



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Estudio de la diversidad de la microbiota asociada con Enteropatía Epizootica en conejos Nueva Zelanda suplementados con fibra insoluble.

Tesis

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Presenta:

M en SPAS. Xiao-Haitzi Daniel Puón Peláez

Dirigido por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Co-dirigido por:

Dr. Neil Ross McEwan

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez	_____
Presidente	Firma
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito	_____
Secretario	Firma
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales	_____
Vocal	Firma
Dr. Gerardo Mariscal Landín	_____
Suplente	Firma
Dr. Neil Ross McEwan	_____
Suplente	Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha

México



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Doctorado en Ciencias Biológicas

Estudio de la diversidad de la microbiota asociada con Enteropatía Epizootica en conejos Nueva Zelanda suplementados con fibra insoluble.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M en SPAS. Xiao-Haitzi Daniel Puón Peláez

Dirigido por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Co-dirigido por:

Dr. Neil Ross McEwan

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Presidente

Firma

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Secretario

Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Vocal

Firma

Dr. Gerardo Mariscal Landín

Suplente

Firma

Dr. Neil Ross McEwan

Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

01 de Octubre de 2020

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Ciencias Naturales por brindarme financiamiento en forma de proyectos:

FOPER 2017 (Estudio de la inclusión de fibra insoluble sobre fermentación cecal y parámetros productivos en conejos de engorda positivos a Enteropatía Epizoótica).

FOPER 2018 (Estudio de la inclusión de fibra insoluble sobre la microbiota fecal en conejos de engorda positivos a Enteropatía Epizoótica).

Al CONACYT por otorgarme beca de manutención para poder cursar mis estudios de doctorado otorgándome una beca por 4 años (CVU: 550598)

Índice

Agradecimientos	3
Índice de cuadros	7
Índice de figuras	9
Abreviaturas y siglas	11
Resumen	14
Abstract	15
1. Introducción	17
2. Revisión de literatura	18
2.1 Generalidades del conejo	18
2.1.1. Origen y domesticación del conejo	18
2.1.2. Importancia de la cunicultura.....	19
2.1.3. Sistemas de producción del conejo	19
2.1.4. Características nutricionales de la carne de conejo.....	20
2.1.5. Conejo de raza Nueva Zelanda	21
2.2. Microbiología digestiva	22
2.2.1. Generalidades.....	22
2.2.2. Disbiosis vs Eubiosis	25
2.2.3. Influencia del microbioma sobre la nutrición y salud del hospedero.....	26
2.2.4. Diversidad y abundancia microbiana.....	29
2.2.5. Métodos para el estudio de la microbiota gastrointestinal	34
2.3. Sistema digestivo del conejo.....	67
2.3.1. Anatomía e histología del tracto gastro intestinal del conejo.....	67
2.3.2. Fisiología del tracto gastrointestinal	72
2.3.3. Cecotrofía.....	75
2.3.4. Microbiota gastrointestinal del conejo.....	80
2.4. Fibra: carbohidratos estructurales de origen vegetal.....	89
2.4.1. Tipos de carbohidratos de origen vegetal.....	89
2.4.2. Carbohidratos estructurales de origen vegetal en la dieta del conejo.....	91
2.4.3. Importancia de los Carbohidratos estructurales de origen vegetal para la nutrición y salud del conejo.....	93
2.4.4. Estudio y análisis de los carbohidratos estructurales de origen vegetal.....	96
2.5. Enteropatía Epizoótica del Conejo.....	98
2.5.1. Historia.....	98
2.5.2. Signos y lesiones.....	99

