muestras sanguíneas de ambos grupos. Es probable que la falta de impacto de la HFFD sobre los parámetros hematológicos se haya debido al tiempo durante el cual se administró la dieta (16 semanas), ya que previamente se ha reportado que periodos cortos de alimentación con HFD podrían no ser suficientes para observar diferencias significativas en los parámetros hematológicos de ratas macho Wistar (Dworzański *et al.*, 2021). Estos resultados también podrían ser indicadores de la ausencia de infección e inflamación generalizada en los animales, así como de su buen estado fisiológico y la eficiencia de

las condiciones sanitarias bajo las cuales se llevó a cabo el experimento (León-Goñi *et al.*, 2011).

Tabla 10. Efecto de la HFFD la biometría hemática.

Parámetro	SD	HFFD	Referencia normal (León-Goñi <i>et al.</i>, 2011)
Recuento de glóbulos blancos (x10 ³ /μl)	8.10 ± 4.33	10.40 ± 0.63	3.84 - 10.74
Recuento de glóbulos rojos (x10 ⁶ /μl)	6.39 ± 1.23	7.57 ± 0.77	6.03 - 8.10
Hemoglobina (g/dl)	13.10 ± 2.50	12.43 ± 1.10	12.64 - 15.52
Hematocrito (%)	37.13 ± 7.67	43.16 ± 4.50	32.7 - 41
Volumen corpuscular medio (fL)	58 ± 1.76	56.94 ± 0.48	48.6 - 55.6
Hemoglobina corpuscular media (pg)	17.75 ± 0.25	16.63 ± 0.52	18.2-22.2
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl)	31.05 ± 1.05	31.40 ± 0.99	36.7-40.6
Plaquetas (x10 ³ /μl)	622.33 ± 262.56	734.86 ± 106.37	438 - 916
Linfocitos (%)	83.85 ± 5.56	84.91 ± 3.45	83.51 - 97.13
Eosinófilos (%)	ND	ND	0 - 1
Neutrófilos (%)	ND	ND	0-14.5
Amplitud de la distribución eritrocitaria (%)	12.73 ± 1.01	15.59 ± 0.32	11 - 15

Media ± EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). No hay diferencias significativas. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa; ND= no detectado.

7.5. Efecto de la HFFD sobre el peso e índices orgánicos

Después de 16 semanas con HFFD, el peso de los órganos no mostró diferencias significativas respecto al grupo SD, a excepción del peso del hígado, el cual aumentó en un 21% ($p < 0.05$) (Tabla 11). El consumo de dietas ricas en grasas y carbohidratos, como la empleada en este estudio, promueve la activación de las células de Kupffer (Pilling *et al.*, 2021). Estos macrófagos son capaces de inducir un estado inflamatorio e incrementar la producción de ácidos grasos en hepatocitos, lo que resulta en la acumulación de grasa en hígado (Tsuru *et al.*, 2020; Pilling *et al.*, 2021). Esta condición, conocida como esteatosis hepática, es evidenciada por el incremento del peso del hígado y la alteración del metabolismo (Cattley & Cullen, 2013), por lo que se ha asociado con el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina e hiperlipidemia (VanSaun *et al.*, 2009).

Las dietas altas en fructosa también se han asociado con el desarrollo de otras enfermedades hepáticas, como la del hígado graso no alcohólico (Siyu *et al.*, 2021). Esto debido a que la ingesta excesiva de fructosa induce la lipogénesis *de novo*, lo que resulta en esteatosis hepática (Siyu *et al.*, 2021). Este órgano tiene la capacidad metabólica para almacenar entre el 60-70% de los carbohidratos ingeridos a través de la dieta en forma de glucógeno y grasa (Velázquez *et al.*, 2013). Por lo que, es posible afirmar que la HFFD contribuyó al aumento del peso del hígado a través de la acumulación de lípidos.

Tabla 11. Efecto de la HFFD en el peso y longitud de órganos y tejidos.

Órgano	SD	HFFD
Hígado (g)	21.52 ± 0.91	26.07 ± 1.22 *
Riñones (g)	4.01 ± 0.11	4.39 ± 0.19
Estómago (g)	2.5 ± 0.14	2.9 ± 0.28
Ciego (g)	3.53 ± 0.25	3.72 ± 0.34
ID (g)	14.92 ± 0.74	13.66 ± 0.67
ID (cm)	140.17 ± 3.63	136.27 ± 3.05
Colon (g)	3.16 ± 0.08	2.94 ± 0.10
Colon (cm)	22.67 ± 1.17	21.07 ± 1.23
TAE (g)	9.85 ± 1.54	14.80 ± 1.83

Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa, ID: intestino delgado, TAE: tejido adiposo epididimal, TAV: tejido adiposo visceral y TAS: tejido adiposo subcutáneo.

En la semana 16, también se calcularon los índices orgánicos para ambos grupos (Tabla 12). Los valores obtenidos, que indican la proporción del peso del órgano con respecto a la masa corporal del animal, pueden utilizarse como indicadores de ciertas patologías asociadas a obesidad (Zhang *et al.*, 2020). En este sentido, los cambios en los índices hepático y renal son indicadores del riesgo de esteatosis hepática y daño renal, respectivamente (Zhang *et al.*, 2020). Los resultados presentados aquí, indican que el índice hepático del grupo HFFD aumentó con respecto al grupo SD ($p < 0.05$), a diferencia del índice renal que no difirió significativamente del control.

Un estudio en el que se alimentó a ratas macho Wistar por un periodo de 12 semanas con HFD, tampoco reportó un efecto de la dieta sobre el peso de los riñones o el índice renal, pero sí un aumento significativo del peso del hígado y el índice hepático (Zhang *et al.*, 2020). Por lo que, es posible que la HFFD no induzca daño renal, pero sí alteraciones de la función hepática como lo indica el aumento del peso del hígado y el índice hepático, observado tanto en este estudio como en el de Zhang y colaboradores (2020). En estudios posteriores sería conveniente enriquecer esta información mediante análisis histológicos, ya que en otros modelos con HFD se ha presentado evidencia de esteatosis, infiltración linfocítica y necrosis focal en hepatocitos (Zhang *et al.*, 2020).

Por otro lado, los índices que indican la proporción del peso del intestino delgado y el colon con respecto a la masa corporal del animal, disminuyeron significativamente en el grupo HFFD ($p < 0.05$). En ratas adultas (500 g) el porcentaje del peso del intestino con respecto al peso corporal varía entre el 1.4 y 4% (Miller, 1971). Esto implica que, a pesar de que el índice intestinal de los animales HFFD (2.33%) haya sido menor que el del grupo SD (2.90%), la proporción del intestino delgado continúa considerándose normal. Lo cual se confirma al no haber encontrado diferencias significativas en el peso y longitud promedio del intestino delgado de ambos grupos. De igual manera, otros estudios en ratas con HFD, tampoco han reportado cambios significativos en el peso o longitud de este órgano, tras la administración de la dieta (Xie *et al.*, 2020).

En cuanto a la disminución del índice colónico, se ha reportado que el consumo de una dieta HFD en ratas es capaz de producir una leve reducción del peso y longitud del colon, así como de la profundidad de sus criptas (Xie *et al.*, 2020). A pesar de que nuestros resultados muestran que la disminución del peso (7%) y la longitud (7%) del colon del grupo HFFD con respecto al SD no fue significativa; el índice colónico indica que la proporción de este órgano con respecto al peso corporal del animal se redujo después de la alimentación por 16 semanas con HFFD. Esto último podría ser un factor que contribuye al desarrollo de la obesidad, al afectar directamente a las comunidades microbianas que habitan el intestino grueso (disbiosis intestinal) y la absorción de AGCC que ocurre en la mucosa colónica (Duncan *et al.*, 2008).

Tabla 12. Efecto de la HFFD en los índices de Lee y orgánicos.

Índice	SD	HFFD
Hepático	4.17 ± 0.06	4.53 ± 0.12 *
Renal	0.78 ± 0.04	0.75 ± 0.04
TAE	1.90 ± 0.25	2.21 ± 0.31
Estomacal	0.49 ± 0.04	0.50 ± 0.06
Cecal	0.69 ± 0.05	0.63 ± 0.04
Intestinal	2.90 ± 0.14	2.33 ± 0.16 *
Colónico	0.61 ± 0.03	0.50 ± 0.03 *

Media ± EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

7.6. Efecto de la HFFD sobre el tejido adiposo visceral y subcutáneo

El efecto de la HFFD sobre el tejido adiposo se midió *in vivo* por resonancia magnética y con las imágenes obtenidas se realizó un modelo tridimensional de la distribución anatómica de la grasa visceral y subcutánea, que además permitió cuantificar el volumen de las mismas. Los resultados muestran que los animales del grupo HFFD presentaron tres veces más grasa visceral ($p=0.0003$) y dos veces más grasa subcutánea ($p=0.008$) que el grupo SD (Figura 6). El peso promedio de la grasa subcutánea y visceral de los animales SD fue de 5.4 y 4.3 g, respectivamente, mientras que para los animales del

grupo HFFD estos valores aumentaron a 10.5 y 13.3 g, respectivamente. En cuanto a proporciones, el porcentaje de grasa subcutánea representó el 1.05% del peso corporal de los animales SD, mientras que para el grupo HFFD éste representó el 1.78%. Por otro lado, el porcentaje de grasa visceral fue de 0.83% para el grupo SD, mientras que para el grupo HFFD éste fue del 2.25%. Estos resultados indican que la dieta HFFD promovió el aumento del tejido adiposo, especialmente del visceral, en aquellos animales que la consumieron, lo cual concuerda con lo reportado por Becerril-Campos y colaboradores (2022). Debido a que en el tejido adiposo se sintetizan distintas adipocinas que actúan a nivel autocrino, paracrino y endocrino, el exceso de grasa puede alterar algunas de las funciones del organismo (Marzola *et al.*, 2016). Por ejemplo, el comportamiento alimentario de los animales, la homeostasis energética, la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos, la sensibilidad a la insulina, entre otras (Marzola *et al.*, 2016).

