



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**PERFIL DE LA MICROBIOTA FECAL EN RATAS SUPLEMENTADAS CON UN  
EXTRACTO DE PASTA DE SOYA**

**TESIS INDIVIDUAL**

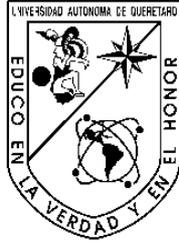
**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**LILIANA YADIRA MORALES MARTÍNEZ**

**DIRIGIDO POR:**

**DRA. ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ**



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**

Perfil de la microbiota fecal en ratas suplementadas con un extracto de pasta de soya

**Tesis individual**

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

**Presenta:**

Liliana Yadira Morales Martínez

**Director**

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

**SINODALES**

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
México

## RESUMEN

La soya es una fuente de proteína utilizada en la alimentación de animales y humanos, debido a que contiene aminoácidos esenciales de gran valor nutricional. Sin embargo, la soya contiene factores anti nutricios que inhiben la asimilación de nutrientes, por lo que puede llegar a ocasionar daños en la fisiología del huésped. No obstante existe poca información sobre el efecto que tiene en la microbiota intestinal. El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto de la inclusión de la pasta de soya sobre la microbiota intestinal en ratas Sprague Dawley. En el cual se utilizaron 24 ratas macho de 4 semanas de edad, para ser divididos en dos grupos; grupo control al que se administro solución salina y grupo tratado con dosis ajustada de (0,17g/kg) de pasta de soya, ambos por vía intragástrica y se mantuvieron durante 14 semanas con un periodo de recuperación de 2 semanas. Se observó que el extracto de pasta de soya provocó cambio en el peso y longitud de los intestinos, en diferentes tiempos de administración, comparados con el control. Los cambios del perfil bacteriano fueron dependientes de la edad de las ratas evaluadas.

**Palabras clave:** pasta de soya, microbiota, ratas Sprague Dawley

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi madre Emilia <sup>†</sup>, aunque ella ya no esté presente, siempre le voy a agradecer su apoyo y su amor incondicional. Ella me enseñó a nunca rendirme, por muy difícil que sean las cosas, y a luchar tanto por mis sueños como por mis metas.

A mi tía Marcelina, que es una parte fundamental en mi vida. Gracias por el apoyo que siempre me ha brindado en todo el trayecto de mi vida.

A Germain, por su cariño y su apoyo incondicional.

A mis primos por estar siempre ahí, y que nunca se les olvide que los sueños y metas no son imposibles de alcanzar, solo es cuestión de trabajar muy duro. No importa las pruebas que la vida nos pone, siempre hay que dar lo mejor y luchar por lo que uno desea.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de formar parte de su historia como alumna de la Licenciatura en Microbiología.

A la Dra. Andrea, por su apoyo para llevar a cabo este trabajo y por su dedicación y paciencia.

A mis compañeros del Laboratorio Aarón y Julia por sus enseñanzas y su amistad.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## INDICE

Resumen.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos .....	5
Indice .....	6
Índice de Cuadros.....	8
Índice de Figuras.....	9
Introducción.....	10
II. Marco Teórico .....	12
2.1 Soya.....	12
2.1.1 Características de la soya.....	12
2.1.2 Producción de soya y su uso en la alimentación pecuaria.....	13
2.1.3 Factores anti nutricionales .....	14
2.1.3.1 Lectinas.....	14
2.1.3.2 Clasificaciones de lectinas .....	15
2.1.3.3 Lectina de soya con dominio vegetal .....	16
2.2 Fisiología digestiva.....	17
2.2.1 Anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal .....	17
2.2.2 Digestion de los alimentos .....	20
2.2.3 Fermentación microbiana.....	20
2.3 Microbiota.....	23
2.3.1 Interacción entre microbiota y hospedero .....	23
2.3.2 Colonización microbiana en el tracto gastrointestinal .....	25
2.3.3 Relación de la microbiota con el metabolismo .....	27
2.3.4 Relación de la microbiota con el sistema inmune .....	28
2.4 Técnicas moleculares para el estudio de la microbiota .....	29
2.4.1 Herramientas moleculares .....	30
2.5 Efecto de la soya en la microbiota intestinal .....	33
III. JUSTIFICACIÓN .....	35
IV. HIPÓTESIS.....	36
V. OBJETIVOS.....	36

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1 Diseño de estudio y aprobación ética .....	37
6.2 Animales experimentales e instalaciones.....	37
6.3 Tratamientos .....	37
6.4 Muestreo de materia fecal.....	38
6.5 Análisis de las muestras de heces .....	39
6.6 Pureza y concentración de DNA .....	39
6.7 Determinación del perfil bacteriano.....	39
6.8 Árbol filogénico.....	40
6.9 Análisis estadístico.....	40
VII. RESULTADOS .....	40
7.1 Peso y longitud de órganos.....	41
7.2 Marcadores hematológicos .....	44
7.3 Perfil de la microbiota.....	44
VIII. DISCUSIÓN.....	47
IX. CONCLUSIÓN.....	50
X. RECOMENDACIONES.....	50
XI. REFERENCIAS .....	51
XII. APÉNDICE .....	64
Apéndice 1. Carta del comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.....	63
Apéndice 2. Análisis de pureza e integridad de DNA en NANODROP 2000c .	64
Apéndice 3. Preparación de muestras para PCR.....	65
Apéndice 4. Perfil electroforético de DNA bacteriano de los pools de ratas Sprague Dawley por semana identificando como banda positiva.....	66
Apéndice 5. Matriz binaria obtenida del programa Quantity One .....	67

## ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1. Comparación de la anatomía del tracto gastrointestinal en humanos y modelos animales.</u> .....	20
<u>Cuadro 2. Peso de órganos después de la administración de un extracto de pasta de soya.</u> .....	40
<u>Cuadro 3. Marcadores hematológicos después del tratamiento con un extracto de pasta de soya.</u> .....	44
<u>Cuadro 4. Reporte total de bandas del perfil bacteriano por semanas de tratamiento con un extracto de pasta de soya (QuantityOne).</u> .....	45

Dirección General de Bibliotecas UAG

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1. Anatomía macroscópica del tracto gastrointestinal del humano y del ratón</u> .....	19
<u>Figura 2. Diseño experimental.</u> .....	38
<u>Figura 3. Peso y longitud después de la administración con un extracto de pasta de soya</u> .....	43
<u>Figura 4. Perfil electroforético de DNA bacteriano de los pools de ratas SpragueDawley por 14 semanas.</u> .....	45
<u>Figura 5. Dendograma (UPGMA) de los perfilesde bandas bacterianas de los pool de ratas por 14 semanas</u> .....	46

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## INTRODUCCIÓN

La soya es una proteína con alta calidad que contiene todos los aminoácidos esenciales de origen animal (Chatterjee *et al.*, 2018) y puede ser utilizada en dos formas; semilla integral (frijol) o harina (Buitrago, s. f.).

Diferentes estudios han descrito efectos benéficos sobre la salud cuando se incluye la soya en la dieta entre estos se encuentran disminución en la concentración de triglicéridos, colesterol, lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) y colesterol total (Fernandez-Raudales *et al.*, 2012). Adicionalmente, la soya está relacionada con la reducción de la inflamación del colon (Huang *et al.*, 2016). Sin embargo, la soya contiene factores anti nutricios como la lectina e inhibidores de tripsina que dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes de origen vegetal (Chaparro *et al.*, 2009). Estos factores pueden ocasionar daño en el desarrollo del crecimiento de algunos animales y ocasionar un cambio en la microbiota intestinal (Pan *et al.*, 2018)

Las lectinas son glicoproteínas termoestables con un alto grado de especificidad a carbohidratos de la superficie celular, capaces de aglutinar eritrocitos (Liener, 1994). Las lectinas vegetales de acuerdo a su estructura molecular se clasifican en base a su especificidad: lectinas aisladas de legumbres, lectinas con dominio tipo heveína o específica de quitina, lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa, lectinas en forma de prisma  $\beta$  o del tipo de jacalina, lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas, lectinas tipo amaranto (Cruz *et al.*, 2005).

La microbiota intestinal, juega un papel esencial dentro del huésped, manteniendo la homeostasis y cumpliendo funciones importantes como: el desarrollo del sistema inmune, la absorción de nutrientes, la metabolización de fármacos, y evita la colonización de nuevos microorganismos (O'Hara & Shanahan, 2006). Sin embargo, la microbiota se encuentra en un proceso dinámico, el cual va a estar cambiando por diversos factores, como la alimentación, el modo de parto y la edad (Nicholson *et al.*, 2012).

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar un extracto de pasta de soya sobre el cambio del perfil bacteriano y su efecto a nivel sistémico en ratas Sprague Dawley.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 SOYA

#### 2.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA SOYA

La soya (*Glycine Max*) es una legumbre de origen oriental, pertenece a la familia (*Fabaceas*) y es una fuente de proteína con alta calidad ya que contiene todos los aminoácidos esenciales de origen animal (Chatterjee *et al.*, 2018). La soya contiene glicina y  $\beta$ - conglucina, proteínas que ayudan a reducir riesgos de enfermedades cardiovasculares en humanos , reducir niveles de triglicéridos en sangre, colesterol lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) y colesterol total (Fernandez-Raudales *et al.*, 2012).

La composición nutricional de la soya depende de ciertos factores; zona geográfica, condiciones ambientales (Chatterjee *et al.*, 2018). La soya puede ser utilizada en dos formas; semilla integral (frijol) o harina. La semilla es tratada por medio de calor, con el fin de destruir factores anti nutricios que afecten la alimentación de los animales. La composición química de la semilla integral y la harina difieren en proteína y grasa. La harina de soya contiene alrededor de 18% de grasa y 38% de proteína, por lo que presenta mayor valor energético y menor valor proteico. Mientras, la semilla integral contiene entre 37 y 38% de proteína. El aceite de la semilla de soya contiene ácidos grasos no saturados como ácido linoleico, aceite esencial que no produce el cuerpo humano (Buitrago, s. f.; Chatterjee *et al.*, 2018). Debido a su alto contenido de grasa podría ser utilizado para la producción de biocombustible (Van Holle & Van Damme, 2015). La semilla no solo es importante por la cantidad, sino por la calidad (Buitrago, s. f.).

Los inhibidores de tripsina son un factor anti nutricio que se encuentra en las legumbres, por lo que ocasiona un impacto en el valor nutricional de la soya. Los inhibidores de tripsina inhibe la serina proteasa en el páncreas estimulando la secreción del jugo pancreático, y reduciendo la digestión de proteínas. En animales se ha observado que ocasiona hipertrofia e inhibe el crecimiento en pollos (Tuśnio *et al.*, 2017). Las isoflavonas y la aglutinina de soya están

relacionadas con efectos benéficos para la salud, previenen de enfermedades cardíacas, diabetes, síntomas menopáusicos, osteoporosis. Además, de inducir autofagia y apoptosis presentado actividad inhibitoria del 50% en diferentes tipos de líneas celulares HeLa (cáncer cervical), MDA-MB-231 (cáncer de mama), HepG2 (cáncer de hígado), Hep2 (cáncer oral), U373 (glioblastoma) después de 72 horas de administración (Chatterjee *et al.*, 2018; Panda *et al.*, 2014). Además, de modular el ciclo celular, y llevar a cabo la apoptosis, diferenciación y proliferación celular (Huang *et al.*, 2016).

### **2.1.2 PRODUCCIÓN DE SOYA Y SU USO EN LA ALIMENTACIÓN PECUARIA**

Las semillas de soya son tóxicas para los seres humanos y los animales monogástricos, por lo que requieren de tratamiento por calor para inhibir los inhibidores de tripsina. La temperatura óptima para el desarrollo de la soya está entre 20°C y 30°C. Los principales países productores de soya son Argentina, Brasil, China, India, Paraguay y Estados Unidos de América. La producción mundial total alcanzó los 230 millones de toneladas en 2008 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura», s. f.). En México se produce alrededor de 3.5 millones de toneladas de soya para el consumo animal, obtención de aceite y proteínas para el consumo humano (Torres y Torres & Tovar-Palacio, 2009).

Según la FAO (por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization) el sector ganadero consume anualmente 6,000 millones de toneladas entre forrajes, granos, piensos y otros materiales, incluyendo un tercio de la producción mundial de cereales. El 86% de la ingesta animal se compone de materiales que no son de consumo humano. Por otra parte, los derivados de la soja, cuya producción en ocasiones resulta un factor clave en el cambio de usos de suelos, representa el 4% de la ingesta animal a escala global.

### 2.1.3 FACTORES ANTI NUTRICIONALES

El valor nutricional de la soya se ve afectado por la presencia de factores anti nutricios, término utilizado para definir aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, especialmente semillas, de manera que dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes que provienen de alimentos de origen vegetal. Los factores anti nutricios pueden causar efectos fisiológicos tales como flatulencia, distensión estomacal, afectaciones pancreáticas, aglutinación de glóbulos rojos, disminución en la asimilación de nutrientes (Chaparro *et al.*, 2009).

Los principales factores anti nutricios que contiene la soya son ácido fítico, taninos, lectinas, proteasas, e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, e inhibidores de tripsina que pueden afectar la fisiología del tracto gastrointestinal (Röhe *et al.*, 2017).

Las proteínas antigénicas son capaces de cruzar la barrera del epitelio de la mucosa intestinal dañándola y produciendo efectos negativos en el funcionamiento del sistema inmune del consumidor. En rumiantes alimentados con soya se ha observado cambios morfológicos anormales en las vellosidades, y altos niveles de inmunoglobulina G (Ig G) en suero (Chaparro *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018).