2.5.3. Etiología.....	100
2.5.4 Tratamiento.....	102
2.6. Los carbohidratos estructurales de origen vegetal en la dieta del conejo como tratamiento para la Enteropatía Epizoótica del Conejo.....	106
3. Hipótesis.....	108
4. Objetivos.....	109
5. Material y métodos.....	110
5.1. Consideraciones éticas.....	110
5.2. Estudio metataxonómico de la Enteropatía Epizootica del Conejo.....	110
5.2.1. Localización e instalaciones.....	110
5.2.2. Animales experimentales.....	110
5.2.4. Dieta.....	111
5.2.5. Parámetros productivos.....	112
5.2.6. Muestreo.....	112
5.2.7. Análisis de las muestras.....	113
5.2.8. Diseño experimental.....	116
5.3. Influencia de fibra detergente neutro en la salud y la microbiota de conejos con Enteropatía Epizoótica.....	117
5.3.1 Localización e instalaciones.....	117
5.3.2. Animales experimentales.....	117
5.3.3. Dieta.....	119
5.3.4. Parámetros productivos.....	120
5.3.5 Muestreo y análisis de las muestras.....	120
5.3.2 Análisis de las muestras.....	121
5.3.3. Análisis del metabolismo cecal.....	124
5.4. Análisis bioestadísticos.....	125
5.4.1. Diseño experimental.....	126
6. Resultados.....	127
6.1. Estudio metataxonómico de la Enteropatía Epizootica del Conejo.....	127
6.1.1 Lesiones histopatológicas y peso de animales experimentales.....	127
6.1.2 Análisis metataxonómico.....	129
6.1.3 Biomarcadores identificados.....	134
6.2. Influencia de fibra detergente neutro en la salud y la microbiota de conejos con Enteropatía Epizoótica.....	135
6.2.1 Parámetros productivos.....	135

6.2.2 Metabolismo cecal	138
6.2.3 Análisis metataxonómico	141
6.3. Discusión.....	156
7. Conclusión	166
8. Referencias.....	167
9. Anexos	193

Dirección General de Bibliotecas UAG

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición químico proximal y energía promedio con desviación estándar de cortes de carne de conejo

Cuadro 2. Proporción promedio y desviación estándar de varios ácidos grasos y colesterol en cortes de carne de conejo.

Cuadro 3. Características físico-químicas y porcentaje de Firmicutes y Bacteroides en el rumen de la vaca y el ciego del conejo.

Cuadro 4. Clasificación de cultivos por su estado físico

Cuadro 5. Clasificación de medios de cultivo

Cuadro 6. Tipos de microscopía

Cuadro 7. Clasificación de tinciones usadas en la microscopía.

Cuadro 8. Técnicas moleculares usadas en el estudio del microbioma y la microbiota gastro intestinal

Cuadro 9. Comparación entre las sondas más populares en qPCR: SYBR Green y TaqMan

Cuadro 10. Comparación entre las plataformas de segunda generación de secuenciación.

Cuadro 11 Comparación entre las plataformas de tercera generación de secuenciación

Cuadro 12. Comparación de la precisión de los cinco lenguajes más usados en el análisis metataxonómico

Cuadro 13. Valores nutricionales de cecotrofos y heces de conejo

Cuadro 14. Cambio en la concentración de diferentes phyla bacterianos en conejos de diferentes edades en días (d).

Cuadro 15. Necesidades de energía (digestiva y metabolizable)

Cuadro 16. Composición promedio del pellet comercial en su fracción fibrosa ofrecido en la producción cunícola

Cuadro 17. Agentes microbianos asociados a la EEC en estudios moleculares.

Cuadro 18. Ficha técnica de la composición químico proximal de Conejina Turbo

Cuadro 19. Composición química proximal de las dietas.

Cuadro 20. Resumen de secuencias identificadas y comparación de índices de diversidad microbiana en las muestras de contenido cecal

Cuadro 21. Pesos promedios y error estándar de conejos en diferentes etapas del experimento

Cuadro 22. Abundancia promedio con error estándar y porcentaje de los phyla de las muestras cecales de conejos con EEC vs conejos sanos basado en análisis metagenómico

Cuadro 23. Valores de ácidos grasos volátiles, amoníaco y pH para muestras de cecotrofo recolectados.