La imagen por resonancia magnética (IRM) posibilita la investigación de la distribución anatómica y la cuantificación de los distintos tipos de tejido adiposo *in vivo* (Marzola *et al.*, 2016). Esto debido a que las distintas frecuencias de resonancia de los protones del agua y las cadenas de metileno (CH₂) de los lípidos, permiten diferenciar a la grasa del agua (Marzola *et al.*, 2016). En ratas macho Wistar de 14 semanas el tejido adiposo puede representar del 17 al 23% del peso corporal y se distribuye en varios depósitos anatómicos (Cossio-Bolaños *et al.*, 2010). En ratas, el TAB predomina en los depósitos subcutáneos y viscerales, sin embargo, se puede encontrar TAM en los depósitos cervical, interescapular y axilar (Gil, 2002). Los depósitos viscerales más abundantes son el gonadal (ovárico o epididimal) y el que rodea a los intestinos (mesentérico), mientras que el depósito subcutáneo más abundante es el inguinal (Cinti, 2001). Lo anterior concuerda con lo encontrado durante la construcción de los modelos tridimensionales presentados en la figura 6 (B y C).

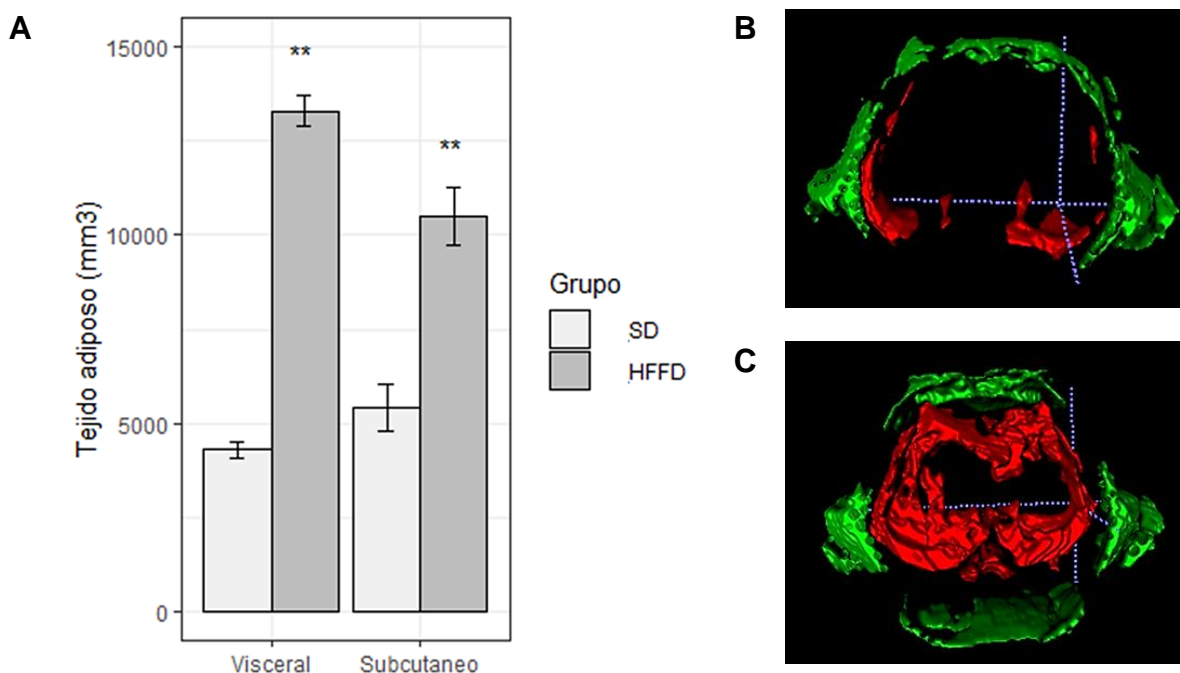


Figura 5. (A) Efecto de la HFFD sobre el tejido adiposo visceral y subcutáneo. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.005$ ($n=3$ para SD y $n=4$ para HFFD). ** HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa. Modelo 3D representativo de la grasa visceral (roja) y subcutánea (verde) de un animal del grupo SD (B) y HFFD (C).

7.7. Efecto de la HFFD sobre la permeabilidad intestinal

Los resultados del ensayo con FICT-dextrano muestran que, la HFFD incrementó drásticamente la permeabilidad intestinal ($p < 0.005$) (Figura 7). En ratas alimentadas con este tipo de dieta, el aumento de la permeabilidad intestinal se ha asociado con la alteración de las comunidades microbianas que modulan a la baja la expresión de proteínas epiteliales de unión estrecha, como ZO-1 y ocludina (Cani *et al.*, 2008). El daño del epitelio intestinal conlleva a la endotexemia por LPS, lo que desencadena una serie de alteraciones metabólicas (aumento de peso, tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina) asociadas con la obesidad en roedores (Cani *et al.*, 2007). Por lo que, más adelante sería interesante relacionar este resultado con cambios en la expresión de proteínas de unión estrecha y la disbiosis de la microbiota intestinal.

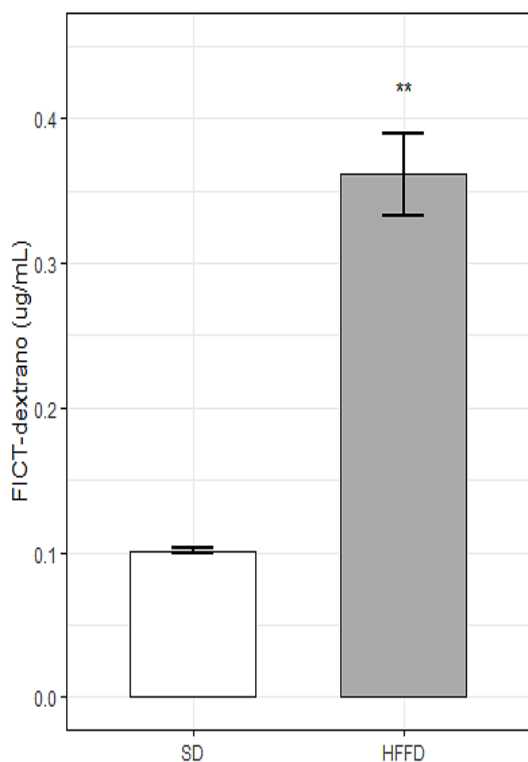
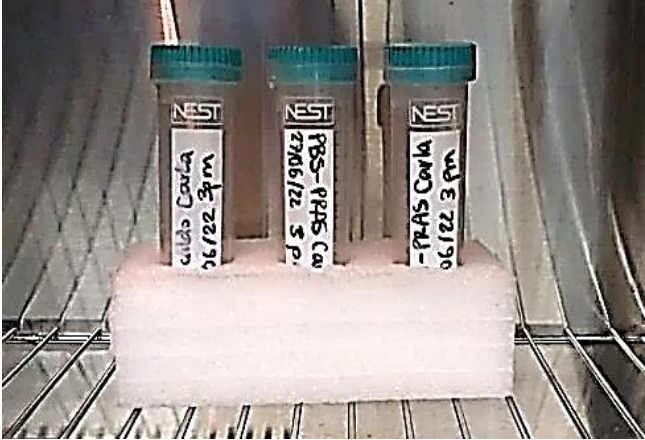




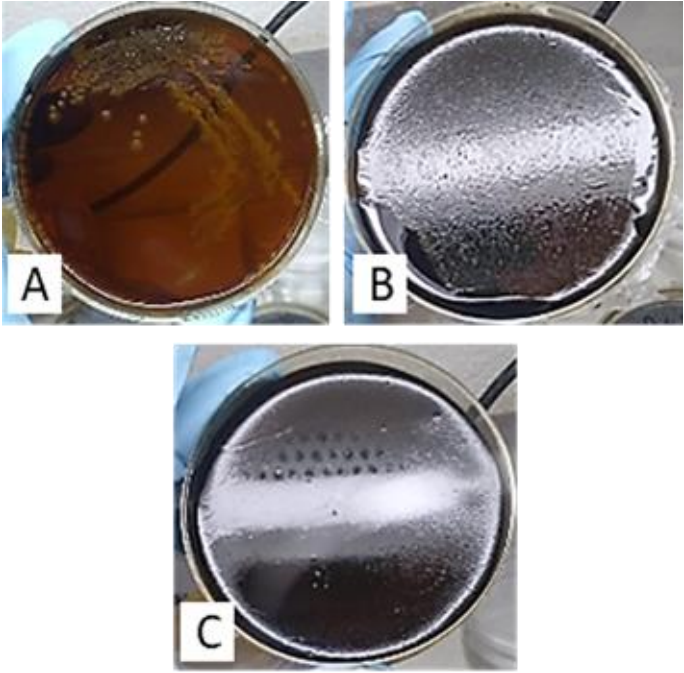


Figura 6. Efecto de la HFFD sobre la permeabilidad intestinal. Análisis de la concentración de FICT-dextrano en suero sanguíneo. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba t-student $p \leq 0.005$ (n=2 para SD y n=4 para HFFD). ** HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