Los factores anti nutricios pueden ser eliminados utilizando métodos por calor: como la infusión de soya, cocimiento de la semilla integral con agua, someter la semilla a vapor comúnmente conocido como “tostado”. En la preparación de las tortillas mexicanas, los inhibidores de tripsina son eliminados por completo, con 10% hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y  $80^\circ\text{C}$  por una hora (Liener, 1994).

#### 2.1.3.1 LECTINAS

Las lectinas son proteínas de origen no inmune presentes en bacterias, hongos, virus, plantas y animales. Tienen alto grado de especificidad a carbohidratos de la superficie celular. Las lectinas presentan funciones protectoras contra agentes patógenos (Van Holle & Van Damme, 2015).

Las lectinas son glicoproteínas termoestables con actividades biológicas tales como: aglutinación de eritrocitos, estimulación mitógena de linfocitos e inhibición de la fagocitosis (Liener, 1994). Dado que las lectinas son sustancias que se encuentran en las leguminosas, se sugiere que la resistencia que estas presentan se debe a la toxicidad de las lectinas (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

En animales se ha reportado que las lectinas participan en el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de las células envejecidas, células tumorales y microorganismos, mediante el proceso de opsonización y participación de células fagocíticas (Cruz *et al.*, 2005; Micucci, s. f.). Además, se ha demostrado que las lectinas presentan actividad inmunosupresora, inhiben el crecimiento celular tumoral y participan en la adhesión celular (Cruz *et al.*, 2005).

Así como, pueden unirse a las glicoproteínas de la superficie del epitelio intestinal, afectando la absorción de nutrientes y a su vez, la función de los órganos digestivos ocasionando, daños a nivel sistémico (Alatorre-Cruz *et al.*, 2018; Reynoso-Camacho *et al.*, 2003), además, de activar el sistema inmune (Pereira-da-Silva *et al.*, 2012).

### 2.1.3.2 CLASIFICACIONES DE LECTINAS

Las plantas expresan lectinas en señal de estrés, cambios ambientales y ataque a patógenos. Estas moléculas se encuentran en el núcleo y citoplasma de la célula vegetal. Las lectinas participan en la interacción entre bacteria fijadoras de nitrógeno con la raíz de la planta de las legumbres y de acuerdo a su estructura molecular se clasifican con base a su especificidad (Cruz *et al.*, 2005) de la siguiente manera:

- Las lectinas aisladas de vegetales. Estas se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades con peso molecular de 25 a 30kDa y contienen un sitio de unión para iones metálicos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ .

- Lectinas con dominio tipo heveína o específicas de quitina. Estas lectinas presentan dos subunidades ricas de cisteína. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes de disulfuros, lo cual origina que no exista estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña  $\alpha$ - hélice de cinco residuos: cada dominio tiene un sitio de reconocimiento a carbohidratos, sin necesidad de iones metálicos.
- Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa. Estas lectinas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12kDa y una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidratos está constituido por cuatro hojas  $\beta$ - antiparalelas unidas entre sí por giros.
- Lectinas en forma de prisma  $\beta$  o del tipo de jacalina. Estas lectinas son tetraméricas glicosiladas, donde cada subunidad contiene una cadena pesada ( $\alpha$ ) y una cadena ligera ( $\beta$ ).
- Lectinas relacionadas con proteínas inactivadas de ribosomas. Estas se encuentran constituidas por dos cadenas (A y B) están unidas por dos puentes de disulfuro.
- Lectinas tipo amaranto. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros con los dominios N y C.

### 2.1.3.3 LECTINA DE SOYA CON DOMINIO VEGETAL

La aglutinina de soya SBA (por sus siglas en inglés Soybean agglutinin) es un factor anti nutricio que presenta afinidad a *N- glucósido-D- galactosamina* galactosa, tiene cuatro subunidades, cada una de ellas contiene  $\text{Ca}^{2+}$  unido a  $\text{Mn}^{2+}$ . Los cuales son necesarios para unirse a glucosa. SBA es estable a diferencia de otras lectinas, debido a sus enlaces de hidrógeno y sus interacciones hidrófobas entre dos monómeros de la molécula de SBA (Pan *et al.*, 2018). SBA presenta actividad hemaglutinina, el cambio de estructura de

está produce un aumento de peso corporal en animales monogástricos con soya (Pan *et al.*, 2018).

SBA puede resistir a la degradación por proteasas *in vitro* en el tracto gastrointestinal (TGI); se une a las células del epitelio intestinal. La unión específica es un prerrequisito y condición necesaria para el efecto anti nutricional. Después de combinarse con la superficie intestinal, las células epiteliales pueden internalizar el SBA para ingresar al flujo sanguíneo, ocasionando daño en la estructura y función del intestino. Además, de ocasionar un desequilibrio en la microbiota intestinal (Pan *et al.*, 2018).

Tres posibles mecanismos se han descrito en el cual SBA aumenta la actividad microbiana. Primero, la unión de SBA a las células epiteliales del intestino delgado alterando la estructura del glúcano, modificando los sitios de unión de algunas bacterias en la superficie intestinal. Segundo, la inducción de SBA proporciona nutrientes para el crecimiento transitorio de algunas bacterias. Tercero, SBA ocasiona un desequilibrio en el sistema inmune reduciendo la secreción de la inmunoglobulina A (Ig A) (Pan *et al.*, 2018).

## **2.2 FISIOLÓGÍA DIGESTIVA**

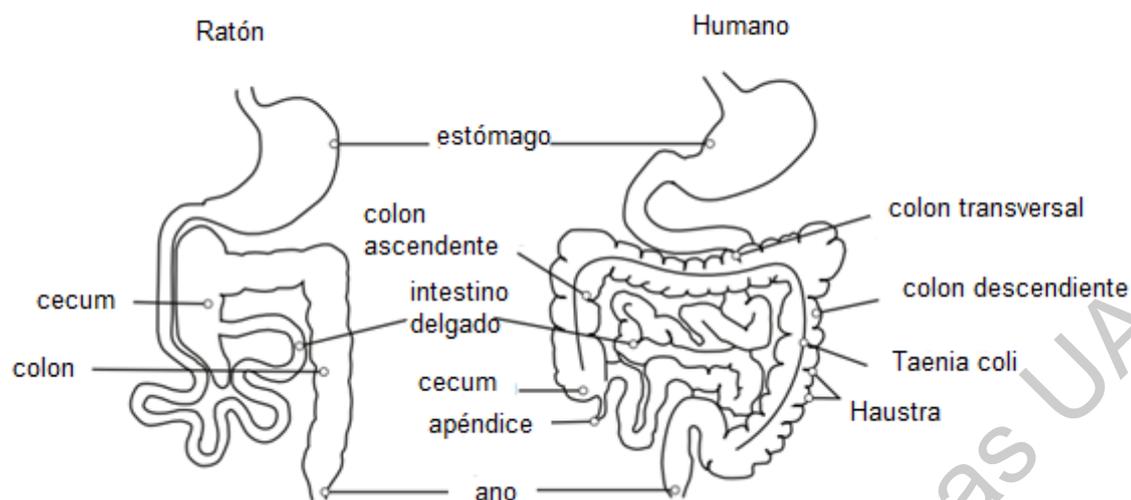
### **2.2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL**

El tracto gastrointestinal (TGI) de los animales monogástricos, se compone de diferentes secciones anatómicas: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso y ano. Cada una de ellas cumple diversas funciones, y presentan diferente morfología (cilindros, esferoides o formas intermedias) (Angosto & Villarejo, 2014; Liao *et al.*, 2009). En la figura 1 se muestra la estructura anatómica y fisiológica del TGI, del ratón y el humano. Sin embargo, existen diferencias notorias (cuadro 1), debido al tipo de dieta, el tamaño corporal y la actividad metabólica. No obstante, el ratón se ha utilizado como modelo de estudio para humanos (Nguyen *et al.*, 2015).

Los humanos presentan un intestino delgado e intestino grueso, en el intestino delgado se produce la digestión y la absorción de los alimentos se divide en

tres partes, duodeno, yeyuno e íleon. Las sales biliares de la vesícula biliar y las enzimas del páncreas ingresan al duodeno y se mezclan con el quimo del estómago para iniciar el proceso de la digestión. El yeyuno e íleon son los responsables de la absorción de la glucosa en el torrente sanguíneo a través del transportador de iones de sodio (Hillman *et al.*, 2017).

Dentro del epitelio del intestino delgado se encuentra una capa de células conocidas como células epiteliales; enterocitos, absorbentes (los primarios), células de Paneth (sustancias antimicrobianas secretoras), células caliciformes (secretando mucinas), células entero-endocrinas (secretando hormonas gastrointestinales) y células mal plegadas o células M (presentando antígenos a las células linfoides subyacentes) (Yang & Liao, 2019). El intestino delgado es seguido por el intestino grueso (colon), presenta un diámetro mayor, pero con una longitud más corta y se divide en tres secciones: ascendentes (ciego), transversa y descendente. El agua y los minerales se absorben continuamente a lo largo del colon antes de la excreción (Hillman *et al.*, 2017).



**Figura 1. Anatomía macroscópica del tracto gastrointestinal del humano y del ratón** (Nguyen *et al.*, 2015). El humano y el ratón presentan un estómago, intestino delgado, cecum. El colon del humano se encuentra dividido en tres secciones (ascendente, transversal, y descendiente) con la presencia de *Taenia coli*. El humano el único que presenta apéndice.

Órgano	Humano	Ratón	Rata	Cerdo
<b>Estómago</b>	Cuatro regiones: cardias, fondo, cuerpo y píloro	Tres regiones: estómago, cuerpo y píloro	Tres regiones: estómago, cuerpo y píloro	Cuatro regiones: esófago, cardias, fondo y píloro
	pH 1.5 a 3.5	pH 3.0 a 4.0	pH 3.0 a 4.0	pH 1.5 a 2.5
<b>Intestino delgado</b>	5.5 a 6.4 m de largo	350mm de longitud	1.485 mm de longitud	1.2 a 2.1 m de largo
	pH 6.4 a 7.3	pH 4.7 a 5.2	pH 5.0 a 6.1	pH 6.1 a 6.7
<b>Ciego</b>	Más pequeño que el colon	Más grande que el colon	Más grande que el colon	Más pequeño que el colon
	Sin fermentación	Fermentación principal	Fermentación principal	Alguna fermentación
	pH 5.7	pH 4.4 a 4.6	pH 5.9 a 6.6	pH 6.0 a 6.4
<b>Apéndice</b>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Colon</b>	Dividido en tres: Ascendente, transendente y descendente	Sin división	Sin división	Dividido en tres: Ascendente, transendente y descendente
	Fermentación principal	Sin fermentación	Sin fermentación	Fermentación principal
	Mucosa gruesa	Mucosa más delgada	Mucosa más delgada	Mucosa gruesa
	pH 6.7	pH 4.4 a 5.0	pH 5.5 a 6.2	pH 6.1 a 6.6

**Cuadro 1. Comparación de la anatomía del tracto gastrointestinal en humanos y modelos animales. (Hillman *et al.*, 2017).**

### 2.2.2 DIGESTIÓN DE LOS ALIMENTOS

El sistema digestivo humano consta de una serie de órganos y glándulas especializadas, cada una de ellas desempeña un papel fundamental en la digestión y/o absorción de alimentos. Los alimentos pasan por un proceso de digestión, donde son descompuestos a través de interacciones químicas y mecánicas ocasionadas por respuestas secretoras y motoras del TGI (Ferrua & Singh, 2010). El jugo digestivo es una secreción al cual ayuda a descomponer las enzimas, las proteínas, carbohidratos y grasas. Las contracciones musculares de todo el TGI generan procesos mecánicos y el movimiento de los fluidos para llevar a cabo la digestión, absorción y transporte de nutrientes (Ferrua & Singh, 2010). Las respuestas secretoras y motoras del TGI van a depender de cantidad, composición y características fisicoquímicas de los alimentos (Ferrua & Singh, 2010).

El esófago sirve para transportar el bolo alimenticio desde la boca hasta el estómago, donde los alimentos se almacenan durante un tiempo mientras se descomponen simultáneamente en componentes más pequeños (Liao *et al.*, 2009). Se forma un compuesto llamado quimo, que es el conjunto entre el alimento y las secreciones gástricas. Una vez formado el quimo pasa al intestino delgado donde se lleva la mayor parte de la digestión. El quimo entra en contacto con las secreciones enzimáticas pancreáticas y sales biliares que ayudan a la degradación de los alimentos (Arroyo & Pamela, 2014; Pacheco *et al.*, 2017). Finalmente en el intestino grueso se acumulan las sustancias de desecho y son expulsadas de manera controlada a través del conducto anal.

### 2.2.3 FERMENTACIÓN MICROBIANA

Los alimentos pasan a través del TGI y la tasa de absorción de nutrientes depende en gran medida de las actividades de varias enzimas en el sistema digestivo, como la amilasa en la saliva, la pepsina en el estómago y las enzimas pancreáticas en el intestino delgado. Sin embargo, muchos de los componentes que no pueden ser digeridos en el TGI superior pasan al colon donde se lleva a cabo la fermentación microbiana (Hillman *et al.*, 2017)

La fermentación comienza después de que las fibras dietéticas se despolimerizan por enzimas hidrolíticas microbianas. Entre más rápido sea el proceso más rápido estarán disponibles los carbohidratos para la fermentación por las bacterias (Rajesh Jha *et al.*, 2019).

La fermentación microbiana da como resultado la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ácidos grasos de cadena ramificada, lactato, aminas, índoles, fenoles y varios gases como hidrogeno, dióxido de carbono y metano (R. Jha & Berrocoso, 2015).