Cuadro 24. Resumen de secuencias identificadas y comparación de índices de diversidad microbiana en muestras cecales

Cuadro 25. Resumen de secuencias identificadas y comparación de índices de diversidad microbiana en muestras fecales

Cuadro 26. Abundancia promedio con error estándar de los phyla de las muestras cecales basado en análisis metagenómico

Cuadro 27. Abundancia promedio con error estándar de los principales phyla de las muestras fecales basado en el análisis metagenómico

Cuadro 28. Proporción de abundancias (%) de los principales phyla de las muestras cecales y fecales basado en el análisis metagenómico

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de los lagomorfos

Figura 2. Distribución del conejo en el mundo

Figura 3. Esquematación de un holobionte o meta organismo.

Figura 4. Uso de los carbohidratos estructurales de origen vegetal por el microbioma

Figura 5. El tejido linfoide asociado a la mucosa gastro intestinal establece una relación simbiótica perinatal entre la microbiota y el anfitrión en el intestino

Figura 6. Mecanismos de inducción de tolerancia de la mucosa intestinal.

Figura 7. emPCR (a) y PCR de puente (b)

Figura 8. Diagrama de flujo de pasos de metagenómica básica actualmente en práctica

Figura 9. Diagrama del sistema digestivo del conejo

Figura 10. Diagrama del ciego del conejo

Figura 11. Cecotrofos y heces de conejo

Figura 12. Esquema de la formación de acetyl-CoA, acetato, propionato y butirato en anaerobiosis.

Figura 13. Esquema de términos de referencia para los CEOV

Figura 14. Jaula tipo americana, para la engorda de conejos en sistema semi-intensivo.

Figura 15. Pesaje de conejos durante el periodo experimental.

Figura 16. Conejo sospechoso a EEC

Figura 17. Conejo sano

Figura 18. Conejo positivo a EEC

Figura 19. Conejo sano

Figura 20. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales por grupos. Se muestran los phyla más abundantes conejos positivos a EEC vs conejos sanos

Figura 21. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales de conejos positivos a EEC vs conejos sanos

Figura 22. Comparación de la abundancia relativa del perfil microbiano (Orden, Familia y género) Top 30

Figura 23. Biomarcadores reportados por la prueba LEfSe en muestras positivas a EEC

Figura 24. Biomarcadores reportados por la prueba LEfSe en muestras negativas a EEC.

Figura 25. Evolución del peso promedio de conejos por grupo

Figura 26. Ganancia diaria de peso por grupo

Figura 27. Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) por grupo en $\mu\text{mol/g}$

Figura 28. Índices de riqueza y diversidad de cada muestra cecal por grupo

Figura 29. Índices de riqueza y diversidad de cada muestra fecal por grupo

Figura 30. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales por grupos

Figura 31. Familias más abundantes en muestras cecales por grupo y dieta administrada

Figura 32. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras fecales por grupos

Figura 33. Familias más abundantes en muestras fecales por grupo y dieta administrada

Figura 34. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales por grupos

Figura 35. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras fecales por grupos

Abreviaturas y siglas

%: Porcentaje

°C: Grados Celsius

µl: Microlitro

ADH: Ácido docosahexanoico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEP: Ácido eicosapentanoico