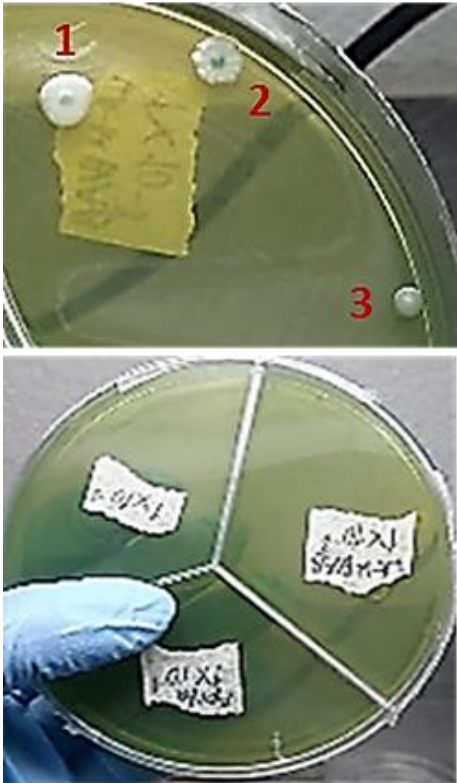
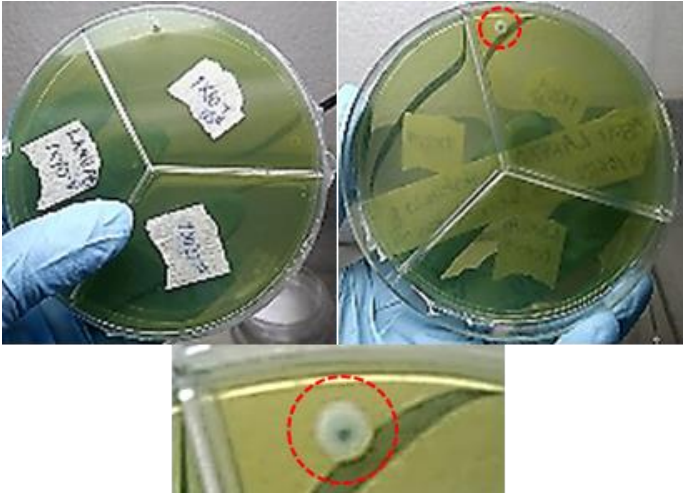
7.8. Cultivo de *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. y *Lactobacillus* spp.

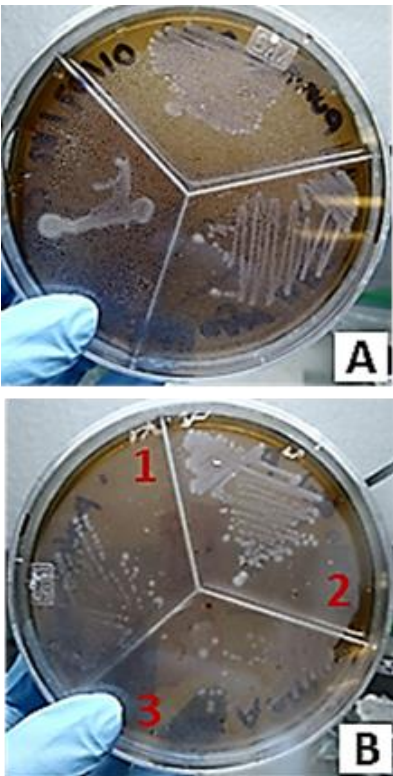
El uso de técnicas para el cultivo de bacterias intestinales (Tabla 13) que involucraron la especialización de medios de cultivo disponibles comercialmente (Tablas 1-5) permitió la recuperación exitosa de distintas colonias bacterianas a partir de heces de rata. Los medios de cultivo comerciales fueron enriquecidos con agar bacteriológico, extracto de levadura, glucosa y vitamina K. Esta última es un factor de crecimiento requerido por bacterias intestinales, cuya función principal es la de transportar electrones entre moléculas durante el proceso de respiración anaerobia (Caycedo-Lozano *et al.*, 2021). Asimismo, a todos los medios sólidos se les añadió cisteína, con el fin de preservar una atmósfera reductora pobre en O_2 y otros gases oxidantes (Caycedo-Lozano *et al.*, 2021). La incubación de los medios de cultivo en condiciones anaeróbicas, se realizó utilizando un recipiente de plástico, el cual fue enjuagado con CO_2 antes de ser sellado herméticamente e introducido a la incubadora a $37^\circ C$. La rezasurina fue utilizada como indicador de las condiciones anaerobias de la incubación y en ningún momento se observó el vire de color a azul, lo cual hubiese indicado la presencia de O_2 (Bacic & Smith, 2008).

Tabla 13. Cultivo de *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. y *Lactobacillus* spp. en medios especializados.

	Método	Imagen	Descripción
Día 1	Enriquecimiento de muestras		Muestras de heces de rata en caldo acidificado MRS, PBS-PRAS y BHI-PRAS incubadas a 37°C (de izq. a der.).
Día 2	Cultivo en medios selectivos y diferenciales		Placas con agar BFS, LAMAB y BHI incubadas a 37°C en condiciones de anaerobiosis (de izq. a der.).
Día 4	Primer aislamiento en medio enriquecido para <i>Clostridium</i> spp.		Placas con agar BHI. Solo hubo crecimiento de 2 grandes colonias blancas, cremosas y de bordes rugosos en la placa donde se inoculó la dilución 10^{-4} UFC/mL, pero no en las placas con las diluciones 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-9} UFC/mL. Las colonias que crecieron se traspasaron nuevamente a agar BHI para su primer aislamiento.

	Método	Imagen	Descripción
Día 4	Primer aislamiento en medio selectivo para <i>Bacteroides</i> spp.		Placas con agar BFS. (A) colonias naranjas circulares de borde entero, convexas, lisas, cremosas y superficiales que aclararon el medio. (B) y (C) tapete bacteriano traslúcido y puntiforme que oscureció el medio. Los 3 tipos de colonias se traspasaron a agar BFS para su primer aislamiento.
Día 5	Segundo aislamiento en medio enriquecido para <i>Clostridium</i> spp.		Colonias blancas, circulares, de borde rugoso, convexas, de superficie lisa, brillante, cremosa y superficial creciendo en placas con agar BHI. Las placas se conservaron en refrigeración a -4°C.
	Segundo aislamiento en medio selectivo para <i>Bacteroides</i> spp.		Colonias grandes amarillo-verdosas, circulares, borde entero, convexas, lisas, brillantes, cremosas y superficiales creciendo en agar BFS. Las colonias que crecieron se traspasaron a agar BHI para su mantenimiento a -4°C.

	Método	Imagen	Descripción
Día 5	Primer aislamiento en medio selectivo para <i>Lactobacillus</i> spp.		Tres colonias creciendo en la placa 1 de agar LAMAB inoculado con 100 μ L de la dilución 1×10^{-8} UFC/mL con micropipeta. (1) Colonia blanca con centro azul, circular, borde entero, acuminada, lisa, brillante, cremosa, superficial. La zona del agar donde creció se tornó amarilla. (2) Colonia blanca con centro azul, circular, borde ondulado, acuminada, rugosa, brillante, cremosa y superficial. La zona donde creció se tornó amarilla. (3) Colonia circular con centro blanco, borde entero, convexa, lisa, brillante, cremosa y superficial.
	Primer aislamiento en medio selectivo para <i>Lactobacillus</i> spp.		Una única colonia blanca con centro azul, circular, borde entero, acuminada, lisa, brillante, cremosa y superficial creciendo en la placa 2 de agar LAMAB inoculado con la dilución 1×10^{-1} UFC/mL con asa bacteriológica. La zona donde creció se tornó de verde a amarilla. Todas las colonias que crecieron en el agar LAMAB se traspasaron a agar MRS para su primer aislamiento.

	Método	Imagen	Descripción
Día 8	Segundo aislamiento en medio selectivo para <i>Lactobacillus</i> spp.		Placas de agar MRS con crecimiento de pequeñas colonias blancas, circulares, de bordes enteros, lisas, brillantes y cremosas, lo cual concuerda con la morfología descrita para <i>Lactobacillus</i> spp. (A) Aislamiento de la colonia que aparece en la placa 2 de agar LAMAB. (B1) Aislamiento de la colonia 3 de la placa 1 de agar LAMAB. (B2) Aislamiento de la colonia 1 de la placa 1 de agar LAMAB. (B3) Aislamiento de la colonia 2 de la placa 1 de agar LAMAB. Las placas se conservaron en refrigeración a -4°C.

La morfología colonial, así como los resultados de la tinción de Gram y la prueba de catalasa, coincidieron con lo esperado para *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. y *Lactobacillus* spp. en agar BHI, BFS y LAMAB, respectivamente (Tabla 14). El uso de gentamicina (aminoglucósido) en el medio BFS inhibió el crecimiento de bacilos Gram negativos y permitió seleccionar a *B. fragilis* de poblaciones mixtas que contienen anaerobios facultativos u otras bacterias con reacciones de esculina positivas, como enterococos y lactobacilos (Bacic & Smith, 2008; Ho *et al.*, 2017). Las sales biliares del medio permitieron diferenciar a *B. fragilis* de *Prevotella* spp., debido a que éste género es sensible a ellas (Bacic & Smith, 2008). Adicionalmente, el azul de bromotimol es un indicador de pH que se torna azul en medios alcalinos y vira a amarillo cuando el medio se acidifica, lo que permite distinguir las colonias de bacterias fermentadoras de las que no lo son (Caycedo-Lozano *et al.*, 2021). La adición de esculina y citrato férrico amónico permitieron detectar a las colonias capaces de hidrolizar esculina (Ho *et al.*, 2017). Estos componentes hacen que la recuperación de *B. fragilis* en medio BFS sea altamente eficiente, ya que la bacteria forma grandes colonias amarillas de bacilos Gram negativos,

esculina y catalasa positivos (Ho *et al.*, 2017). Lo cual coincidió con las características de las tres colonias aisladas en agar BFS: TAP1, TAP2 y NAR.