En animales monogástricos el intestino grueso es el sitio más importante para llevar a cabo la fermentación. En el colon se lleva a cabo la fermentación de carbohidratos como almidón, e inulina obteniendo como producto final el acetato, propionato y butirato. El acetato es un producto en mayor concentración después de llevar a cabo la fermentación en el TGI (R. Jha & Berrocoso, 2015). El acetato y propionato son absorbidos por los hepatocitos, donde el acetato es utilizado para la lipogénesis en el tejido muscular, mientras, que el propionato se convierte en glucosa mediante el proceso de gluconeogénesis. En cambio, el butirato es la fuente principal de energía para los colonocitos y ayuda en el desarrollo y proliferación en el intestino delgado (Qin *et al.*, 2010; Samuel *et al.*, 2008).

Los AGCC como el butirato y el propionato, puede reducir el pH intestinal, lo que aumentaría la solubilidad de minerales esenciales, como el calcio, el hierro y el magnesio, en consecuencia mejora la salud. Los metabolitos producidos por los microbios también pueden desempeñar un papel importante en la diferenciación celular y la proliferación en la mucosa del colon al inducir la apoptosis y pueden contribuir a la protección contra la colitis y al cáncer colorrectal al modular la expresión del oncogén. Estas funciones no parecen ser realizadas por una sola especie sino por un conjunto de especies que están actuando de manera conjunta o independiente (Hillman *et al.*, 2017). Existe evidencia que respaldan que bajas concentraciones de AGCC, en particular el butirato, puede aumentar el riesgo de cáncer colorrectal y enfermedades intestinales inflamatorias. Los diferentes tipos de polisacáridos tienen diferentes impactos en el rendimiento de los AGCC. Por ejemplo, la fermentación de

almidón por bacterias fecales en humanos produce una mayor cantidad de butirato. Las bacterias productoras de butirato son *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* y *Roseburia* spp (Zhang *et al.*, 2018).

Estudios han reportado que el butirato juega un papel protector en la prevención y progresión de la carcinogénesis colorrectal (Hamer *et al.*, 2007). En cerdos la concentración elevada de butirato ayuda a mejorar la salud de la mucosa intestinal y el sistema inmunológico (Rajesh Jha *et al.*, 2019).

## **2.3 MICROBIOTA**

La palabra microbiota hace referencia al conjunto de comunidades microbianas, no solo bacterias, sino también otros microorganismos como hongos, arqueas, virus y protozoos (Jandhyala, 2015; Turnbaugh & Stintzi, 2011). La microbiota intestinal realiza una serie de funciones protectoras, estructurales y metabólicas esenciales para la salud del huésped, incluido el procesamiento de alimentos, la digestión de polisacáridos complejos no digeribles por el huésped, el desplazamiento de patógenos y la síntesis de vitaminas (Clarke *et al.*, 2014). Sin embargo, la microbiota intestinal se ha asociado a una gran variedad de enfermedades humanas, como enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome del intestino irritable, enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes (Jandhyala, 2015).

### **2.3.1 INTERACCIÓN ENTRE MICROBIOTA Y HOSPEDERO**

La relación simbiótica entre microorganismo (MO) y el huésped es un proceso evolutivo bajo la fuerza de selección adaptable. El término microbiota hace referencia al conjunto de comunidades microbianas (bacterias, archaea, virus, protistas y hongos). En el cuerpo humano se encuentra alrededor de 100 trillones de células microbianas (Turnbaugh & Stintzi, 2011). El material genético de los microorganismos (MOs) es conocido como microbioma (Tremaroli & Bäckhed, 2012). El microbioma va a depender de la diversidad de

genes para adaptarse y responder a los cambios ambientales (Tremaroli & Bäckhed, 2012).

El microbioma humano está formado por diversos hábitats que consiste en un conjunto de recursos y condiciones favorables permitiendo el crecimiento de los MOs. Así mismo, forman nichos que permiten realizar funciones benéficas para el hospedero (Cerqueda-García & Falcón, 2016; Whittaker *et al.*, 1973).

El cuerpo humano es considerado como un holobionte. Palabra que fue descrita por Lynn Margulis como una asociación simbiótica (Bordenstein & Theis, 2015). El concepto holobionte no considera a los microbios como individuos autónomos sino como unidades biológicas altamente organizadas (Milani *et al.*, 2017). La simbiosis involucra muchas dimensiones o tipos de contacto entre organismos de diferentes especies: comportamiento, fisiología, productos genéticos (Lavagnino *et al.*, s. f.).

La microbiota intestinal es considerada como un órgano, por lo que realiza funciones esenciales en el desarrollo del sistema inmune, absorción de nutrientes, metabolismo de fármacos, la prevención de nuevos colonizadores estimula la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) (Lavagnino *et al.*, s. f.; O'Hara & Shanahan, 2006). En mamíferos libres de gérmenes se ha observado problemas en el aparato digestivo presentando pared atrófica y motilidad alterada, el sistema inmune presenta inmadurez, el ciego se encuentra agrandado. Los niveles de citoquina, inmunoglobulinas, placas de Peyer, péptidos antimicrobianos, se encuentran en menor concentración. Además de ser susceptibles a infecciones (O'Hara & Shanahan, 2006; Reading & Kasper, 2011).

La diversidad bacteriana dentro del intestino va a variar dependiendo del tránsito del tubo digestivo. En el estómago y el duodeno se encuentra alrededor de  $10^3$  UFC/mL, yeyuno e ileón  $10^4$ - $10^7$ UFC/mL, colon  $10^{11}$  - $10^{12}$  UFC/mL (O'Hara & Shanahan, 2006). Las células epiteliales junto con el intestino delgado son encargadas de la digestión y la absorción de nutrientes. El estómago produce ácidos biliares y secreciones pancreáticas, además, de tener un ambiente ácido con un pH bajo haciendo difícil la colonización de MOs. Sin embargo, en el colon se encuentra mayor cantidad de MOs, ya que el

tránsito es lento y lleva a cabo la fermentación de compuestos orgánicos y el pH es alto (Jandhyala, 2015).

### 2.3.2 COLONIZACIÓN MICROBIANA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL

La microbiota es un proceso dinámico que va a estar cambiando constantemente. La sucesión primaria comienza a partir del nacimiento del neonato, la colonización va a depender del tipo de parto (vía cesárea o vía vaginal), la alimentación (leche materna o fórmula), administración de antibióticos, zonas geográficas, exposición al estrés, y hábitos alimenticios (Milani *et al.*, 2017).

En 1918, Arthur Kendall propuso que la primera colonización microbiana comenzaba después del parto. Esta propuesta sigue siendo válida, ya que existe poca evidencia de lo contrario. A pesar del uso de las técnicas moleculares no es posible determinar poblaciones bacterianas a “baja densidad”. Además, de resultar difícil evitar la contaminación en la recolección de muestras estériles en entornos clínicos (Perez-Muñoz *et al.*, 2017). Adicionalmente, utilizando controles robustos y considerando cantidades bajas de DNA, demostró que no hay evidencia de la presencia de un microbioma en la placenta (Lauder *et al.*, 2016).

El periodo neonatal es importante para el desarrollo de MOs dentro del TGI. Uno de los factores importantes para la colonización es el modo del parto, neonatos nacidos a través de la vía vaginal presenta microbiota vaginal de la madre como *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Atoobium* spp., y neonatos nacidos por vía cesárea presenta microbiota de la piel de la madre como *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., (Putignani *et al.*, 2014). El tipo de parto es importante por lo que se ha observado que aquellos neonatos nacidos por vía vaginal confieren mayor resistencia a infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) (Dominguez-Bello *et al.*, 2010).

El intestino es el primer órgano colonizado por bacterias aerobias y anaerobias facultativas por ser un medio rico en oxígeno, encontrando bacterias como *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus*  $\alpha$ - hemolítico, y *Staphylococcus* spp. Posteriormente, son reemplazadas por familias de anaerobios facultativos como *Actinobacteria* y *Firmicutes* (Adlerberth, 2008; Turroni *et al.*, 2012).

La microbiota intestinal tiene mayor diversidad en relación con la composición y densidad bacteriana, a través de la administración de sustratos para el crecimiento bacteriano, esta se vuelve más estable a una edad avanzada. La sucesión secundaria comienza con la lactación, seguida del destete (Koenig *et al.*, 2011).

La lactación es un proceso importante para el desarrollo del neonato. La leche humana contiene moléculas bioactivas como aminoácidos, vitaminas, minerales, inmunoglobulinas, citocinas, lisosimas, lactoferrina y factores de crecimiento. Que intervienen en la absorción de minerales, en el desarrollo del sistema inmune y el desarrollo del intestino. Además, de contener oligosacáridos de la leche humana (HMO por sus siglas en inglés) entre ellos, glucosa, galactosa, N- acetil- glucosamina. Los HMO presentan un efecto protector reduciendo la infección e inflamación (Coppa *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2017; Ficara *et al.*, 2018). Existen cambios de diversidad y abundancia de comunidades bacteriana mientras hay un suministro constante de leche. Las *Bifidobacterias* se encuentran en mayor abundancia (Oki *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo del huésped la microbiota intestinal interactúa con los metabolitos. Presentando genes con diferentes funciones como: resistencia a antibióticos, genes asociados a la membrana y pared celular, y genes que llevan a cabo la biosíntesis de amilasa, arabinosa, maltosa, ramnosa, fructo-oligosacáridos, rafinosa y xilosa. Y la degradación de xenobióticos (Koenig *et al.*, 2011).

En la microbiota intestinal las bacterias como los *Firmicutes* y *Proteobacterias* predominan en los primeros días de vida. Seguido por las *Actinobacterias* y *Proteobacterias* que se encuentran a los tres meses de vida. Al primer año del huésped los que se encuentran en mayor cantidad son los *Bacteroidetes*. Llevando a cabo la fermentación de carbohidratos y en la formación de la pared

celular de las bacterias Gram negativas, además, de la formación de cápsulas bacterianas (Koenig *et al.*, 2011).

Posterior al proceso de lactación, comienza el periodo de destete con la ingesta de alimentos sólidos que contienen carbohidratos no digeribles. Los hidratos de carbono ingresan al colon realizando cambios en el crecimiento del epitelio la proliferación celular y la microbiota intestinal. El páncreas, el intestino delgado y el colon comienzan a desarrollarse para llevar a cabo la digestión de los alimentos (Ficara *et al.*, 2018).

### 2.3.3 RELACIÓN DE LA MICROBIOTA CON EL METABOLISMO

La microbiota y las células epiteliales del huésped tienen una comunicación multidireccional, con el fin de mantener el equilibrio energético del huésped. Los microbiomas de los mamíferos comparten funciones metabólicas similares (Muegge *et al.*, 2011).

Los *Bacteroidetes* se encuentran en mayor abundancia en carnívoros, degradan las proteínas como fuente de energía. *Parabacteroides* degradan carbohidratos. Los *Bacteroides* también se encuentran en dietas ricas en grasas, junto con las *Actinobacterias* pero en menor cantidad en dietas ricas en fibra. Los *Firmicutes* y *Proteobacteria* se encuentran en mayor abundancia en herbívoros, por su degradación de aminoácidos. *Desulfovibrio*, *Ruminococcus* y *Akkermansia* degradan glucoproteínas de mucinas que se encuentran presentes en la capa de la mucosa del intestino delgado (Arumugam *et al.*, 2011; Muegge *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

El microbioma bacteriano modula reacciones metabólicas produciendo ácidos biliares, colina y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC son esenciales para los colonocitos debido a que regulan la motilidad intestinal y estimular la respuesta anti- inflamatoria (Nicholson *et al.*, 2012; Tremaroli & Bäckhed, 2012).

Los AGCC regulan los genes de expresión mediante la unión de receptores acoplados a la proteína G (PCR- G Protein Coupled Receptors) conocidos

como GPR41 y GPR43, expresados en el intestino distal, colon y adipocitos (Donohoe *et al.*, 2011; Samuel *et al.*, 2008). GPR41 produce ácido propiónico, estimulando la producción de leptina; hormona reguladora de los procesos fisiológicos tales, como alimentación, actividad nerviosa sináptica, reproducción y sistema inmune. La falta de esta hormona ocasiona disminución en la respuesta neuroendocrina, daños como obesidad, hiperfagia, infertilidad, daños en el sistema inmune (Xiong *et al.*, 2004).

#### **2.3.4 RELACIÓN DE LA MICROBIOTA CON EL SISTEMA INMUNE**

El sistema inmune inicia una respuesta ante MOs patógenos produciendo fiebre, enrojecimiento de la piel, dolor muscular ocasionando respuestas específicas como la activación de anticuerpos y células asesinas (NK *Natural Killer*). En el proceso de defensa participan células epiteliales secretoras de glicoproteínas de mucina, recubriendo el colon ~150µm de espesor (Hooper *et al.*, 2012). Además, de las células endocrinas, cáliz y enterocitos expresan patrones de reconocimiento de receptores (PRR), receptores extracelulares del tipo Toll (TLR), y dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD). Para detectar la presencia de MOs extraños. Los PRR inducen la maduración de las células dendríticas encargadas de activar la segunda línea de defensa, inmunidad adaptativa (Kawai & Akira, 2011).