AGM: Ácido graso monoinsaturado

AGPI: Ácido graso polinsaturado

AGS: Ácido graso saturado

AGV: Ácidos grasos volátiles

ARISA: Análisis del espacio intergénico ribosomal automatizado

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

CD4: Cúmulo de diferenciación 4

CEOV: Carbohidratos estructurales de origen vegetal

CiTL: Células inductoras de tejido linfoides

CO₂: Dióxido de carbono

DADA2: Algoritmo divisivo eliminador de ruido del amplicon 2

DC: Dendritic cell o células dendríticas

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturante

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

EEC: Enteropatía Epizoótica del Conejo

FC: Fibra cruda

FDA: Fibra detergente ácido

FDI: Fibra dietética insoluble

FDN: Fibra Detergente Neutro

FDN: Fibra detergente neutro

FDS: Fibra dietética soluble

FDT: Fibra dietética total

FISH: Hibridación fluorescente in situ

FoxP3: Forkhead box protein 3

FRET: Fluorescencia de resonancia por transferencia de energía

g: Gramos

GALT: Gut associated lymphoid tissue o tejido linfoide asociado al intestino

G-C: Relación guanina citocina

hrs: Horas

IgA: Inmunoglobulina tipo A

IL: Interleucina

Kb: Kilobases

kJ: Kilo Joules

LAD: Lignina ácido detergente

M: molar

MALDI-TOF MS: Ionización por desorción láser asistida por matriz con “tiempo de vuelo” o análisis de espectrometría de masas

Mb: Megabyte

mV: Milivolts

N: Número de especies

ng: Nanogramo

PAL: Peptide associated of latency o péptidos asociados a la latencia

pb: Pares de bases

PCIA: Pared celular insoluble en agua

PCR: Polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de hidrógeno

PMAMS: Patrones moleculares asociados a microorganismos

PPi: Pirofosfato

qPCR: quantity Polymerase chain reaction o reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa

RISA: Análisis del espacio intergénico ribosomal

S: Total de especies

SEM: Microscopio electrónico de barrido

STM: Microscopio electrónico de barrido con efecto de tunel

TEM: Microscopio electrónico de transmisión de electrones

TGF- β : Transformer growth factor beta o Factor de crecimiento transformante beta

Th: Linfocito T helper

T_{reg}: Linfocito T regulador

TRFLP: Restricción terminal de la longitud del fragmento polimórfico

UFC: Unidades formadoras de colonia

Resumen

La enteropatía epizoótica del conejo (EEC) afecta gazapos de entre 3 y 7 semanas de vida, provocando diarrea con presencia de moco traslúcido, distensión abdominal y muerte. En México, representa el 32% de los padecimientos digestivos en producciones cunícolas. La etiología exacta de la enfermedad no está completamente descrita y como única alternativa para su control se utilizan los antibióticos. El presente trabajo tuvo como finalidad identificar los microorganismos relacionados con la enfermedad y evaluar la inclusión de fibra detergente neutro (31 y 36%, FDN) como alternativa para controlar la EEC. Por lo cual, se realizaron dos experimentos *in vivo*. En ambos experimentos se realizó un análisis metataxonómico de muestras de ciego y/o heces mediante la secuenciación de la región V3 y V4 del gen S por medio de la plataforma Illumina MiSeq® System y el análisis bioinformático se realizó utilizando los programas R, QUIME y DADA2 y se analizaron las secuencias mediante un PERMANOVA. Adicionalmente, en el primer experimento se determinaron los biomarcadores asociados a EEC mediante un análisis LefSe. Para el segundo experimento se evaluaron la presencia de signos y parámetros productivos, así como el pH, amonio y ácidos grasos volátiles de cecotrofos. Como resultados, en el experimento 1 se obtuvieron que los índices de diversidad fueron menores en conejos con EEC ($P \leq 0.01$) y once biomarcadores fueron identificados en los phyla: Verrucomicrobia, Synergistetes, Bacteroides y Firmicutes en EEC+. Para el experimento dos la EEC tuvo un efecto negativo en parámetros productivos ($P \leq 0.01$), y la dieta un efecto positivo ($P \leq 0.05$). Los ácidos grasos volátiles debido a un efecto de la dieta ($P \leq 0.05$) de la enfermedad ($P \leq 0.01$) y de la interacción de la enfermedad con la dieta ($P \leq 0.01$). No hubo diferencia en los índices de diversidad, pero sí en los índices de abundancia ($P \leq 0.05$). Además el análisis de PERMANOVA demostró que se detectaron diferencias en la composición microbiana tanto en heces como en cecotrofos dependiendo del estado de la enfermedad. En conclusión, los organismos asociados a la EEC son los miembros de los phyla Synergistetes, Verrucomicrobia, Bacteroides y Firmicutes, identificando a los géneros *A. muciniphila*, *Clostridium spp.* y *Cloacibacillus porcorum* como altamente asociados a la EEC. Por último, la adición de la fibra en la dieta puede modular la presencia de la EEC, ya que la dieta con 36% de FDN tiene influencia sobre los metabolitos producidos, la microbiota cecal y disminuye los signos de EEC.