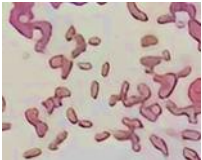

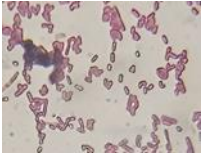
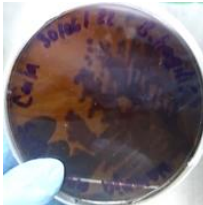

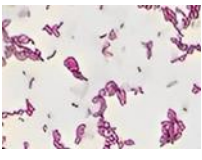
Posteriormente, el cultivo de muestras fecales en agar BHI enriquecido con agar bacteriológico, extracto de levadura, vitamina K y cisteína, dio como resultado el crecimiento de dos grandes colonias blancas (BHI1 y BHI2) con bordes rugosos delimitados por una línea oscura típica de algunas especies de *Clostridium*, como *C. perfringens* (Udhayavel *et al.*, 2017). Además, la tinción Gram reveló la presencia de bacilos Gram positivos y catalasa negativos, de acuerdo con lo reportado para *Clostridium* spp. (Reiner, 2010). La prueba de catalasa permite diferenciar a las bacterias aerobias o aerotolerantes de las anaerobias estrictas, debido a que estas últimas carecen de esta enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Reiner, 2010).


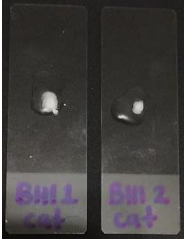
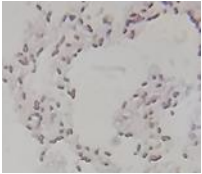

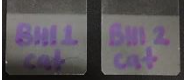
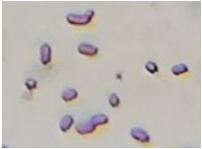




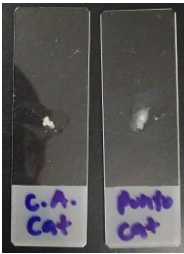
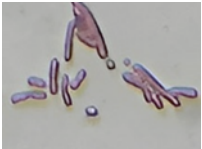




Por otro lado, la incorporación de norfloxacinó al medio de cultivo asegura la inhibición de bacterias aerobias Gram positivas y negativas, y permite el crecimiento selectivo de microorganismos anaerobios como *Clostridium* sp., *Actinomyces* sp., *Fusobacterium* sp., y *Bacteroides* sp. (AEMPS, 2020). Sin embargo, la adecuación del agar BHI a los requerimientos nutricionales y fenotipo metabólico de *Clostridium* sp., así como la incorporación de este antibiótico, ha permitido el aislamiento selectivo de bacterias clostridiales (*Clostridium* sp., *C. leptum*, *C. paraputrificum*, *C. clostridiiforme*, *C. difficile* y *Eubacterium* sp.) a partir de heces en estudios anteriores (Rafil *et al.*, 1991; Connor *et al.*, 2018). No obstante, sería recomendable realizar más adelante la identificación por PCR de los microorganismos recuperados en el agar BHI y los otros medios de cultivo utilizados.

Finalmente, para el cultivo de *Lactobacillus* spp., las muestras fecales se inocularon en caldo MRS acidificado (pH 2.5), antes de la siembra en medio MRS anaeróbico con verde de bromocresol (LAMAB), con el fin de seleccionar lactobacilos ácido-tolerantes. El LAMAB es un medio electivo para *Lactobacillus* spp., ya que la presencia de verde de bromocresol permite identificar a las colonias de lactobacilos por su coloración azul o verde, así como por el vire de color del medio circundante de verde a amarillo debido a la producción de ácido (Sun *et al.*, 2015). Las colonias pueden tener forma circular o irregular y medir más de 1 mm de diámetro y, microscópicamente, son bacilos Gram

positivos y catalasa negativos (Sun *et al.*, 2015). Estas características concordaron con tres (PA, FA y CA) de las cuatro colonias que crecieron agar LAMAB. La selectividad del medio podría incrementarse mediante la incorporación de agentes selectivos para *Lactobacillus* spp., como la vancomicina (Sun *et al.*, 2015). De hecho, un estudio reportó un crecimiento selectivo de *Lactobacillus* spp. en medio LAMAB + vancomicina (LAMVAB) a partir de placas de Peyer de ratas SD alimentadas con HFD (Sun *et al.*, 2015). La secuenciación del gen 16Sr RNA de las colonias aisladas en agar LAMVAB reveló que el 82% de las mismas correspondían a *L. reuteri*, una cepa probiótica de *Lactobacillus* que desempeña un importante papel en la reducción de la inflamación intestinal asociada a obesidad (Sun *et al.*, 2015).

Tabla 14. Colonias aisladas en medios especializados para el cultivo de *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. y *Lactobacillus* spp.

Colonia	Morfología	Imagen de las colonias	Agar	Catalasa	Imagen de la prueba catalasa	Tinción de Gram	Imagen de la tinción Gram (x100)
<i>Bacteroides</i> spp.							
TAP1	Grandes colonias amarillas, circulares, borde entero, convexas, lisas, brillantes, cremosas y superficiales que oscurecieron el medio		BFS	+		Bacilos Gram (-)	
TAP2	Grandes colonias amarillas, circulares, borde entero, convexas, lisas, brillantes, cremosas y superficiales que oscurecieron el medio		BFS	+		Bacilos Gram (-)	
NAR	Grandes colonias amarillo-naranjas circulares de borde entero, convexas, lisas, brillantes, cremosas y superficiales que oscurecieron el medio		BFS	+		Bacilos Gram (-)	

Colonia	Morfología	Imagen de las colonias	Agar	Catalasa	Imagen de la prueba catalasa	Tinción de Gram	Imagen de la tinción Gram (x100)
<i>Clostridium</i> spp.							
BH11	Colonias blancas, circulares, de borde rugoso, convexas, de superficie lisa, brillante, cremosa y superficial		BHI	-		Bacilos Gram (+)	
BH12	Colonias blancas, circulares, de borde rugoso, convexas, de superficie lisa, brillante, cremosa y superficial		BHI	-		Bacilos Gram (+)	
<i>Lactobacillus</i> spp.							
PA	Colonia blanca con centro azul, circular, borde entero, acuminada, lisa, brillante, cremosa, superficial. La zona del agar donde creció se tornó de verde a amarilla.		LAMA B	-		Bacilos Gram (+)	
FA	Colonia blanca con centro azul, circular, borde ondulado, acuminada, rugosa, brillante, cremosa y superficial. La zona donde creció se tornó amarilla.		LAMA B	-		Bacilos Gram (+)	
CA	Colonia blanca con centro azul, circular, borde entero, acuminada, lisa, brillante, cremosa y superficial. La zona donde creció se tornó de verde a amarilla.		LAMA B	-		Bacilos Gram (+)	
PO	Colonia circular con centro blanco, borde entero, convexa, lisa, brillante, cremosa y superficial. La zona donde creció permaneció verde.		LAMA B	+		No se realizó tinción por carecer de coloración azul, ser catalasa (+) y no producir el vire del color del medio circundante	

En esta tesis se empleó un modelo animal para estudiar el impacto sobre el metabolismo y la función intestinal del consumo prolongado de una dieta alta en grasa y fructosa, con el fin de contribuir a comprender de forma más eficiente sus efectos perjudiciales sobre el organismo y la salud intestinal. Además, se cultivaron bacterias intestinales aisladas de heces de rata en medios específicos para *Clostridium* spp., *Bacteroidetes* spp. y *Lactobacillus* spp. Ésto con el objetivo de que en estudios posteriores sea posible relacionar las alteraciones de la función intestinal observadas en este modelo de obesidad con la disbiosis de especies bacterianas pertenecientes a dichos géneros.

VIII. CONCLUSIONES

El incremento del peso corporal, índice de Lee, IMC, así como el de los porcentajes de grasa visceral y subcutánea del grupo HFFD, demostró que el consumo por 16 semanas de una HFFD fue capaz de inducir daño metabólico asociado con obesidad en ratas Wistar macho. Asimismo, los cambios observados en el perfil glucémico del grupo HFFD indicaron el desarrollo de intolerancia a la glucosa, mientras que las alteraciones del perfil lipídico (\uparrow CT, \uparrow TG, \uparrow VLDL-C, \uparrow LDL-C y \downarrow HDL-C) y el índice hepático sugirieron un aumento del riesgo cardiaco y la posible acumulación de lípidos en el hígado. Por otro lado, la reducción del índice intestinal y colónico, así como el aumento de la permeabilidad intestinal indicaron que la dieta experimental fue capaz de inducir daño en la función/integridad intestinal en los animales del grupo HFFD.

En resumen, los resultados encontrados en este proyecto indican que la dieta alta en grasa y fructosa está asociada a la función intestinal y a las alteraciones metabólicas determinadas. Debido a que los efectos de la dieta están directamente relacionados con la proporción de grasas y azúcares de la misma, se concluye que una HFFD con 20% de grasa y 20% fructosa es útil para estudiar las repercusiones sobre la salud metabólica e intestinal del consumo prolongado de un patrón dietético similar al occidental en humano.

Finalmente, la especialización de medios de cultivo disponibles comercialmente y su incubación en condiciones anaeróbicas, permitieron el crecimiento selectivo y diferencial de microbiota fecal. Específicamente, se aislaron y cultivaron bacterias que debido a sus

características es altamente probable que pertenezcan a los géneros de interés, que han sido relacionados con el desarrollo de obesidad (*Clostridium* spp.) o la integridad intestinal (*Lactobacillus* spp. y *Bacteroides* spp.). Se espera que estos resultados puedan contribuir en un futuro próximo a relacionar las alteraciones de la función intestinal observadas en este modelo de obesidad inducida por HFFD, con la disbiosis de los microorganismos mencionados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avila-Nava, A., Noriega, L. G., Tovar, A. R., Granados, O., Perez-Cruz, C., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (2016). Food combination based on a pre-hispanic Mexican diet decreases metabolic and cognitive abnormalities and gut microbiota dysbiosis caused by a sucrose-enriched high-fat diet in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*; 61(1), 1501023. doi:10.1002/mnfr.201501023.

Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). (2020). Ficha técnica del Norfloxacin Qualigen 400 mg comprimidos recubiertos con película. Consultado en https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/56901/FT_56901.pdf el 10 de marzo de 2023.

Bacic M. K. & Smith C. J. (2008). Laboratory maintenance and cultivation of bacteroides species. *Curr Protoc Microbiol.*; Chapter 13:Unit 13C.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc13c01s9.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 101(44), 15718–15723. doi:10.1073/pnas.0407076101.

Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 104(3), 979–984. doi:10.1073/pnas.0605374104.

Becerril-Campos A. A., Ocampo-Anguiano P. V., Mondragón-Jacobo C., Escobar-García K., Camacho-Barrón M., Anaya-Loyola M. A., Feregrino-Perez A. A., García-Gasca T. & Ahumada-Solórzano S. M. (2022). *Phaseolus vulgaris* L. Leaves Increase Short-Chain Fatty Acid (SCFA) Production, Ameliorating Early Metabolic Alterations. *Plant Foods Hum Nutr.*; 77(3): 421-426. doi: 10.1007/s11130-022-00992-1.

Browne H. P., Forster S. C., Anonye B. O., Kumar N., Neville B. A., Stares M. D., Goulding D. & Lawley T. D. (2016). Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature.*;533:543–546. doi: 10.1038/nature17645.

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Burcelin, R., et al. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*; 56(7), 1761–1772. doi:10.2337/db06-1491.

Cani P. D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A. M., Delzenne N. M. & Burcelin R. (2008) Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*; 57 (6): 1470–1481. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>.

Carvajal, C. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31(2), 88-94. ISSN 2215-5287.

Cattley R. C. & Cullen J. M. (2013). Chapter 45 - Liver and Gall Bladder en Haschek W. M., Rousseaux C. G. & Wallig M. A., Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition). Academic Press. Pages 1509-1566. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00045-5>.

Caycedo-Lozano L., Corrales-Ramírez L. C. & Trujillo-Suárez D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>.

Chai Y. M., Lim B. K., Lee J. Y., Kim M. N., Park M. R. & Rhee S. J. (2003) Effects of manufactured soluble dietary fiber from *Quercus mongolica* on hepatic HMG-CoA reductase and lipoprotein lipase activities in epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diets. *J Med Food.*;6(4):329-36. doi: 10.1089/109662003772519886.

- Cinti S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc.*; 60(3):319-28. doi: 10.1079/pns200192.
- Ciprián, D., Navarrete-Muñoz, E., García de la Hera, M., Giménez-Monzo, D., González-Palacios, S., Quiles, J. & Vioque, J. (2013) Patrón de dieta mediterráneo y occidental en población adulta de un área mediterránea; un análisis clúster. *Nutr Hosp.*; 28(5):1741-1749. doi: 10.3305/nh.2013.28.5.6758.
- Connor M. C., McGrath J. W., McMullan G., Marks N. & Fairley D. J. (2018). Development of an optimized broth enrichment culture medium for the isolation of *Clostridium difficile*. *Anaerobe*. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.08.006
- Cossio-Bolaños M. A., Gómez R., Rojas J. & Flores H. (2010). Propuesta de ecuaciones para predecir la composición corporal de ratas machos Wistar. *Anales de la Facultad de Medicina*; 71(2), 97-102. ISSN: 1025-5583.
- Cowan, T. E., Palmnäs, M. S. A., Yang, J., Bomhof, M. R., Ardell, K. L., Reimer, R. A., Shearer, J., et al. (2014). Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 25(4), 489–495. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.12.009.
- Cluny N.L., Eller L.K., Keenan C.M., Reimer R.A. & Sharkey K.A. (2015). Interactive effects of oligofructose and obesity predisposition on gut hormones and microbiota in diet-induced obese rats. *Obes.*;23:769–778. doi: 10.1002/oby.21017.
- Cossio-Bolaños M., Gómez-Campos R., Vargas-Vitoria R., Hochmuller F., Rosalvo T. & Arruda M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*; 28(6): 2151-2156. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6659>.
- Delzenne N. M. & Cani P.D. (2011). Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annu Rev Nutr.*; 31: 15-31. doi: 10.1146/annurev-nutr-072610-145146.
- Duncan S. H., Lobley G. E., Holtrop G., Ince J., Johnstone A. M., Louis P. & Flint H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity*, 32(11), 1720–1724. doi:10.1038/ijo.2008.155.
- Dworzański W., Sembratowicz I., Cholewińska E., Tutaj K., Fotschki B., Juśkiewicz J. & Ognik K. (2021). Effects of Different Chromium Compounds on Hematology and Inflammatory Cytokines in Rats Fed High-Fat Diet. *Front Immunol.* 26;12:614000. doi: 10.3389/fimmu.2021.614000.
- Ello-Martin JA, Ledikwe JH, Rolls BJ (2005) The influence of food portion size and energy density on energy intake: implications for weight management. *The Am J Clin Nutr* 82(1 Suppl):236S–41S. <https://doi.org/10.1093/AJCN/82.1.236S>.
- Fei, N., & Zhao, L. (2012). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME Journal*; 7(4): 880–884. doi:10.1038/ismej.2012.153.
- Fengting S., Qingsong Z., Jianxin Z., Hao Z., Qixiao Z. & Wei C. (2019). A potential species of next-generation probiotics? The dark and light sides of *Bacteroides fragilis* in health. *Food Research International*; 126: 108590. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108590>.
- Fernandes M. R., Lima N. V. de, Rezende K. S., Santos I. C. M., Silva I. S. & Guimarães R. de C. A. (2016). Animal models of obesity in rodents. An integrative review. *Acta Cirurgica Brasileira*; 31(12), 840–844. doi:10.1590/s0102-865020160120000010.
- Fielding C. A., McLoughlin R. M., McLeod L., Colmont C. S., Najdovska M., Grail D., Ernst M., Jones S. A., Topley N., Jenkins B. J. (2008). IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol.*;181(3):2189-95. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2189.
- Figueroa C. G., Pérez I. H. & Mejía R. Z. (2013). Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Rev.MVZ Córdoba* 18(Supl):3699-3707. <https://doi.org/10.21897/rmvz.137>.
- Forte, N., Fernández-Rilo, A. C., Palomba, L., Di Marzo, V., & Cristino, L. (2020). Obesity Affects the Microbiota–Gut–Brain Axis and the Regulation Thereof by Endocannabinoids and Related Mediators. *International Journal of Molecular Sciences*; 21(5): 1554. doi:10.3390/ijms21051554.
- Frigolet, M. E. & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Los colores del tejido adiposo. *Gaceta médica de México*: 156(2), 143-150. Epub 26 de mayo de 2021. doi: 10.24875/GMM.20005541.
- García Muñoz, AI, Melo Buitrago, PJ, Rodríguez Arcila, MA, & Silva Zambrano, DA. (2020). Índices aterogénicos y composición corporal en cadetes de una escuela de formación militar colombiana. *Sanidad Militar*, 76(1), 13-18. <https://dx.doi.org/10.4321/s1887-85712020000100003>.

- Gagnière J., Raisch J., Veziat J., Barnich N., Bonnet R., Buc E., Bringer M. A., Pezet D. & Bonnet M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.*; 22(2):501-18. doi: 10.3748/wjg.v22.i2.501.
- Ge H., Li X., Weiszmann J., Wang P., Baribault H., Chen J. L., et al. (2008). Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology.*; 149: 4519–26. doi: 10.1210/en.2008-0059.
- Gerbaix M, Metz L, Ringot E, Courteix D (2010) Visceral fat mass determination in rodent: Validation of dual-energy x-ray absorptiometry and anthropometric techniques in fat and lean rats. *Lipids Health Dis* 9:140. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-140>.
- Gil, A. (2002). Obesidad y genes. *Vox Paediatrica*, 10: 41-46.
- Goodman A. L., Kallstrom G., Faith J. J., Reyes A., Moore A., Dantas G. & Gordon J. I. (2011). Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*;108:6252–6257. doi: 10.1073/pnas.1102938108.
- Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G., & Raybould, H. E. (2015). Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*; 308(10): G840–G851. doi:10.1152/ajpgi.00029.2015.
- Hartemink R., Domenech V. R., & Rombouts F. M. (1997) LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*; 29(2): 77-84. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00025-0).
- Hernández-Jiménez S. (2004). Fisiopatología de la obesidad. *Gac Med Mex.*;140 (Supl: 2): 27-32.
- Ho P. L., Ho L.Y., Yau C.Y., Tong M. K. & Chow K. H. (2016). A Novel Selective Medium for Isolation of *Bacteroides fragilis* from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.*;55(2):384-390. doi: 10.1128/JCM.01988-16.
- Hsiao E. Y., McBride S. W., Hsien S., Sharon G., Hyde E. R., et al. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.*; 155(7):1451–63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>.
- Ignacio A., Fernandes M. R., Avila-Campos M. J. & Nakano V. (2015). Enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from fecal microbiota of children. *Braz J Microbiol.*;46(4):1141-5. doi: 10.1590/S1517-838246420140728.
- Ito T., Sekizuka T., Kishi N., Yamashita A. & Kuroda M. (2019). Conventional culture methods with commercially available media unveil the presence of novel culturable bacteria. *Gut Microbes.*;10(1):77-91. doi: 10.1080/19490976.2018.1491265. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6363062/>
- Jena, P.K., Trivedi, D., Thakore, K., Chaudhary, H., Giri, S.S. and Seshadri, S. (2013), Isolation and characterization of probiotic properties of Lactobacilli isolated from rat fecal microbiota. *Microbiol Immunol*, 57: 407-416. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12054>
- Kabeerdoss, J., Sankaran, V., Pugazhendhi, S., & Ramakrishna, B. S. (2013). Clostridium leptum group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case–control study in India. *BMC Gastroenterology*; 13(1). doi:10.1186/1471-230x-13-20.
- Kasper J. M., Johnson S. B. & Hommel J. D. (2014). Fat Preference: a novel model of eating behavior in rats. *J Vis Exp.*; (88):e51575. doi: 10.3791/51575.
- Lalanza J. F., Caimari A., Del Bas J. M., Torregrosa D., Cigarroa I., Pallàs M., Capdevila L., Arola L. & Escorihuela R. M. (2014). Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *Plos One*;9(1): e85049. doi:10.1371/journal.pone.0085049.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Jakobsen, M., et al. (2010). Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE*; 5(2): e9085. doi:10.1371/journal.pone.0009085.
- Lau J. T., Whelan F. J., Herath I., Lee C. H., Collins S. M., Bercik P. & Surette M.G. (2016). Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med.*;8:72. doi: 10.1186/s13073-016-0327-7.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Pedersen, O., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*; 500(7464): 541–546. doi:10.1038/nature12506.