Las células linfoides se encuentran en el TGI, incluido el colon. Estas células forman estructuras especializadas como las placas de Peyer y contienen células presentadoras de antígenos (células M) (Wells *et al.*, 2011). Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos e impiden el paso de las bacterias comensales al ganglio linfático. Además, de ser profesionales en la diferenciación de células T vírgenes (O'Hara & Shanahan, 2006; Wells *et al.*, 2011). Los enterocitos secretan células inmunitarias como péptidos antimicrobianos, inmunoglobulina A, citocinas, células M. los PRR activan células inmunitarias en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) inducen la producción de moléculas efectoras innatas. Se reconocen tres familias, receptores para dominio de oligomerización para la

unión de nucleótidos (NLRs) genes inducibles -1 de ácido retinoico (RIG-1) o receptores tipo RIG1 (RLRs), receptores tipo C unidos a la membrana (CLR) (Kawai & Akira, 2011; Wells *et al.*, 2011).

Los TLR son proteínas transmembranales del tipo I que contienen repeticiones de leucina (LRR). Localizándose en la membrana celular para reconocer los PAMPs por endocitosis y extracelulares. Se han reportado 13 receptores de la familia TLR en ratones y humanos (Wells *et al.*, 2011). Cada uno de los TLR tienen funciones distintas, los TLR1, TLR2, TLR6 reconocen lipoproteínas, TLR2 reconoce los PAMPs de bacterias Gram positivas y *Mycobacterias*, incluyendo el lipopéptido de las bacterias, ácido lipoteicoico, y el peptidoglicano (Furrie *et al.*, 2005). Los TLR junto con los TLR4 son expresados en las criptas de epitelio del colon (Wells *et al.*, 2011). Los TLR3 reconocen RNA bicatenario, estos son expresados en la superficie luminal. TLR4 reconocen lipopolisacáridos (LPS). Los TLR5 son PRR para flagelos. Los TLR7 y TLR8 reconocen RNA monocatenario. Los TLR9 reconocen DNA bicatenario. TLR11 y TLR12 reconocen la profilina, proteína relacionada al citoesqueleto. Los TLR13 reconocen RNAr bacteriano 23s (Furrie *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2011).

## **2.4 TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA**

Los estudios genómicos ofrecen una gran ventaja en la comprensión de los procesos asociados con la expresión génica y las interacciones genéticas (transcriptómica, proteómica, epigenómica, genética del desarrollo, epistasis, pleiotropía). Así como para conocer mejor la relación compleja genotipo-fenotipo ambiental (Escalante *et al.*, 2014). La metagenómica, es una herramienta de secuenciación de todos los genomas a partir de una muestra ambiental. Comenzó con la clonación de DNA ambiental, seguido de un análisis de expresión clonal y posteriormente por la secuenciación aleatoria directa de DNA ambiental (Thomas *et al.*, 2012).

La diversidad taxonómica es mediada mediante marcadores de secuencias genéticas, agrupación de similitud en función taxonómica o filogenética,

ensamblaje de secuencias (Sharpton, 2014). Los ensamblajes son importantes para describir la estructura de las comunidades microbianas.

### 2.4.1 HERRAMIENTAS MOLECULARES

**Bibliotecas de clones de DNA.** El primer paso es clonar los productos de PCR (Reacción de la Cadena de la Polimerasa) y posterior se realiza la secuenciación aleatoria utilizando bases de datos con secuencias existentes (Dorigo, Volatier, & Humbert, 2005) (Genebank<sup>TM</sup> o EMBL) obteniendo información en similitud y diversidad de especies conocidas (Dorigo *et al.*, 2005).

**Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).** Es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de DNA de doble cadena son separados con el mismo tamaño pero diferente secuencia de nucleótidos. La separación se lleva a cabo a través de la electroforesis utilizando geles de poliacrilamida que contiene gradiente lineal (urea y formamida) desnaturalizante de DNA. Al igual que su equivalente de desnaturalización con gradiente de temperatura (TGGE). El producto se separa dependiendo del peso molecular y los puentes de hidrogeno de las pares de bases (G≡C) (A=T) (Fakruddin & Mannan, 2013; Muyzer & Smalla, 1998).

Este método es altamente sensible y es reproducible. Permite evaluar las diferencias y similitudes que pudieran existir entre las muestras. Haciendo posible la detección e identificación de MOs no cultivables. Permite comparar la variabilidad genética de genes diana en diferentes poblaciones. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que solo pueden separarse por DGGE fragmentos pequeños (500 pb), las inferencias filogenéticas se ven limitadas. El método DGGE no es capaz de detectar aquellos MOs que constituyen al menos el 1% de la comunidad (Muyzer & Smalla, 1998).

**Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción Terminal (T-RFLP).** El producto de PCR es digerido con enzimas de restricción, utilizadas para reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA y cortas el DNA en un punto concreto, llamado sitio o diana

de restricción. T- RFLP necesita un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con un fluoróforo (Liu *et al.*, 1997). La desventaja de esta técnica es la generación de una baja estimación de las comunidades microbianas, debido al número limitado de bandas en el gel. Sin embargo, se puede determinar los cambios de las comunidades bacterianas debido a condiciones medio ambientales (Fakruddin & Mannan, 2013).

**Análisis de Espaciadores Intergénicos Ribosómicos RISA. Análisis de espaciadores Intergénicos Ribosómicos Automáticos ARISA.** RISA amplifica mediante PCR una parte de la región del espacio intergénico que se encuentra en la subunidad de DNA ribosomal (16s y 23s), posterior se desnaturaliza y se separa a través de geles de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización. Esta técnica genera un perfil de comunidades microbianas, observada a través de una tinción, donde cada banda corresponde con al menos un organismo de la comunidad microbiana original. La versión automatizada ARISA, usa un oligonucleótido marcado con fluorescente y los fragmentos de los espaciadores intergénicos son detectados automáticamente. Esta técnica es útil para estimar la diversidad y la riqueza microbiana (Fakruddin & Mannan, 2013; Fisher & Triplett, 1999).

**DNA Polimórfico Amplificado al Azar RAPD.** Esta técnica consiste en la amplificación por PCR con oligonucleótidos cortos y baja temperatura de unión (35°C). Esta técnica utiliza geles de poliacrilamida o agarosa dependiendo de la complejidad genética de las comunidades microbianas. La desventaja del uso es la falta de reproducibilidad y la identificación filogenética de las comunidades microbianas (Pascual Valero *et al.*, 2015).

**Polimorfismo de Conformación de Cadena Única o Monocatenario SSCP.** Los fragmentos de DNA de una sola cadena son separados con la misma longitud pero diferente secuencia de nucleótidos. Los productos de PCR son separados a través del gel de poliacrilamida, sin necesidad de desnaturalización (Fakruddin & Mannan, 2013; Lee *et al.*, 1996).

**Hibridación Fluorescente *in situ* FISH.** La técnica utilizada para detectar secuencias de DNA en células o tejidos preservados a través del uso de sondas marcadas con un fluorocromo, el cual es dirigido hacia un lugar

específico del cromosoma, emitiendo fluorescencia permitiendo la observación en el microscopio. Esta técnica se fundamenta en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí, es decir, la existencia de determinada secuencia de DNA o RNA que resulta complementaria con otras secuencias a través de puentes de hidrogeno formado entre las bases de adenina- timina o uracilo y citocina y guanina (Martínez & Otero, s. f.).

**Re asociación de DNA.** Esta técnica es útil para realizar comparaciones entre dos comunidades. El DNA se extrae y se purifica y se desnaturaliza. Se monitorea la cinética de re asociación del DNA monocatenario desnaturalizado con secuencias homologas, lo que refleja el tamaño del genoma o la complejidad del DNA. Cuando mayor es el grado de similitud entre dos comunidades o mayor homología de secuencias de una sola comunidad, mas rápido es el proceso de reagrupación (Dorigo *et al.*, 2005; Fakruddin & Mannan, 2013).

La primera aproximación a la secuenciación masiva en paralelo está basada en la pirosecuenciación del DNA. Esta técnica no es fluorescente mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido; producen una imagen que se analizan para proporcionar flujo gramas que, una vez interpretados por el ordenador, devuelven las secuencias de nucleótidos (Moreno, 2010).

**La segunda tecnología es desarrollada por la compañía SOLiD (por sus siglas en ingles Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection).** Esta tecnología secuencia por ligación de octámeros marcados de secuencia conocida a la cadena de DNA, con la posterior detección de la señal fluorescente emitida tras cada ligación (Moreno, 2010).

**Illumina.** Esta tecnología utiliza nucleótidos terminadores marcados con moléculas fluorescentes al igual que en la secuenciación de Sanger. Esta tecnología ofrece mayor rendimiento, produciendo lecturas hasta 300 pb y con un menor costo por base (Roumpeka *et al.*, 2017).

**Ion- Torrent.** Esta tecnología es una secuenciación semiconductor por corriente de iones. Esta tecnología no depende de nucleótidos, ni fluorescencia. Este es un tipo de secuenciación por síntesis, funciona a partir de la polimerización de una cadena complementaria de DNA (con dNTPs) y un “chip” semiconductor capaz de detectar iones de H<sup>+</sup> (*Ion Torrent Sequencing*, s. f.).

**HelicosBioSciences.** Esta es la primera secuenciación de tercera generación. Se basa en la secuenciación a tiempo real de miles de millones de pequeñas moléculas únicas de DNA adheridas a la superficie sólida. Permite generar fragmentos entre 25-45 pb (Moreno, 2010).

**PacificBiosciences (PacBio).** Plataforma de secuenciación de lecturas largas (50,000 pb) que utiliza tecnología de una sola molécula en tiempo real. Presenta una alta tasa de error de (~15%) (Roumpeka *et al.*, 2017).

## 2.5 EFECTO DE LA SOYA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL

Alimentos basados en soya aportan nutrientes como fuente de energía para favorecer el crecimiento de algunas bacterias intestinales. La soya puede ocasionar algunos cambios en la morfología del intestino y en la microbiota intestinal (Fernandez-Raudales *et al.*, 2012). La leche de soya disminuye significativamente *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y aumentando *Faecali bacterium* y *Clostridium*. Los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* se pueden relacionar con algunos beneficios para la salud, como disminuir el riesgo de obesidad y reducir la inflamación del colon y otros síntomas (Fernandez-Raudales *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016).

En modelos de ratas Wistar administradas con leche de soya se observa un aumento en los *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter*, pero disminuye *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium* (Huang *et al.*, 2016). Además, la proteína de la soya disminuyó significativamente las concentraciones de colesterol total en modelo de Hámster dorado o sirio. Estos resultados sugieren que la actividad hipolipemiante de la soya puede asociarse a la microbiota intestinal (Butteiger *et al.*, 2015).

En cerdos se ha demostrado que con dietas de 0.1-0.2% de soya incrementa la permeabilidad epitelial, ocasionando daños en el intestino. A diferencia con dieta de 0.05% no presenta efectos significativos (Zhao *et al.*, 2011). En cerdos alimentados con harina de soya a las 3 semanas de edad, se demostró que disminuyó el peso corporal, además, de ocasionar daño en las vellosidades y aumentó la concentración de la Ig G en suero. Mientras que en cerdos con 8 semanas de edad, no hubo cambios significativos. Los cerdos en edad avanzada son capaces de digerir las macromoléculas de la soya (Li *et al.*, 2018). En cambio, en ratas con dietas entre 1.2mg/mL– 2.0mg/mL de proteína de soya afecta la morfología intestinal y ocasiona inflamación. Además, causa daño en el crecimiento de las ratas (Pan *et al.*, 2018).. Sin embargo, se ha reportado que la harina de soya puede ser utilizada en la alimentación de salmones, sin ocasionar daños en el intestino o en el crecimiento (Sahlmann *et al.*, 2015).

### III. JUSTIFICACIÓN

La microbiota intestinal realiza funciones esenciales dentro del huésped, con el fin de mantener la homeostasis. La cual se ve afectada por factores como la edad, la alimentación y la exposición a estrés. La alimentación es un factor importante dentro del desarrollo del huésped, ya que depende de ello para el desarrollo del crecimiento, o la activación del sistema inmune.

La pasta de soya (*Glycine max*) es un alimento que presenta alta calidad de proteína y puede ser digerible tanto para humanos como para animales. Sin embargo, ese sustrato contiene factores anti nutricios que ocasionan daño en la morfología del intestino. Existe poca información que demuestra el cambio de la diversidad bacteriana en ratas alimentadas con pasta de soya. Por lo que resulta importante estudiar si la inclusión de la soya puede ocasionar algún daño en la microbiota intestinal y evaluar si puede causar algún problema sistémico.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La administración de la pasta de soya como suplemento en ratas de la especie Sprague Dawley modifica el perfil de la microbiota intestinal, así como un efecto a nivel sistémico.

#### **V. OBJETIVOS**

##### 5.1 Objetivo general

Determinar el perfil de la microbiota intestinal en ratas suplementadas con un extracto de pasta de soya, así como su efecto sistémico.

1. Evaluar el efecto de la administración de pasta de soya sobre el peso de los órganos de las ratas.
2. Evaluar el efecto de la administración de la pasta de soya a nivel sistémico.
3. Evaluar el efecto de la suplementación de la pasta de soya sobre los perfiles bacterianos mediante la técnica RISA-PCR en ratas.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño de estudio y aprobación ética

El diseño de estudio fue longitudinal, experimental, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ y registrado con el número 44FCN2015 (Apéndice 1).