En conclusión la presentación de la enteropatía epizootica del conejo se relaciona con un aumento en la abundancia de organismos de los géneros *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. y *Cloacibacillus porcorum*, así como una disminución en los índices de diversidad

Palabras clave: Enteropatía Epizootica del Conejo, Fibra detergente neutro (FDN), análisis metataxonómico.

Abstract

Epizootic Rabbit enteropathy (ERE) affects young rabbits between 3 and 7 weeks of age, causing diarrhea with the presence of translucent mucus, abdominal distention and death. In Mexico, it represents 32% of digestive ailments in rabbit production. The exact etiology of the disease is not fully described and antibiotics are used as the only alternative for its control. The present work aimed to identify the microorganisms related to the disease and evaluate the inclusion of neutral detergent fiber (31 and 36%, NDF) as alternative to control EEC. Therefore, two in vivo experiments were performed. In both experiments, a metataxonomic analysis of cecum and / or stool samples was performed by sequencing the V3 and V4 region of the S gene using the Illumina MiSeq® System platform and the bioinformatic analysis was performed using the R, QUIME and DADA2 and the sequences were analyzed by means of a PERMANOVA. Additionally, in the first experiment the biomarkers associated with EEC were determined by means of a LefSe analysis. For the second experiment, the presence of product signs and parameters, as well as pH, ammonium and volatile fatty acids of cecotrophs were evaluated. As results, in experiment 1 it was obtained that the diversity indices were lower in rabbits with EEC ($P \leq 0.01$) and eleven biomarkers were identified in the phyla: Verrucomicrobia, Synergistetes, Bacteroides and Firmicutes in EEC +. For experiment two, EEC had a negative effect on productive parameters ($P \leq 0.01$), and diet a positive effect ($P \leq 0.05$). Volatile fatty acids due to an effect of the diet ($P \leq 0.05$) of the disease ($P \leq 0.01$) and of the interaction of the disease with the diet ($P \leq 0.01$). There was no difference in the diversity indices, but there was in the abundance indices ($P \leq 0.05$). In addition, the PERMANOVA analysis showed that differences were detected in the microbial composition in both feces and cecotrophs depending on the state of the disease. In conclusion, the organisms associated with EEC are the members of the phyla Synergistetes, Verrucomicrobia, Bacteroides and Firmicutes, identifying the genera *A.*

muciniphila, Clostridium spp. and Cloacibacillus porcorum as highly associated with CEE. Finally, the addition of fiber in the diet can modulate the presence of CEE, since the diet with 36% NDF has an influence on the metabolites produced, the caecal microbiota and reduces the signs of CEE.

In conclusion, the presentation of epizootic enteropathy in the rabbit is related to an increase in the abundance of organisms of the genera *A. muciniphila*, *Clostridium spp.* and *Cloacibacillus porcorum*, as well as a decrease in the diversity indices

Keywords: Epizootic Rabbit Enteropathy, Metasequencing, Neutral Detergent Fiber (NDF), DADA2.