- Lecomte, V., Kaakoush, N. O., Maloney, C. A., Raipuria, M., Huinao, K. D., Mitchell, H. M., & Morris, M. J. (2015). Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. *PLOS ONE*; 10(5): e0126931. doi:10.1371/journal.pone.0126931.
- Le Leu R.K., Winter J.M., Christophersen C.T., Young G.P., Humphreys K.J., Hu Y., Gratz S.W., Miller R.B., Topping D.L. & Bird A.R. (2015). Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced o 6-methyl-2-deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: A randomised Clin. trial. *Br. J. Nutr.*;114:220–230. doi: 10.1017/S0007114515001750.
- León-Goñi A. C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B. O., Arteaga M. E., Bada A. M., González Y. & Mancebo A. (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cemp: SPRD. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(11), 1-10. ISSN 1695-7504.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*; 17(4), 219–232. doi:10.1038/nri.2017.7.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122): 1022–1023. doi:10.1038/4441022a.
- Lokuta M. A. & Huttenlocher A. (2005). TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. *J Leukoc Biol.*; 78(1):210-9. doi: 10.1189/jlb.0205067.
- López-Santiago, N. (2016). La biometría hemática. *Acta pediátrica de México*, 37(4), 246-249. ISSN 1695-7504.
- Wadhwa R. R. & Marappa-Ganeshan R. (2023). T Test. *StatPearls* [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553048/>. Consultado el 25 de mayo de 2023.
- Marques C., Meireles M., Norberto S., Leite J., Freitas J., Pestana D., Faria A., Calhau C. (2015) High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*;5(1):11-21. doi: 10.1080/21623945.2015.1061723.
- Martínez J. A., Moreno M. J., Marques-Lopes I. & Martí A. (2002). Causas de la obesidad. *ANALES Sis San Navarra*; 25 (Supl. 1): 17-27.
- Marzola P., Boschi F., Moneta F., Sbarbati A. & Zancanaro C. (2016). Preclinical In vivo Imaging for Fat Tissue Identification, Quantification, and Functional Characterization. *Front Pharmacol.*; 7:336. doi: 10.3389/fphar.2016.00336.
- Maysami S., Michael J., Haley M. J., Krishnan S., McColl B. W., Lawrence C. B. (2015) Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke. *J Neuroinflamm*;12(1):140. doi: 10.1186/s12974-015-0359-8.
- Miller, D. L. (1971). Rat small intestine: Development, composition and effects of perfusion. *The American Journal of Digestive Diseases*, 16(3), 247–254. doi:10.1007/bf02235247.
- Mishra S. P., Karunakar P., Taraphder S. & Yadav H. (2020). Free Fatty Acid Receptors 2 and 3 as Microbial Metabolite Sensors to Shape Host Health: Pharmacophysiological View. *Biomedicines*. 8;8(6):154. doi: 10.3390/biomedicines8060154.
- Molero-Conejo, E., Morales, L. M., Fernández, V., Raleigh, X., Casanova, A., Connell, L., Gómez, M. E., Ryder, E., & Campos, G. (2006). Insulina, leptina y hormona de crecimiento y su relación con índice de masa corporal e índice de obesidad en adolescentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*: 56(1), 29-35. ISSN: 0004-0622.
- Moura I. B., Normington C., Ewin D., Clark E., Wilcox M. H., Buckley A. M. & Chilton C H. (2020). Method comparison for the direct enumeration of bacterial species using a chemostat model of the human colon. *BMC Microbiol.*; 20(1):2. doi: 10.1186/s12866-019-1669-2.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267. doi:10.1126/science.1223813.
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., *et al.* (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111–119. doi:10.1258/002367707779399518.
- Oyindasola, K. O. (2021). Diet and Obesity. *Psychology and Pathophysiological Outcomes of Eating*. doi: 10.5772/intechopen.98326
- Pahua-Ramos M. E., Garduño-Siciliano L., Dorantes-Alvarez L., Chamorro-Cevallos G., Herrera-Martínez J., Osorio-Esquivel O., Ortiz-Moreno A. (2014) Reduced-calorie avocado paste attenuates metabolic factors associated

- with a hypercholesterolemic-high fructose diet in rats. *Plant Foods Hum Nutr* 69(1):18–24. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0395-4>.
- Paredes J. L., Moreno E. A., Premoli G., Alarcón M., Lugo de Yarbu A., Villarreal J., Araujo S., & Borges R. (2009). Efectos de la ingestión de una dieta con alto contenido en grasas en ratas Wistar crónicamente infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Kasmera*, 37(1), 74-89. ISSN 0075-5222.
- Paul A. Yushkevich, Joseph Piven, Heather Cody Hazlett, Rachel Gimpel Smith, Sean Ho, James C. Gee, and Guido Gerig. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 2006 Jul 1;31(3):1116-28.
- Pérez M. R. & Medina-Gómez G. (2011). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición*, 58(7), 360-369. DOI: 10.1016/j.endonu.2011.05.008.
- Pilling D, Karhadkar TR, Gomer RH. High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue and Liver Inflammation and Steatosis in Mice Are Reduced by Inhibiting Sialidases. *Am J Pathol*. 2021 Jan;191(1):131-143. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.011. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33039353; PMCID: PMC7786079.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418): 55–60. doi:10.1038/nature11450.
- Reiner k. (2010). Catalase Test Protocol. American Society for Microbiology. Consultado en <https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf> el 9 de marzo de 2023.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Gordon, J. I., et al. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*, 341(6150): 1241214–1241214. doi:10.1126/science.1241214.
- Rafil F., Franklin W., Heflich R. H. & Cerniglia C. E. (1991). Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.*;57(4):962-8. doi: 10.1128/aem.57.4.962-968.1991.
- Rettedal E. A., Gumpert H. & Sommer M. O. (2014). Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria. *Nat Commun.*;5:4714. doi: 10.1038/ncomms5714.
- Rodríguez, L. G. (2003). Insulinoterapia. *Revista Medica Herediana*, 14(3): 140-144. ISSN 1729-214X.
- Rolls B. J. & Hammer V. A. (1995). Fat, carbohydrate, and the regulation of energy intake. *Am J Clin Nutr*; 62(5 Suppl):1086S-1095S. doi: 10.1093/ajcn/62.5.1086S.
- Rosado, E. L., Monteiro, J. B., Chaia, V., & Lago, M. F. do. (2006). Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona. *Nutrición Hospitalaria*, 21(6), 686-693. ISSN 1699-5198.
- Sakaguchi K., Takeda K., Maeda M., Ogawa W., Sato T., Okada S., Ohnishi Y., Nakajima H. & Kashiwagi A. (2016). Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance. *Diabetol Int*. 14;7(1):53-58. doi: 10.1007/s13340-015-0212-4.
- Scheithauer, T. P. M., Rampanelli, E., Nieuwdorp, M., Vallance, B. A., Verchere, C. B., van Raalte, D. H., & Herrema, H. (2020). Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Frontiers in Immunology*; 11. doi:10.3389/fimmu.2020.571731.
- Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Bergé, M., Cenac, C., Burcelin, R., et al. (2011). Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*; 61(4), 543–553. doi:10.1136/gutjnl-2011-301012.
- Serra-Majem L. & Bautista-Castaño I. (2013). Etiology of obesity: two “key issues” and other emerging factors. *Nutr Hosp*; 28 (Supl. 5): 32-43. ISSN: 1699-5198.
- Shi, H., Wang, Q., Zheng, M., Hao, S., Lum, J. S., Chen, X., Zheng, K., et al. (2020). Supplement of microbiota-accessible carbohydrates prevents neuroinflammation and cognitive decline by improving the gut microbiota-brain axis in diet-induced obese mice. *Journal of Neuroinflammation*; 17(1). doi:10.1186/s12974-020-01760-1
- Siyu Y., Chunlin L., Guang J., Li Z. (2021). The Contribution of Dietary Fructose to Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Pharmacology*; 12. Doi: 10.3389/fphar.2021.783393.

- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*; 529(7585): 212–215. doi:10.1038/nature16504.
- Speakman J.R. (2019). Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes* 43, 1491–1492. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>.
- Suárez-Román G., Perera-Calderín A., Clapés-Hernández S., Fernández-Romero T., & Egaña-Morales E. (2013). Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. *MediSur*, 11(5), 569-573. ISSN 1727-897X.
- Sun, J., Qiao, Y., Qi, C., Jiang, W., Xiao, H., Shi, Y., & Le, G. (2015). High-fat-diet-induced obesity is associated with decreased antiinflammatory *Lactobacillus reuteri* sensitive to oxidative stress in mouse Peyer's patches. *Nutrition*, 32(2), 265–272. doi:10.1016/j.nut.2015.08.020
- Tsuru, H., Osaka, M., Hiraoka, Y. et al. (2020). HFD-induced hepatic lipid accumulation and inflammation are decreased in Factor D deficient mouse. *Sci Rep* 10, 17593. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74617-5>.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*; 444(7122): 1027–1031. doi:10.1038/nature05414.
- Udhayavel S., Thippichettyalayam Ramasamy G., Gowthaman V., Malmarugan S. & Senthilvel K. (2017). Occurrence of *Clostridium perfringens* contamination in poultry feed ingredients: Isolation, identification and its antibiotic sensitivity pattern. *Anim Nutr.*; 3(3):309-312. doi: 10.1016/j.aninu.2017.05.006.
- VanSaun M. N., Lee I. K., Washington M. K., Matrisian L., Gorden D. L. (2009). High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *Am J Pathol.*;175(1):355-64. doi: 10.2353/ajpath.2009.080703.
- Velásquez S., Velásquez R., Leyton M., Borjas J., & Custodio A. (2013). Modelado del control de la regulación de Glucosa. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 17(66), 11-18. ISSN 1316-4821.
- Vílchez-Cáceda, H. & Flores-López, O. (2018). Efecto sobre la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en ratas albinas alimentadas a dosis repetidas (28 días) con miel de abeja en etanol. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(4), 61-69. <https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n4.09>.
- Vinolo M. A., Rodrigues H. G., Nachbar R. T. & Curi R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients.*; 3: 858–76. doi: 10.3390/nu3100858.
- Wei S., Bahl M. I., Baunwall S. M. D., Hvas C. L. & Licht T. R. (2021). Determining Gut Microbial Dysbiosis: a Review of Applied Indexes for Assessment of Intestinal Microbiota Imbalances. *Appl Environ Microbiol.* 11;87(11):e00395-21. doi: 10.1128/AEM.00395-21.
- Xie Y., Ding F., Di W., Lv Y., Xia F., Sheng Y., Yu J. & Ding G. (2020). Impact of a high-fat diet on intestinal stem cells and epithelial barrier function in middle-aged female mice. *Mol Med Rep.*; 21(3): 1133-1144. doi: 10.3892/mmr.2020.10932.
- Yang, Liang, Balakrishnan, Belobrajdic, Feng, & Zhang. (2020). Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients*; 12(2): 381. doi:10.3390/nu12020381.
- Yeon K. & Lee M. (2015). Gut microbiota and metabolic disorders. *Diabetes Metab J.*; 39(3): 198-203. doi: 10.4093/dmj.2015.39.3.198.
- Zhang L., Song H., Ge Y., Ji G. & Yao Z. (2015). Temporal relationship between diet-induced steatosis and onset of insulin/leptin resistance in male Wistar rats. *PLoS One.*; 10(2): e0117008. doi: 10.1371/journal.pone.0117008.
- Zhang X. Y., Guo C. C., Yu Y. X., Xie L. & Chang C. Q. (2020). Establishment of high-fat diet-induced obesity and insulin resistance model in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 18;52(3): 557-563. doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2020.03.024.

ANEXOS

Tabla 1A. Composición de las dietas estándar (SD) y alta en grasas y azúcares (HFFD).

Dieta	Ingredientes
SD (RLC 5001)	Harina de soja, alfalfa, germen de trigo, maíz, avena, remolacha seca, levadura de cerveza, suero de leche, grasa animal con tocoferoles mixtos, harina de carne y pescado, sal, carbonato, fosfato, D-pantotenato y yodato de calcio, cloruro de colina, L-lisina, DL-metionina, acetato y palmitato de vitamina A, estero animal activado D (fuente de vitamina D3), acetato de tocoferilo DL-alfa (fuente de vitamina E), menadiona bisulfito sódico (fuente de vitamina K), mononitrato de tiamina (vitamina B12), riboflavina, niacina, ácido fólico, D-biotina, clorhidrato de piridoxina, óxido de manganeso y zinc, sulfato de zinc y cobre, selenito de sodio, carbonato ferroso y de cobre.
HFFD	Dieta estándar, manteca de cerdo, fructosa, salvado, aceite, colato de sodio, vitaminas y minerales.

Tabla 2A. Contenido nutrimental de los ingredientes de las dietas experimentales.

	Proteínas (g)	Lípidos (g)	Hidratos de carbono (g)	Fibra (g)
RLC 5001	25	5	47.5	5.3
Manteca	0	100	0	0
Fructuosa	0	0	100	0
Caseinato	88	2	0	0
Salvado	16	8	58	34.16
Aceite	0	100	0	0

Tabla 3A. Contenido de energía, nutrimentos y fibra de las dietas por cada 100 g de alimento.

	Energía (Kcal/100g)	Proteínas (%)	Hidratos de carbono (%)	Lípidos (%)	Fibra (%)
SD	340	23.87	48.5	5	5.3
HFFD	440	21.75	43.51	21.88	3.6

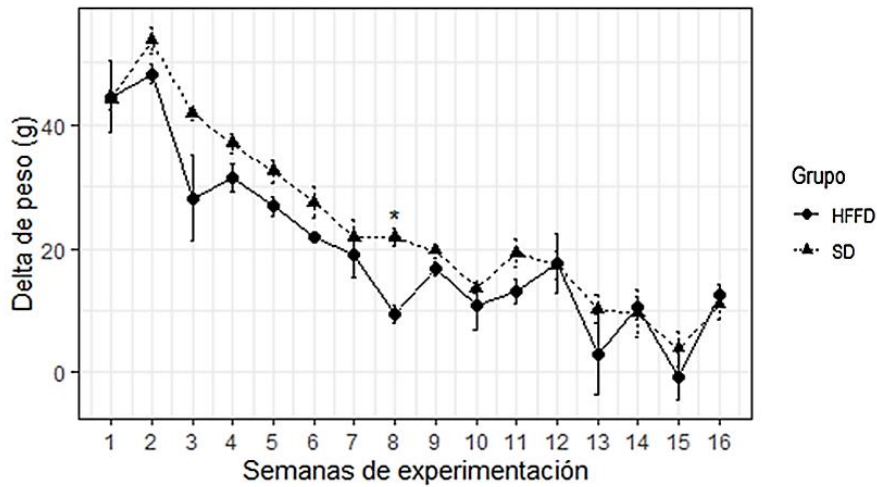


Figura 1A. Delta del peso. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba T student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD=dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

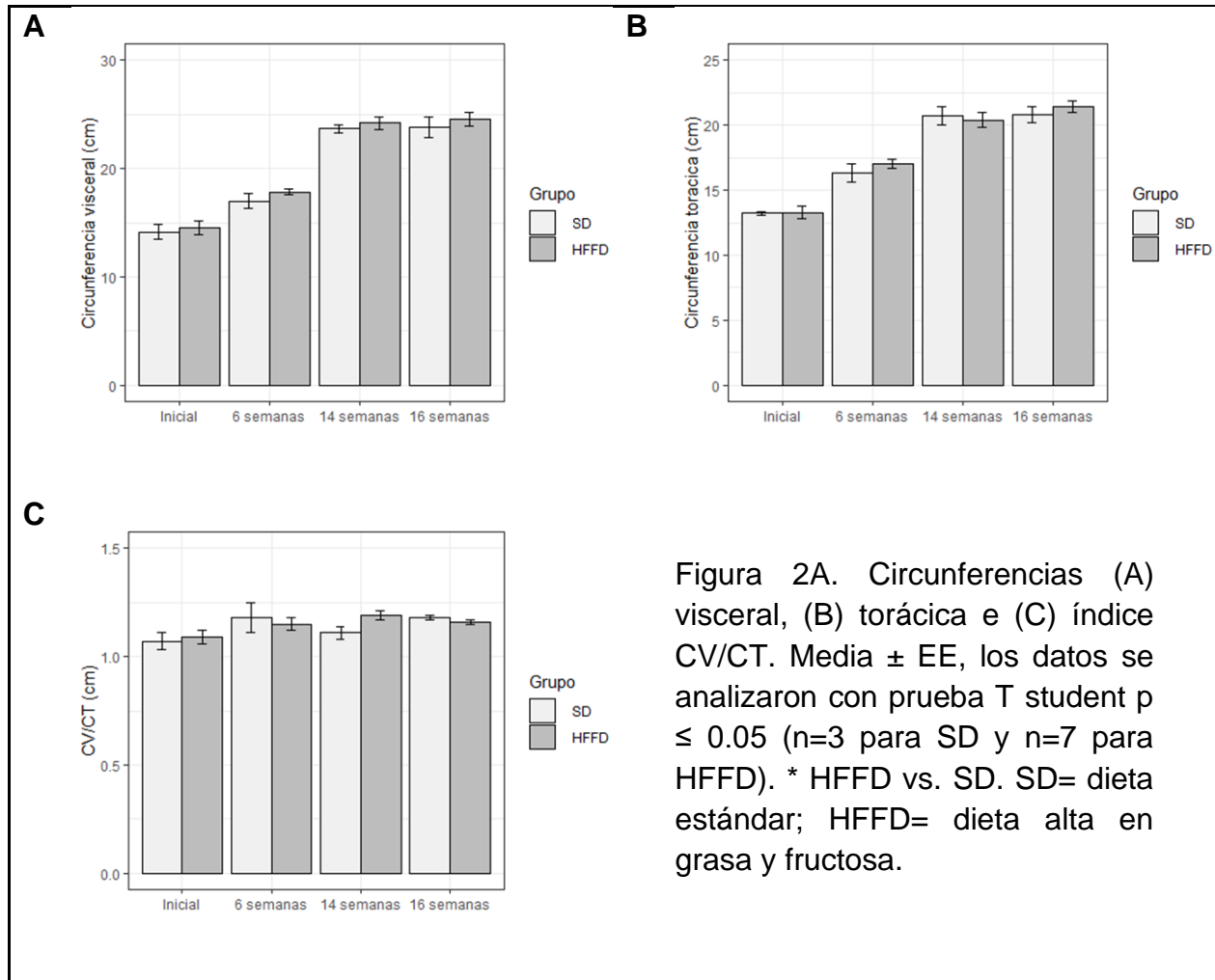


Figura 2A. Circunferencias (A) visceral, (B) torácica e (C) índice CV/CT. Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba T student $p \leq 0.05$ (n=3 para SD y n=7 para HFFD). * HFFD vs. SD. SD=dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