### 6.2 Animales experimentales e instalaciones

Como animales experimentales se utilizaron 24 ratas Sprague Dawley macho de 4 semanas de edad, las cuales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM), Juriquilla, los animales se mantuvieron durante todo el experimento en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

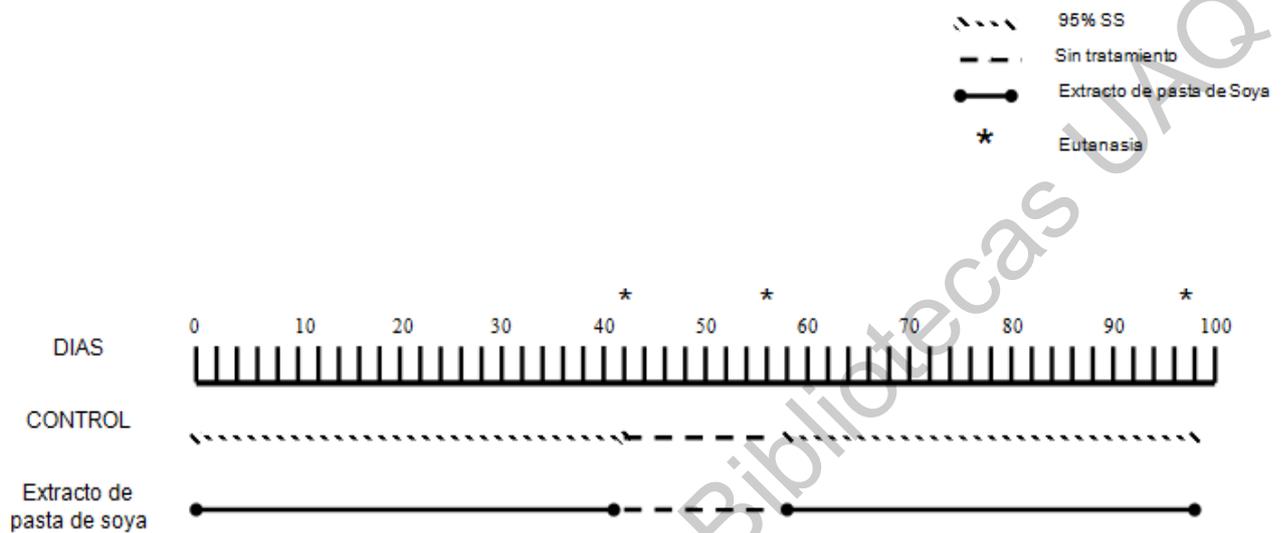
Las ratas se colocaron en jaulas individuales y se mantuvieron con una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en ciclos de 12 horas luz por 12 horas de oscuridad y con una humedad relativa entre 45% y 60% (NOM-062-ZOO, 1999). Antes de iniciar el experimento se les dio una semana de aclimatación.

### 6.3 Tratamientos

Los animales fueron aleatorizados por peso en 2 grupos (grupo control y grupo tratado) con diferente periodo de tiempo de administración. Los animales fueron alimentados con dieta comercial (RodentLabChow 5001) y agua *ad libitum*. El grupo tratado recibió 0.17g/kg de pasta de soya en solución salina. El extracto de la pasta de soya fue obtenida por (Medina Cruz, 2018). El grupo control sólo recibió solución salina.

Para los dos grupos la administración fue mediante cánula intragástrica cada tercer día por 98 días (14 semanas) con un periodo de descanso de 2

semanas, el cual inicio a los 56 días. El tratamiento fue retomado posterior al periodo de descanso hasta los 98 días (Figura 2). Al término, las ratas fueron eutanasiadas por decapitación a los 42, 56 y 98 días (n=8 por grupo) como lo describe la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.



**Figura 2. Diseño experimental.** Después de una semana de aclimatación las ratas fueron tratadas por 98 días (14 semanas) con (0.17g/Kg del extracto de pasta de soya para ratas tratadas y solución salina para las ratas control). La eutanasia se llevó a cabo durante los días 42, 56, y 98 días.

#### 6.4 Muestreo de materia fecal

Las muestras de heces fueron colectadas cada semana en tubos de 1.5 mL libres de nucleasas y RNAsas las cuales se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Después de la eutanasia, las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos BD vacutainer ® con EDTA y sin anticoagulante, posteriormente se determinaron marcadores hematológicos en el analizador Sysmex modelo KX-21N. Por último, las medidas y el peso de los órganos se llevó a cabo y se fijaron en formaldehído al 10% para posterior análisis.

## 6.5 Análisis de las muestras de heces

La extracción de DNA de las muestras fecales se realizó usando un kit comercial de extracción (MoBio, Power Soil Isolation Kit) con columnas de sílice y micro perlas, siguiendo las condiciones del fabricante.

Se peso 0.250g de muestra, cada tubo contenía materia fecal de dos ratas (pool).

## 6.6 Pureza y concentración de DNA

La concentración y pureza del DNA se hizo mediante espectrofotometría (NANODROP 2000c) ThermoScientific™ (Apéndice 2). La visualización de los productos de la PCR se realizó en geles de agarosa al 3% y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal a un voltaje constante de 70V durante 90 min. En cada pozo se colocó 5µl de cada muestra con 2µl de buffer de carga (Red gel, marca Biotium). La visualización de los geles se llevó a cabo con la luz UV mediante un foto documentador (Gel doc XR System, BioRad, Singapore).

## 6.7 Determinación del perfil bacteriano

La detección del perfil de diversidad microbiana se realizó mediante la técnica molecular de RISA-PCR (Ribosomal Inter Space Analysis) descrita por Cardinale *et al.*, (2004). Para la amplificación de PCR, cada reacción fue de 10µl, la cual estaba compuesta por 4.38µl de agua libre de nucleasas, 1µl de Buffer (10X), 0.8µl de dNTPs, 0.06µl de enzima Taq (TAKARA), 0.4µl de oligonucleótidos ITS F (5' GT C GTA ACA AGG TAG CCG TA 3'), ITS R (5' GCC AAG GCA TCC ACC 3'). 1µl de BSA (Albumina de Suero Bovino), y 2µl de DNA previamente extraído de cada muestra (Apéndice 3). El ciclo de amplificación se realizó en un termociclador punto final (Bio Rad c1000, Singapore) La desnaturalización inicial fue de 94°C por 3 min, con 35 ciclos de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, alineados de 55°C por 1 min y extensión de 72°C por 2 min, la extensión final fue a 72°C durante 7 min.

## **6.8 Árbol filogénico**

El análisis para los cambios de microbiota se llevó a cabo mediante el programa QuantityOne, en el cual se obtuvo un perfil de bandas identificando como banda positiva ( $\geq 555-818$ ) de pixeles (Apéndice 4), obteniendo así una matriz binaria (Apéndice 5). La obtención del dendograma (UPGMA) se hizo mediante el software Phylip versión 3.6 utilizando la matriz binaria anteriormente obtenida.

## **6.9 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el software STATA versión 12. Para variables independientes se realizó la prueba de t-Student's. El peso y la longitud de los órganos se ajustaron con el peso corporal individualmente y normalizaron con respecto a la media del grupo control. Las variables se consideraron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Peso y longitud de órganos

El peso y longitud de órganos de ratas administradas con un extracto de pasta de soya se muestra en el cuadro 2. La pasta de soya disminuyó el peso del intestino delgado y el peso del intestino grueso ( $p < 0.05$ ) a los 42 días y a los 98 días respectivamente (figura 3a, 3b); así como la longitud del intestino delgado ( $p < 0.05$ ) a los 98 días. Sin embargo, no existió un cambio significativo en la longitud del intestino grueso ( $p > 0.05$ ).

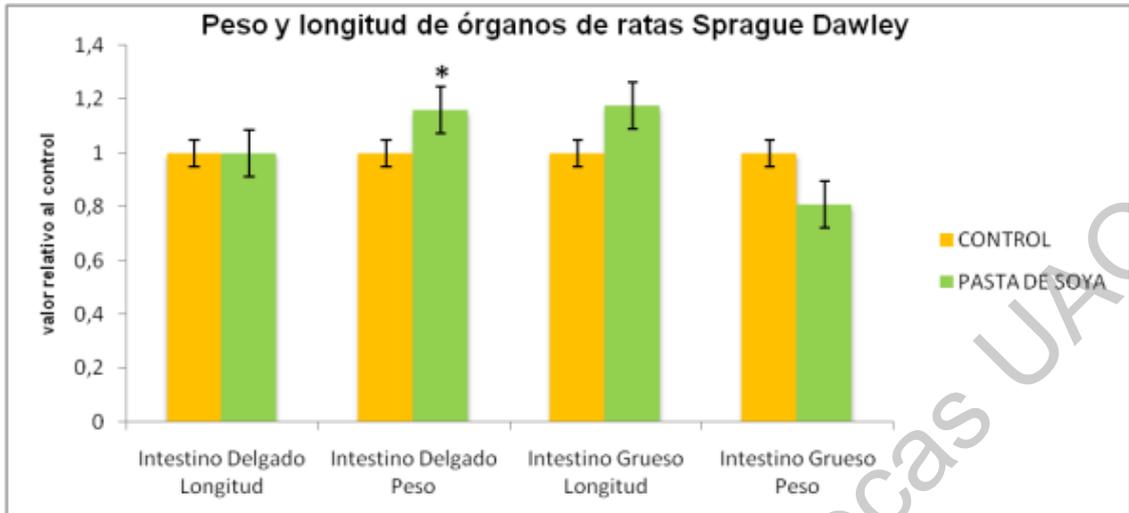
**Cuadro 2. Peso de órganos después de la administración de un extracto de pasta de soya.**

	PESO DE ÓRGANOS	CONTROL	TRATAMIENTO PASTA DE SOYA	VALOR P
42 Días	Hígado	10 ± 0,14	9,88 ± 0,73	0,91
	Bazo	0,75 ± 0,35	0,8 ± 0,09	0,72
	Riñones	2,7 ± 0,14	2,74 ± 0,22	0,58
	Páncreas	2,05 ± 0,49	1,82 ± 0,31	0,41
	Intestino Delgado longitud	126,55 ± 8,56	119,5 ± 15,40	0,72
	Intestino Delgado peso	9,55 ± 0,49	10,52 ± 0,57	<b>0,04*</b>
	Intestino Grueso longitud	17,55 ± 1,63	19,46 ± 3,28	0,39
	Intestino Grueso peso	3,9 ± 0,85	2,96 ± 0,81	0,24
	Corazón	1,3 ± 0	1,3 ± 0,17	1
	Timo	0,7 ± 0,14	0,54 ± 0,21	0,39
	Estómago	2,45 ± 0,21	2,52 ± 0,30	0,59
	Placas de Peyer	16 ± 0	17,4 ± 3,45	0,58
	56 Días	Hígado	11,51 ± 0,33	12,03 ± 0,89
Bazo		0,80 ± 0,01	1,0 ± 0,20	0,24
Riñones		2,92 ± 0,06	3,19 ± 0,25	0,22
Páncreas		1,57 ± 0,70	1,82 ± 0,25	0,45

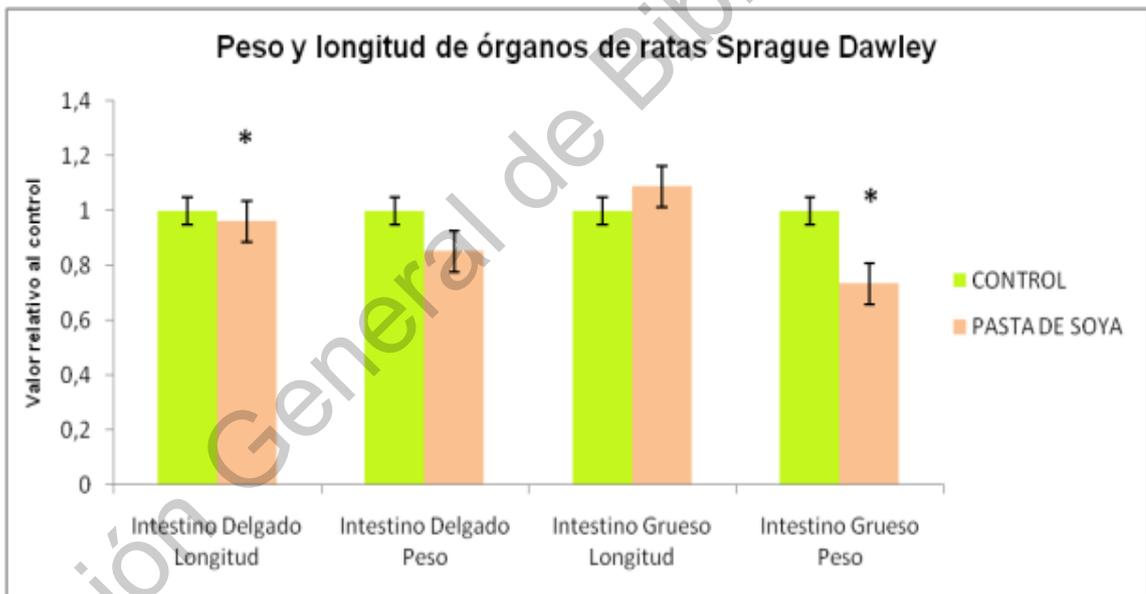
	Intestino Delgado longitud	112,75 ± 9,55	113,7 ± 5,12	0,9
	Intestino Delgado peso	13,09 ± 1,47	12,08 ± 1,88	0,59
	Intestino Grueso longitud	16,3 ± 2,55	18,1 ± 1,55	0,26
	Intestino Grueso peso	3,23 ± 0,86	3,44 ± 0,84	0,58
	Corazón	1,18 ± 0,14	1,38 ± 0,12	0,14
	Timo	0,56 ± 0,13	0,62 ± 0,13	0,49
	Estómago	3,90 ± 0,23	3,67 ± 0,81	0,71
	Placas de Peyer	19,5 ± 2,12	17,4 ± 1,03	0,08
<b>98 Días</b>	Hígado	14 ± 0,99	13,52 ± 3,05	0,84
	Bazo	0,9 ± 0	0,73 ± 0,17	0,35
	Riñones	3,6 ± 0,14	2,92 ± 0,38	0,06
	Páncreas	2 ± 0,28	1,99 ± 0,37	0,87
	Intestino Delgado longitud	116,5 ± 13,44	98,2 ± 5,64	<b>0,03*</b>
	Intestino Delgado peso	14,95 ± 0,35	11,56 ± 2,12	0,08
	Intestino Grueso longitud	16,5 ± 2,12	15,56 ± 1,63	0,72
	Intestino Grueso peso	5,2 ± 0,42	3,35 ± 0,68	<b>0,01*</b>
	Corazón	1,16 ± 0	1,20 ± 0,46	0,2
	Timo	0,45 ± 0,07	0,37 ± 0,07	0,36
	Estómago	6,3 ± 1,27	4,28 ± 1,51	0,13
	Placas de Peyer	21 ± 5,66	19,6 ± 4,55	0,68

\* Asteriscos representan la diferencia significativa entre valores (T-student's  $p < 0.05$ ).

a)



b)



**Figura 3. Peso y longitud después de la administración con un extracto de pasta de soya (0.17g/Kg).** a) peso y longitud de los intestinos a los 42 días de tratamiento. b) peso y longitud de los intestinos, después de dos semanas de recuperación (98 días). El peso y la longitud de los órganos se ajustaron con el peso corporal individualmente y se normalizaron con respecto a la media del grupo control. Los asteriscos representan una diferencia significativa entre los valores ( $p < 0.05$ ).