Dirección General de Bibliotecas UAG

1. Introducción

Las enfermedades digestivas son la principal causa de pérdidas económicas en la producción cunícola debido a la muerte de gazapos, siendo la enteropatía epizootica del conejo (EEC) el tercer síndrome digestivo de mayor impacto causando pérdidas hasta del 80% de la producción a nivel mundial. Principalmente afecta a conejos en producción tanto en sistemas intensivos como semi-intensivos, afectando al 95% de las unidades productivas, registrándose niveles de morbilidad de hasta 90% y de mortalidad de hasta 80% en casos extremos en los gazapos destetados (Licois et al., 2006). Principalmente afecta la ganancia de peso de los conejos jóvenes y en ocasiones llega a afectar a los conejos maduros, impactando así los índices productivos de toda la granja (Pérez de Rozas et al., 2005; Finzi et al., 2008). En México, la EEC representa el 40% de las enteropatías que afectan la cunicultura.

La etiología de la EEC no ha sido descrita completamente, a pesar de los esfuerzos de diversos investigadores (Licois et al., 2000; Dewrée et al., 2007; Huybens et al., 2013; Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017; Jin et al., 2018).

No obstante, el tratamiento clásico para este síndrome es a base de antibióticos, como la tiamulina y la bacitracina, Sin embargo, el uso de antibióticos en la prevención de enfermedades gastrointestinales en la producción cunícola tiene efectos adversos sobre la microbiota cecal, ya que aumenta el riesgo del desarrollo de una disbiosis posterior al tratamiento. La búsqueda de tratamientos alternativos es indispensables para el control de la EEC. Algunos investigadores (Andoh et al., 2003; Álvarez et al., 2007; Gómez-Conde et al., 2007; Combes et al., 2013) han documentado que los carbohidratos estructurales de origen vegetal (CEOV's) son un pilar importante en la manipulación y mantenimiento de un microbioma digestivo sano. El presente trabajo tuvo como finalidad identificar los microorganismos relacionados con la enfermedad, así como de evaluar el efecto de dietas altas en fibra detergente neutro como alternativa para dicho síndrome.

2. Revisión de literatura

2.1 Generalidades del conejo

Los conejos pertenecen al orden Lagomorpha y son mamíferos medianos, herbívoros, considerados importantes en la investigación por su importancia en descubrimientos médicos y su capacidad de convertirse en plaga para los cultivos de Reino Unido y Australia (Chapman y Flux, 2008). Los conejos son diferentes a los roedores debido a que presentan un segundo par de incisivos, conocidos como dientes de clavija, localizados en la parte trasera de los incisivos.

Las especies de conejos descritas son 29 (Chapman y Flux, 2008). Los conejos como todos los lagomorfos, tienen una porción alargada (rostrum) unida al cráneo lo que reduce el peso de los huesos de la cabeza, esta característica es única en este orden (Brewer, 2006; Chapman y Flux, 2008).

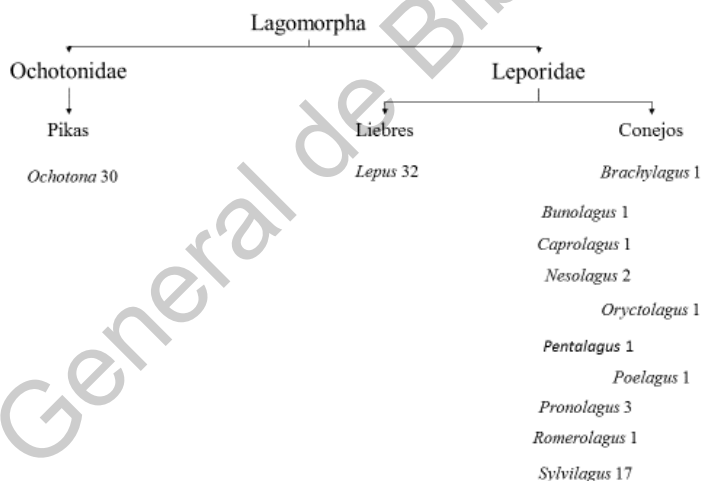


Figura 1. Clasificación de los lagomorfos, el número a la derecha indica los géneros en cada especie (Traducido de Chapman y Flux, 2008).