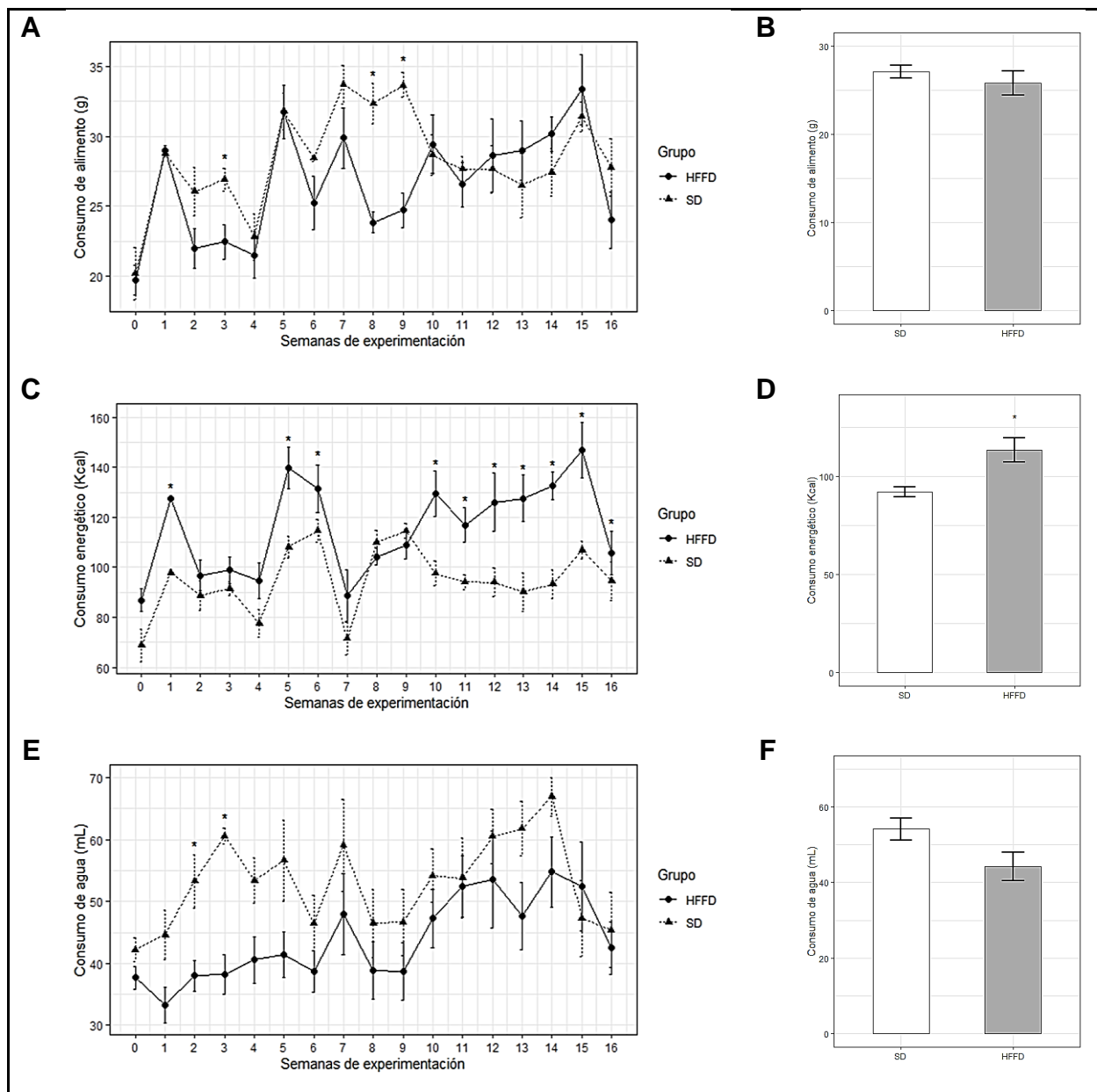


Figura 3A. Consumo de alimento por semana (A) y promedio (B). Consumo de energía por semana (C) y promedio (D). Consumo de agua por semana (E) y promedio (F). Media \pm EE, los datos se analizaron con prueba T student $p \leq 0.05$ ($n=3$ para SD y $n=7$ para HFFD). * HFFD vs. SD. SD= dieta estándar; HFFD= dieta alta en grasa y fructosa.

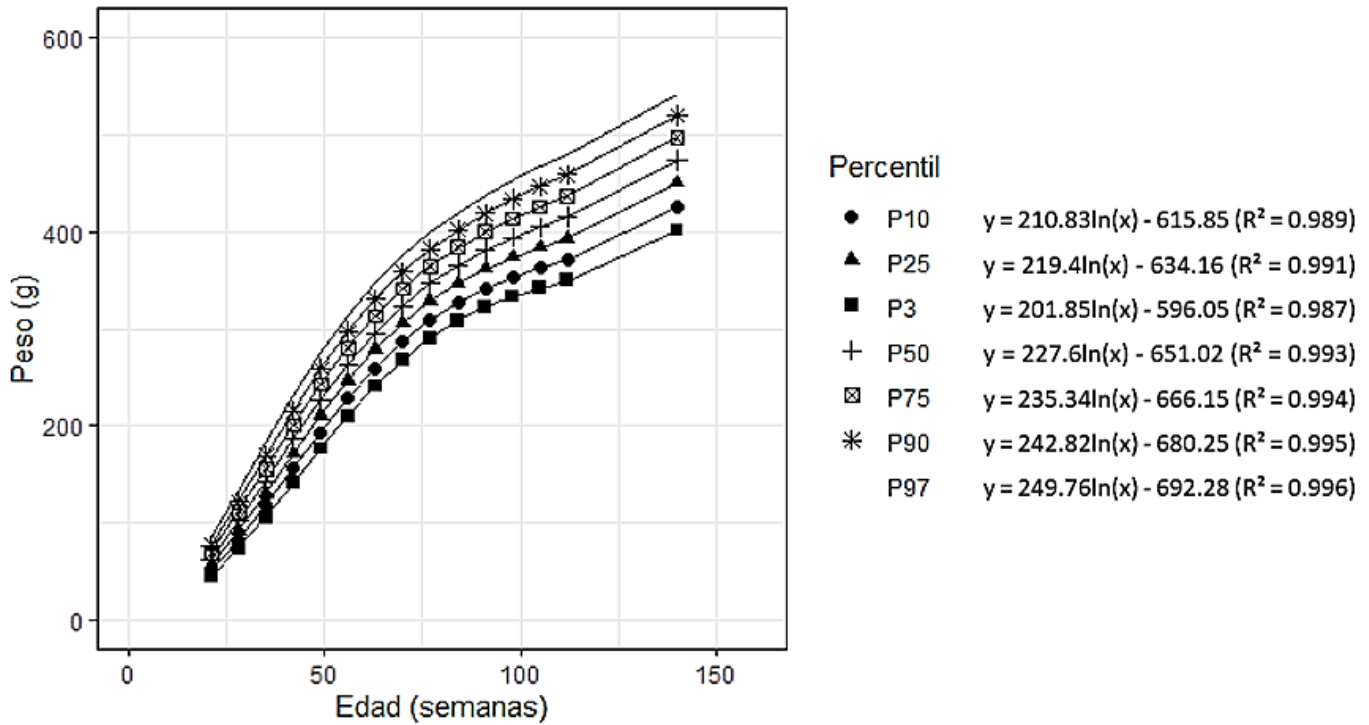


Figura 4A. Curva de crecimiento de peso corporal de ratas machos Wistar en función de la edad. El peso promedio de los percentiles (P) 3 al 97 para ratas de 21 a 112 días de edad se obtuvo de las tablas propuestas por Cossio-Bolaños y colaboradores (2013). El valor del peso promedio para ratas de 140 días de edad (últimos siete puntos) se calculó a partir de las ecuaciones obtenidas por regresión lineal de dichos valores de referencia.

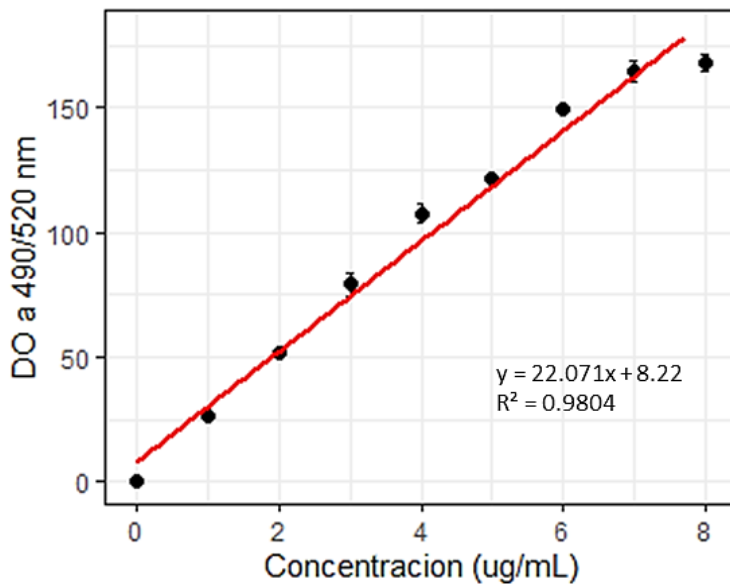


Figura 5A. Curva estándar de la concentración de FICT-dextrano en suero sanguíneo. Media \pm DE, los datos se analizaron mediante LMS. La gráfica muestra los valores de densidad óptica (DO) de las concentraciones de la curva de 0 a 8 $\mu\text{g/mL}$ de FICT-dextrano.