## 7.2 Marcadores hematológicos

Respecto a los marcadores hematológicos no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en VCM. VCM, volumen corpuscular medio; MCH, hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media (cuadro 3).

**Cuadro 3. Marcadores hematológicos después del tratamiento con un extracto de pasta de soya.**

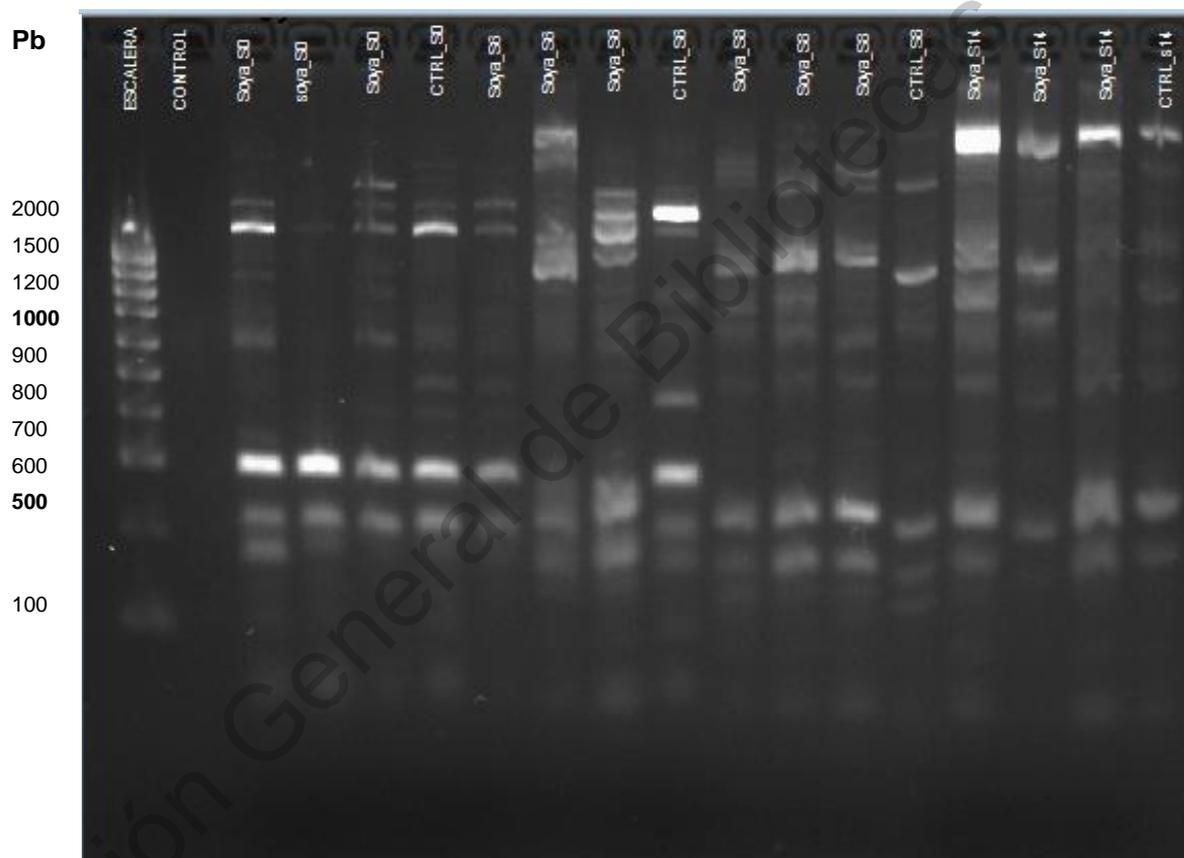
Marcadores bioquímicos	Control	6 semanas	8 semanas	14 semanas
Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,7 $\pm$ 1,5	8,38 $\pm$ 1,65	8,6 $\pm$ 2,83	9,76 $\pm$ 2,55
Eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	9,95 $\pm$ 0,3	8,56 $\pm$ 0,48	8,11 $\pm$ 0,34	8,42 $\pm$ 0,31
Hemoglobina (g/dL)	19,05 $\pm$ 0,5	17,98 $\pm$ 0,73	16,41 $\pm$ 0,25	16,8 $\pm$ 0,43
Hematocrito (%)	52,5 $\pm$ 0,75	46,81 $\pm$ 1,52	43,73 $\pm$ 1,17	44,58 $\pm$ 1,24
VCM (fL)	52,9 $\pm$ 1	54,88 $\pm$ 1,65	53,96 $\pm$ 2,02	52,98 $\pm$ 1,69
MCH (pg)	19,25 $\pm$ 0,1	21,03 $\pm$ 0,60	20,26 $\pm$ 0,66	19,98 $\pm$ 0,73
MCHC (g/dL)	36,4 $\pm$ 0,45	38,4 $\pm$ 0,68	37,56 $\pm$ 0,84	37,7 $\pm$ 0,69
Plaquetas ( $\mu\text{L} \times 10^3$ )	662 $\pm$ 63,5	830,83 $\pm$ 54,05	755,66 $\pm$ 195,6 7	944,33 $\pm$ 88,24
Linfocitos (%)	78,8 $\pm$ 1,05	83,5 $\pm$ 5,00	80,45 $\pm$ 4,60	84,43 $\pm$ 2,35

## 7.3 Perfil de la microbiota

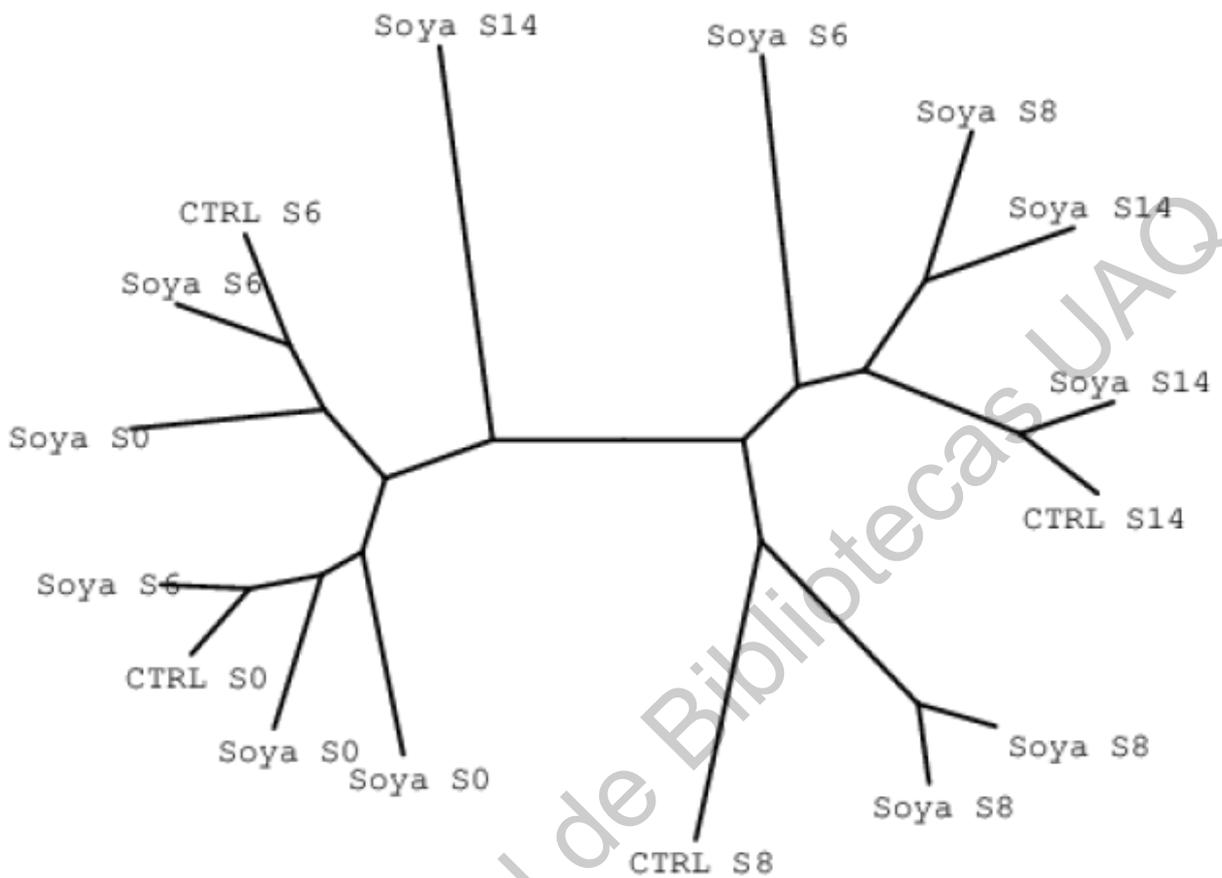
El número de bandas del perfil bacteriano se muestra en el cuadro 4. En el cual se muestra a mayor cantidad de bandas en las ratas suplementadas con el extracto de pasta de soya con respecto al control, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). No obstante, el principal cambio en el perfil de la microbiota bacteriana se observa con la edad en ambos tratamientos y la pasta de soya solo ocasiono un ligero cambio en la diversidad microbiana en la semana 8 (figura 4).

**Cuadro 4. Reporte total de bandas del perfil bacteriano por semanas de tratamiento con un extracto de pasta de soya (QuantityOne).**

	control	Extracto de Pasta de soya	Valor p
<b>Semana 0</b>	12	25	0,21
<b>Semana 6</b>	10	33	0,80
<b>Semana 8</b>	10	35	0,59
<b>Semana 14</b>	10	31	0,91



**Figura 4. Perfil electroforético de DNA bacteriano de los pools de ratas Sprague Dawley por 14 semanas. Tratamiento pasta de soya (0.17g/Kg) por 14 semanas administrada cada tercer día.**



**Figura 5. Dendrograma (UPGMA) de los perfiles de bandas bacterianas de los pools de ratas, por 14 semanas.** Extracto de pasta de soya (0.17g/Kg) por 14 semanas cada tercer día con un descanso intermedio de 14 días (2 semanas). Los números seguidos del nombre indican la semana evaluada con base al tratamiento con un extracto de pasta de soya (PHYLIP 3.6).

## VIII. DISCUSIÓN

La suplementación de la pasta de soya aumentó el peso de los intestinos de las ratas. No obstante Medina- Cruz (2018) reportó que la harina o pasta de soya no ocasiona ningún efecto en el peso y talla de las ratas Sprague Dawley. De la misma manera Souza *et al.*, (2007) reportaron que no existen cambios significativos en órganos digestivos en lechones alimentados con pasta de soya. El aumento de peso podría ser un efecto compensatorio de la interacción entre las lectinas y las vellosidades intestinales, con el fin de aumentar la superficie de la absorción de nutrientes (Alatorre-Cruz *et al.*, 2018). Sin embargo, no se revisó el efecto de la pasta de soya sobre las vellosidades.

Respecto a la microbiota los cambios en el perfil fueron dependientes de la edad. Vemuri *et al.*, (2018) a través de un estudio de secuenciación utilizando la plataforma Illumina reportaron que la actividad proteolítica aumentaba en personas con edad avanzada, y disminuía la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La disminución de los AGCC se relaciona con la menor ingesta de fibra y la administración de algunos antibióticos durante la vejez. La disminución de AGCC puede favorecer a las poblaciones intestinales de bacterias capaces de degradar la mucina, aumentando así la posibilidad de entrar patógenos a la mucosa intestinal (Nagpal *et al.*, 2018).