2.1.1. Origen y domesticación del conejo

El conejo se ha considerado como autóctono del norte de África (SurrIDGE et al., 1999), sin embargo, es probable que sea originario de la península Ibérica debido al efecto de la migración de la era glacial del conejo (Ferrand y Branco, 2007).

La domesticación del conejo inicia con los romanos y recorre un camino biológico, histórico y social que finalizó hace algunos siglos (Irving-Pease et al., 2018). Los Fenicios iniciaron el consumo del conejo aproximadamente en el año 1100 a.C. (Dalle, 2014). Posteriormente, en el siglo XI llegó a las islas Británicas (Licciardelli y Cortese, 1962, citado por Dalle, 2014), entre los siglos XIX y XX, fue introducido en Australia, Nueva Zelanda, Chile y Argentina (Flux y Fullagar, 1992, citado por Chapman y Flux, 2008). Con la *leporaria* comienza la domesticación, capturando conejos de vida libre y manteniéndolos con fines de la introducción de animales en la zona con el fin de cazarlos (Weisbroth et al., 1974, citado por Ferrand y Branco, 2007). En América existe evidencia de productos a base de conejos y liebres en Mesoamérica desde la época prehispánica (Sugiyama et al., 2016).

2.1.2. Importancia de la cunicultura

La cunicultura se define como la cría del conejo (RAE, 2001), e inicia formalmente en el siglo XIX con el establecimiento de producciones en Europa para el uso de la carne y la piel y posteriormente, a inicios del siglo XX, se criaron como animales de compañía (Dalle, 2014).

En los datos más actuales (FAOSTAT, 2017) se reporta una producción por continente de la siguiente manera: África 87,680 ton, América 165,546 ton, Europa 289,900 ton y Asia 1,088,315 ton en el año 2017, encabezando la lista China con 931,334 ton, España 57,258 ton, Egipto 56,129 ton, Italia 46,533 ton, Francia 44,019 ton, México 4,440 ton.

El conejo se produce principalmente para el consumo de carne, aunque es una pieza de importancia para la investigación médica (Yanni, 2004). Los conejos tienen la ventaja sobre otros modelos animales de alcanzar la madurez esquelética a una edad relativamente temprana, lo que limita los costos de investigación (Bottagisio et al., 2019).

2.1.3. Sistemas de producción del conejo

A finales del siglo XIX e inicios del siglo XX la producción de conejos se especializó en la producción de carne o como animal de laboratorio, se crearon razas como Nueva Zelanda y California (Lebas et al., 1996). A partir de este momento, los sistemas se enfocaron en: el ritmo reproductivo, la tecnificación productiva y la relación entre espacio e inversión (Roca, 1993; Lebas et al., 1996; Martínez et al., 2004).

Los sistemas productivos del conejo se clasifican de acuerdo al ritmo reproductivo, el número de días a la monta post parto y número de días de lactancia, por lo que se dividen en: Intensivo, semi-intensivo, extensivo y sobre-extensivo (Martínez et al., 2004).

- 1) Sistema intensivo: Se obtienen entre 9 a 10 partos por año y una lactancia de 26 a 28 días (Lebas et al., 1996; Martínez et al., 2004).
- 2) El sistema semi-intensivo: Presenta 8 partos por año y tiene una lactancia de 34 a 38 días (Lebas et al., 1996; Martínez et al., 2004).
- 3) El sistema extensivo: Se obtienen 4 partos por año y una lactancia de 42 a 60 días. El sistema se usa en la producción para autoconsumo y venta a baja escala. (Martínez et al., 2004).
- 4) El sistema sobre-extensivo: No hay control de reproducción. La lactancia es de más de 60 días. Este sistema es para autoconsumo a baja escala (Martínez et al., 2004)

Desde el punto de vista de tecnificación de la unidad productiva se distinguen tres categorías: Traspatio o tipo familiar, semi-industrializado o semi-tecnificado y el tipo industrial o totalmente tecnificado.