Respecto a la influencia de lectinas de la pasta de soya, únicamente se observó un ligero cambio en la diversidad microbiana en la semana 8, esto puede deberse a que tuvieron dos semanas de descanso, lo que no permitió ver el cambio completo cuando se suplementa durante las catorce semanas. La administración prolongada por vía oral de cualquier compuesto afecta de manera selectiva a la microbiota intestinal y puede favorecer el crecimiento de organismos que lo metabolizan y lo transforman en metabolitos con mayor o menor actividad, lo cual ocasiona efectos benéficos o adversos para el huésped, mediante reacciones predominantes hidrolíticas o reductoras, dado que la mayor parte de la microbiota intestinal es anaerobia estricta (Universidad Cooperativa de Colombia - Sede Santa Marta *et al.*, 2014). Proteínas de la soya como la Glicina y  $\beta$ -conglucina y sus oligosacáridos sirven como fuente de

energía para las bacterias intestinales (Huang *et al.*, 2016). Sin embargo, Zou *et al.*, (2018) reportaron que en ratas no hubo cambios significativos durante tres meses de administración de soya genéticamente modificada. No obstante, Miao *et al.*, (2018) reportaron que la harina de soya afecta significativamente la diversidad en la microbiota intestinal en el pez de cabeza del norte, observando en mayor abundancia bacterias como *Firmicutes* y *Proteobacterias*. Huang *et al.*, (2016) reportaron en ratas Wistar alimentadas con leche de soya se observa un incremento de especies bacterianas como *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* y en disminución se encontraban *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. Zhao *et al.*, (2011) reportaron que en dietas con concentraciones de 0.1 a 0.2% de soya ocasionan daños en el epitelio y aumentan la permeabilidad intestinal en cerdos.

Las técnicas moleculares son una alternativa para poder identificar cambios en los perfiles microbianos. Sin embargo, en nuestro experimento se utilizó RISA-PCR, la cual es una técnica no específica para familias y grupos bacterianos. Esta técnica solo sirve para la identificación de los cambios generales de diversidad y riqueza microbiana (Cardinale *et al.*, 2004; Martin-Laurent *et al.*, 2001). La PCR de Tiempo Real Cuantitativa (qPCR) es utilizada para diversos estudios de microbiota intestinal, ya que es una técnica precisa y sensible para cuantificar ciertas especies bacterianas de muestras intestinales (Xu *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2018). A través, de la tecnología de secuenciación de segunda generación ha permitido secuenciar genomas completos en un periodo relativamente corto. Las plataformas como Ion Torrent e Illumina Mi Seq son capaces de generar lecturas largas, por menos costo y el tiempo de respuesta es más rápido y una tasa menor de error (Indugu *et al.*, 2016).

En esta investigación comprobamos que puede haber un efecto en los cambios de perfiles, sin embargo, para identificar que microorganismos son los que cambian se debe de realizar ya sea qPCR o una secuenciación masiva. Adicionalmente valdría la pena revisar los efectos a un enterocito para revisar si su efecto antinutricio puede ocasionar tantos cambios en la microbiota, como en la morfología de los enterocitos. Por último, durante el experimento se dejó un periodo de descanso, por lo que, sería importante revisar el efecto sin

descanso dejando la propuesta para futuras investigaciones, así como estudios histológicos para observar algún efecto en las vellosidades intestinales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## IX. CONCLUSIÓN

Las lectinas de la soya aumentaron el peso y longitud de los intestinos, en diferentes tiempos de administración.

Los marcadores hematológicos no se modificaron con la suplementación de lectinas de soya.

Los cambios en la diversidad bacteriana fueron dependientes de la edad y solo se observó un ligero cambio en la semana 8 con la suplementación de lectinas de la pasta de soya.

Dirección General de Bibliotecas USAQ

## X. RECOMENDACIONES

De esta investigación se recomienda lo siguiente para futuras investigaciones:

Identificar familias bacterianas a través de técnicas de qPCR, con el fin de determinar los cambios en el perfil de la microbiota ocasionados con pasta de soya.

Realizar estudios histológicos, con el fin de observar si la pasta de soya ocasionó algún daño en las vellosidades intestinales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## XI. REFERENCIAS

- Adlerberth, I. (2008). Factors Influencing the Establishment of the Intestinal Microbiota in Infancy. En D. M. Bier, J. B. German, & B. Lönnerdal (Eds.), *Nestlé Nutrition Workshop Series: Pediatric Program* (Vol. 62, pp. 13-33). KARGER. <https://doi.org/10.1159/000146245>
- Alatorre-Cruz, J. M., Pita-López, W., López-Reyes, R. G., Ferriz-Martínez, R. A., Cervantes-Jiménez, R., de Jesús Guerrero Carrillo, M., Vargas, P. J. A., López-Herrera, G., Rodríguez-Méndez, A. J., Zamora-Arroyo, A., Gutiérrez-Sánchez, H., de Souza, T. R., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2018). Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. *Toxicology Reports*, 5, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.008>
- Angosto, M. C., & Villarejo, A. L. D. (2014). Fisiología del aparato digestivo. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Arroyo, H., & Pamela, S. (2014). Estudio morfométrico del estómago del cobayo (*Cavia porcellus*) lactante. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3713>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180. PubMed. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biology*, 13(8), e1002226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Buitrago, Jul. (s. f.). *Semilla y torta (harina) de soya en alimentación de cerdos*. 31.
- Butteiger, D. N., Hibberd, A. A., McGraw, N. J., Napawan, N., Hall-Porter, J. M., & Krul, E. S. (2015). Soy Protein Compared with Milk Protein in a Western Diet Increases Gut Microbial Diversity and Reduces Serum

- Lipids in Golden Syrian Hamsters. *The Journal of Nutrition*, 146(4), 697-705. <https://doi.org/10.3945/jn.115.224196>
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., & Daffonchio, D. (2004). Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6147-6156. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6147-6156.2004>
- Cereales y granos | Inpho | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. (s. f.). Recuperado 15 de diciembre de 2019, de <http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/>
- Cerqueda-García, D., & Falcón, L. I. (2016). La construcción del nicho y el concepto de holobionte, hacia la reestructuración de un paradigma. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(1), 239-241. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.11.001>
- Chaparro, D. C., Porrilla, Y., & Elizalde, A. de Dios. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 7(1), 45-54.
- Chatterjee, C., Gleddie, S., & Xiao, C.-W. (2018). Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients*, 10(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/nu10091211>
- Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(8), 1221-1238. PubMed. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
- Coppa, G. V., Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Ficcadenti, A., Padella, L., Santoro, L., Soldi, S., Carlucci, A., Bertino, E., & Morelli, L. (2011). Oligosaccharides in 4 Different Milk Groups, Bifidobacteria, and Ruminococcus obeum: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(1), 80-87. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182073103>
- Cruz, P. H., Campos, E. P., Martínez, L. M., Ortiz, B., & Martínez, Y. G. (2005). LAS LECTINAS VEGETALES COMO MODELO DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-CARBOHIDRATO. 7.

- Davis, J. C. C., Lewis, Z. T., Krishnan, S., Bernstein, R. M., Moore, S. E., Prentice, A. M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., & Zivkovic, A. M. (2017). Growth and Morbidity of Gambian Infants are Influenced by Maternal Milk Oligosaccharides and Infant Gut Microbiota. *Scientific Reports*, 7, 40466.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971-11975. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunker, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism*, 13(5), 517-526. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Dorigo, U., Volatier, L., & Humbert, J.-F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 39(11), 2207-2218. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.007>
- Escalante, A. E., Jardón Barbolla, L., Ramírez-Barahona, S., & Eguiarte, L. E. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1249-1264. <https://doi.org/10.7550/rmb.43498>
- Fakruddin, M., & Mannan, K. S. B. (2013). Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 42(1), 19. <https://doi.org/10.4038/cjsbs.v42i1.5896>
- Fernandez-Raudales, D., Hoeflinger, J. L., Bringe, N. A., Cox, S. B., Dowd, S. E., Miller, M. J., & Gonzalez de Mejia, E. (2012). Consumption of different soymilk formulations differentially affects the gut microbiomes of overweight and obese men. *Gut Microbes*, 3(6), 490-500. <https://doi.org/10.4161/gmic.21578>

- Ferrua, M. J., & Singh, R. P. (2010). Modeling the fluid dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. *Journal of Food Science*, 75(7), R151-R162. PubMed. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01748.x>
- Ficara, M., Pietrella, E., Spada, C., Della Casa Muttini, E., Lucaccioni, L., Iughetti, L., & Berardi, A. (2018). Changes of intestinal microbiota in early life. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1506760>
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 65, 7.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., Macfarlane, G. T., Microbiology & Gut Biology Group, & Tayside Tissue & Tumour Bank. (2005). Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 115(4), 565-574. PubMed. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x>
- Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., & Brummer, R.-J. (2007). Review article: The role of butyrate on colonic function: REVIEW: ROLE OF BUTYRATE ON COLONIC FUNCTION. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 104-119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, 32(4), 300-313. PubMed. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17017>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1268-1273. PubMed. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Huang, H., Krishnan, H. B., Pham, Q., Yu, L. L., & Wang, T. T. Y. (2016). Soy and Gut Microbiota: Interaction and Implication for Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(46), 8695-8709. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03725>
- Indugu, N., Bittinger, K., Kumar, S., Vecchiarelli, B., & Pitta, D. (2016). A comparison of rumen microbial profiles in dairy cows as retrieved by 454

- Roche and Ion Torrent (PGM) sequencing platforms. *PeerJ*, 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.1599>
- Ion Torrent Sequencing*. (s. f.). Next Generation Sequencing Wiki. Recuperado 8 de mayo de 2019, de [https://next-generation-sequencing.fandom.com/es/wiki/Ion\\_Torrent\\_Sequencing](https://next-generation-sequencing.fandom.com/es/wiki/Ion_Torrent_Sequencing)
- Jandhyala, S. M. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jha, R., & Berrocoso, J. D. (2015). Review: Dietary fiber utilization and its effects on physiological functions and gut health of swine. *Animal*, 9(9), 1441-1452. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000919>
- Jha, Rajesh, Fouhse, J. M., Tiwari, U. P., Li, L., & Willing, B. P. (2019). Dietary Fiber and Intestinal Health of Monogastric Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00048>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4578-4585. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Lauder, A. P., Roche, A. M., Sherrill-Mix, S., Bailey, A., Laughlin, A. L., Bittinger, K., Leite, R., Elovitz, M. A., Parry, S., & Bushman, F. D. (2016). Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0172-3>
- Lavagnino, N. J., Massarini, A., & Folguera, G. (s. f.). *SIMBIOSIS Y EVOLUCIÓN: UN ANÁLISIS DE LAS IMPLICACIONES EVOLUTIVAS DE LA SIMBIOSIS EN LA OBRA DE LYNN MARGULIS*, 2. 22.
- Lee, D.-H., Zo, Y.-G., & Kim, S.-J. (1996). Nonradioactive Method To Study Genetic Profiles of Natural Bacterial Communities by PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 62, 9.

- Li, D. F., Nelssen, J. L., Reddy, P. G., Blecha, F., & Hancock, J. D. (2018). *TRANSIENT HYPERSENSITIVITY TO SOYBEAN MEAL IN THE EARLY-WEANED PIG*. 10.
- Liao, D.-H., Zhao, J.-B., & Gregersen, H. (2009). Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*, *15*(2), 169-176. PubMed. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.169>
- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*(1), 31-67. <https://doi.org/10.1080/10408399409527649>
- Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, *63*, 7.
- Martínez, R. R., & Otero, G. S. (s. f.). *La identificación de microorganismos*. 15.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(5), 2354-2359. PubMed. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001>
- Medina Cruz, A. M. (2018). *CARACTERIZACION PARCIAL DE UNA PASTA DE SOYA (Glycine max) Y SU EFECTO ANTINUTRICIO EN RATAS SPRAWEDAWLEY*. Universidad Autonoma de Queretaro.
- Miao, S., Zhao, C., Zhu, J., Hu, J., Dong, X., & Sun, L. (2018). Dietary soybean meal affects intestinal homeostasis by altering the microbiota, morphology and inflammatory cytokine gene expression in northern snakehead. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18430-7>
- Micucci, H. A. (s. f.). *Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas*. 20.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrioni, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the

- Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>
- Moreno, R. B. (2010). *Las tres generaciones de la secuenciación*. 3.
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., Henrissat, B., Knight, R., & Gordon, J. I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6032), 970-974. PubMed. <https://doi.org/10.1126/science.1198719>
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging*, 4(4), 267-285. PubMed. <https://doi.org/10.3233/NHA-170030>
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., & Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*, 8(1), 1-16. PubMed. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693. PubMed. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Oki, K., Akiyama, T., Matsuda, K., Gawad, A., Makino, H., Ishikawa, E., Oishi, K., Kushiro, A., & Fujimoto, J. (2018). Long-term colonization exceeding six years from early infancy of *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum* in human gut. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1358-6>
- Pacheco, M. M., Diego, M. A. P., & García, P. M. (2017). Atlas de histología vegetal y animal. *Alambique: Didáctica de las ciencias experimentales*, 90, 76-77.

- Pan, L., Farouk, M., Qin, G., Zhao, Y., & Bao, N. (2018). The Influences of Soybean Agglutinin and Functional Oligosaccharides on the Intestinal Tract of Monogastric Animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 554. <https://doi.org/10.3390/ijms19020554>
- Panda, P. K., Mukhopadhyay, S., Behera, B., Bhol, C. S., Dey, S., Das, D. N., Sinha, N., Bissoyi, A., Pramanik, K., Maiti, T. K., & Bhutia, S. K. (2014). Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. *Life Sciences*, 111(1-2), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.004>
- Pascual Valero, J. A., Moreno Casco, J., Ros Muñoz, M., & Vargas Garcia, M. C. (2015). *De Residuo A Recurso El camino Hacia la Sostenibilidad*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Pereira-da-Silva, G., Caroline Carvalho, F., & Cristina Roque-Barreira, M. (2012). Neutrophil Activation Induced by Plant Lectins: Modulation of Inflammatory Processes. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 11(6), 433-441. <https://doi.org/10.2174/187152812803589985>
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>
- Putignani, L., Del Chierico, F., Petrucca, A., Vernocchi, P., & Dallapiccola, B. (2014). The human gut microbiota: A dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatric Research*, 76, 2.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. PubMed. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Reading, N. C., & Kasper, D. L. (2011). The starting lineup: Key microbial players in intestinal immunity and homeostasis. *Frontiers in microbiology*, 2, 148-148. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00148>

- Reynoso-Camacho, R., González de Mejía, E., & Loarca-Piña, G. (2003). Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 21-27. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00215-6)
- Röhe, I., Göbel, T. W., Goodarzi Boroojeni, F., & Zentek, J. (2017). Effect of feeding soybean meal and differently processed peas on the gut mucosal immune system of broilers. *Poultry Science*, 96(7), 2064-2073. <https://doi.org/10.3382/ps/pew491>
- Roumpeka, D. D., Wallace, R. J., Escalettes, F., Fotheringham, I., & Watson, M. (2017). A Review of Bioinformatics Tools for Bio-Prospecting from Metagenomic Sequence Data. *Frontiers in genetics*, 8, 23-23. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00023>
- Sahlmann, C., Gu, J., Kortner, T. M., Lein, I., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2015). Ontogeny of the Digestive System of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and Effects of Soybean Meal from Start-Feeding. *PLOS ONE*, 10(4), e0124179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124179>
- Samuel, B. S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F. E., Backhed, F., Manchester, J. K., Hammer, R. E., Williams, S. C., Crowley, J., Yanagisawa, M., & Gordon, J. I. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16767-16772. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808567105>
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>
- Souza, T. C. R., Aguilera, M. A. B., Aguilera, A. B., & Mariscal, G. L. (2007). *Morfología del tracto digestivo de lechones alimentados con dietas con aislado o concentrado de proteínas de soya*. 15, 7.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics—A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Torres y Torres, N., & Tovar-Palacio, A. R. (2009). La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. *Salud*

*Pública de México*, 51(3), 246-254. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000300016>

- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Turnbaugh, P. J., & Stintzi, A. (2011). Human health and disease in a microbial world. *Frontiers in microbiology*, 2, 190-190. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00190>
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., Gueimonde, M., Margolles, A., De Bellis, G., O'Toole, P. W., van Sinderen, D., Marchesi, J. R., & Ventura, M. (2012). Diversity of Bifidobacteria within the Infant Gut Microbiota. *PLOS ONE*, 7(5), e36957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036957>
- Tuśnio, A., Taciak, M., Barszcz, M., Świąch, E., Bachanek, I., & Skomiał, J. (2017). Effect of Replacing Soybean Meal by Raw or Extruded Pea Seeds on Growth Performance and Selected Physiological Parameters of the Ileum and Distal Colon of Pigs. *PLOS ONE*, 12(1), e0169467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169467>
- Universidad Cooperativa de Colombia - Sede Santa Marta, Rossi, C., Rodríguez, M., Universidad Cooperativa de Colombia - Sede Santa Marta, Iglesias, J., Universidad Libre, Lizarazu, I., & Universidad Libre. (2014). Association between bacterial growth in the intestinal flora, and blood pressure of hypertensive elderly men after five weeks of consumption of soja (Glicine máx). *Salud Uninorte*, 30(3), 347-360. <https://doi.org/10.14482/sun.30.3.5873>
- Van Holle, S., & Van Damme, E. (2015). Distribution and Evolution of the Lectin Family in Soybean (*Glycine max*). *Molecules*, 20(2), 2868-2891. <https://doi.org/10.3390/molecules20022868>
- Vemuri, R., Gundamaraju, R., Shastri, M. D., Shukla, S. D., Kalpurath, K., Ball, M., Tristram, S., Shankar, E. M., Ahuja, K., & Eri, R. (2018). Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4178607>

- Wells, J. M., Rossi, O., Meijerink, M., & van Baarlen, P. (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1(Suppl 1)*, 4607-4614. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000092107>
- Whittaker, R. H., Levin, S. A., & work(s):, R. B. R. R. (1973). Niche, Habitat, and Ecotope. *The American Naturalist*, *107(955)*, 321-338.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, N.Y.)*, *334(6052)*, 105-108. PubMed. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K., Valasek, M. A., Motoike, T., Kedzierski, R. M., & Yanagisawa, M. (2004). Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101(4)*, 1045-1050. <https://doi.org/10.1073/pnas.2637002100>
- Xu, W., Li, L., Lu, J., Luo, Y., Shang, Y., & Huang, K. (2011). Analysis of Caecal Microbiota in Rats Fed with Genetically Modified Rice by Real-Time Quantitative PCR. *Journal of Food Science*, *76(1)*, M88-M93. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01967.x>
- Yang, Z., & Liao, S. F. (2019). Physiological Effects of Dietary Amino Acids on Gut Health and Functions of Swine. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00169>
- Zhang, T., Yang, Y., Liang, Y., Jiao, X., & Zhao, C. (2018). Beneficial Effect of Intestinal Fermentation of Natural Polysaccharides. *Nutrients*, *10(8)*, 1055. PubMed. <https://doi.org/10.3390/nu10081055>
- Zhao, Y., Qin, G., Sun, Z., Che, D., Bao, N., & Zhang, X. (2011). Effects of Soybean Agglutinin on Intestinal Barrier Permeability and Tight Junction Protein Expression in Weaned Piglets. *International Journal of Molecular Sciences*, *12(12)*, 8502-8512. <https://doi.org/10.3390/ijms12128502>
- Zou, S., Lu, J., Luo, Y., Qi, X., Delaney, B., Xu, W., Huang, K., & He, X. (2018). The food safety of DP-356043 soybeans on SD rats reflected by

physiological variables and fecal microbiota during a 90-day feeding study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 97, 144–151.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## XI. APÉNDICE

### Apéndice 1. Carta del comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Ciencias Naturales  
Comité de Bioética  
Querétaro, Qro., 30 Mayo 2016

AARON ZAMORA ARROYO  
MAESTRIA EN NUTRICIÓN HUMANA  
PRESENTE

Estimado: AARON ZAMORA ARROYO

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de investigación del cual usted es responsable:

Título	Resolución
Efecto de una fracción concentrada de lectinas de frijol Tepal ( <i>Phaseolus acutifolius</i> ) en la microbiota intestinal en un modelo in vivo" (59FCN2016).	Aprobado

Sin más por el momento quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente

*m. m. m.*  
Dra. María Concepción Méndez Gómez Humarán  
Comité de Bioética  
Facultad de Ciencias Naturales

COPIA ORIGINAL  
AARON ZAMORA ARROYO  
*[Signature]*

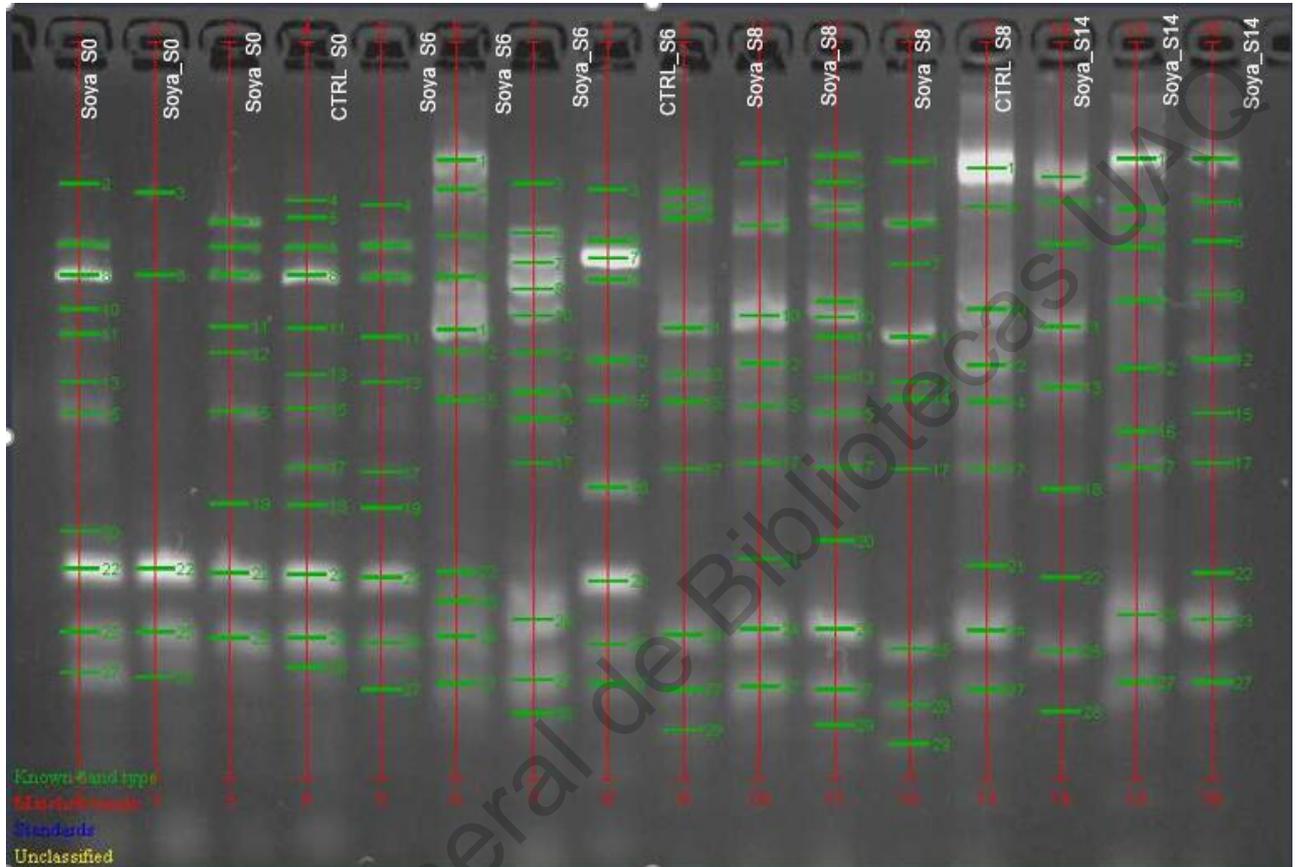
**Apéndice 2. Análisis de pureza e integridad de DNA en NANODROP 2000c**

<b>Muestra</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>Concentración (ng/ mL)</b>
<b>Soya_S0</b>	1.78	0.36	6.2ng/ mL
<b>Soya_S0</b>	1.47	0.33	12.5ng/ mL
<b>Soya_S0</b>	1.48	0.39	28.3ng/ mL
<b>Control_S0</b>	1.88	0.80	18.7ng/ mL
<b>Soya_S6</b>	1.87	1.21	35.7ng/ mL
<b>Soya_S6</b>	1.87	1.21	35.7ng/ mL
<b>Soya_S6</b>	1.77	0.52	19.2ng/ mL
<b>Control_S6</b>	1.75	0.52	13.3ng/ mL
<b>Soya_S8</b>	1.89	1.98	61.6ng/ mL
<b>Soya_S8</b>	1.87	1.91	58.3ng/ mL
<b>Soya_S8</b>	1.91	1.45	39.2ng/ mL
<b>Control_S8</b>	1.82	1.55	86.9ng/ mL
<b>Soya_S14</b>	1.86	2.22	131.5 ng/ mL
<b>Soya_S14</b>	1.87	2.00	64.3 ng/ mL
<b>Soya_S14</b>	1.83	1.95	157.3 ng/ mL
<b>Control_S14</b>	1.86	2.19	323.8 ng/ mL

### Apéndice 3. Preparación de muestras para PCR

<b>Muestra</b>	<b>C1 (ng/μL)</b>	<b>C2 (ng/μL)</b>	<b>V2 (μL)</b>	<b>V1 (μL)</b>	<b>Agua destilada</b>
<b>Soya_S0</b>	6.2	5	10	8.06	1.94
<b>Soya_S0</b>	12.5	5	10	4	6
<b>Soya_S0</b>	28.3	5	20	3.53	16.47
<b>Control_S0</b>	18.7	5	10	2.67	7.33
<b>Soya_S6</b>	34.3	5	20	2.91	17.08
<b>Soya_S6</b>	35.7	5	20	2.80	17.20
<b>Soya_S6</b>	19.2	5	10	2.60	7.40
<b>Control_S6</b>	13.3	5	10	3.75	6.24
<b>Soya_S8</b>	61.6	5	20	1.62	18.37
<b>Soya_S8</b>	58.3	5	20	1.71	18.29
<b>Soya_S8</b>	39.2	5	20	2.55	17.45
<b>Control_S8</b>	86.9	5	20	1.15	18.85
<b>Soya_S14</b>	131.5	5	20	0.76	19.24
<b>Soya_S14</b>	64.3	5	20	1.55	18.44
<b>Soya_S14</b>	157.3	5	20	0.63	19.36
<b>Control_S14</b>	323.8	5	20	0.31	19.70

**Apéndice 4. Perfil electroforético de DNA bacteriano de los pools de ratas Sprague Dawley por semana identificando como banda positiva ( $\geq 555-818$ ) pixeles.**



**Apéndice 5. Matriz binaria obtenida del programa QuantityOne.**

Soya_S0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0				
Soya_S0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0			
Soya_S0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0			
Control_S0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0			
Soya_S6	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0		
Soya_S6	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0		
Soya_S6	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0		
Control_S6	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
Soya_S8	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	
Soya_S8	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
Soya_S8	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	
Control_S8	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1		
Soya_S14	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
Soya_S14	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Soya_S14	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Control_S14	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0

Dirección General de Bibliotecas UAO