- 1) El tipo familiar o de traspatio, se caracteriza por una baja o nula presencia de instalaciones especializadas. Estas producciones se caracterizan por la cría para autoconsumo y en México representan el 75% de la producción (Martínez et al., 2004).
- 2) El sistema semi-tecnificado o semi-industrial tiene instalaciones especializadas para la especie (jaulas, comedero y bebederos). Este sistema representa el 20% de las unidades productivas y es el sistema que más carne produce en México (Martínez et al., 2004).
- 3) El sistema tipo industrial o tecnificado, consiste en instalaciones e inmueble especialmente diseñados para la especie. En México estas unidades productivas representan menos del 1% (Martínez et al., 2004).

2.1.4. Características nutricionales de la carne de conejo

La carne de conejo presenta características nutricionales importantes en la alimentación humana (Cuadro 1.), aportando una fuente de proteína de fácil digestión y una proporción importante de aminoácidos esenciales como lisina (2.12g/100g), treonina (2.01g/100g),

valina (1.19g/100g), isoleucina (1.15g/100g), leucina (1.73g/100g) y fenilalanina (1.04g/100g). El 60% de los ácidos grasos contenidos en esta carne son insaturados y los polinsaturados presentan un rango entre 27 y 33% como se observa en el cuadro 2 (Dalle, 2014).

Cuadro 1. Composición químico proximal y energía promedio con desviación estándar de cortes de carne de conejo (Modificado de Hernández y Dalle Zotte, 2010).

Parámetro (g/100g)/pieza	Brazuelo	Lomo	Pierna	Canal entera
Agua	69.5 ± 1.3	76.6 ± 1.4	73.8 ± 0.8	69.7 ± 2.6
Proteína	18.6 ± 0.4	22.4 ± 1.3	21.7 ± 0.7	20.3 ± 1.6
Lípidos	8.8 ± 2.5	1.8 ± 1.5	3.4 ± 1.1	8.4 ± 2.3
Cenizas		1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.05	1.8 ± 1.3
Energía (kJ/100g)	899 ± 47	603	658 ± 17	789 ± 106

Cuadro 2. Porcentaje promedio y desviación estándar de varios ácidos grasos y colesterol en cortes de carne de conejo. AGS: ácido graso saturado, AGM: ácido graso monoinsaturado, AGPI: ácido graso polinsaturado, AEP: ácido eicosapentanoico, ADH: ácido docosahexanoico (Modificado de Hernández y Dalle Zotte, 2010).

Ácido graso %/ Pieza	Lomo	Pierna	Canal entera
AGS	38.5 ± 4.8	39.3 ± 5.5	40.5 ± 1.6
AGM	28.3 ± 4.4	28.3 ± 3.6	32.3 ± 2.4
AGPI	32.9 ± 6.7	31.9 ± 8.4	26.5 ± 2.0
AEP	0.17 ± 0.13	0.06 ± 0.02	0.012 ± 0.003
ADH	0.37 ± 0.34	0.17 ± 0.27	0.007 ± 0.001
n-6/n-3	5.1 ± 2.2	10.0 ± 3.7	6.6 ± 1.3
Colesterol (g/100g)	47.0 ± 7.9	61.2 ± 5.2	55.3 ± 18.5

2.1.5. Conejo de raza Nueva Zelanda

Dentro de la especie cunícola, la raza más usada en la producción e investigación es la Nueva Zelanda variedad blanco, originaria de Estados Unidos de América como una raza de doble propósito carne y piel. El conejo de Nueva Zelanda es precoz, fecunda dando un

promedio de 8 gazapos por parto y con baja propensión al padecimiento de enfermedades, con un peso entre 4 y 4.5 kg en edad adulta. Presenta tres variedades: negro, rojo y blanco (Martínez et al., 2004; Brewer, 2006).

2.2. Microbiología digestiva

2.2.1. Generalidades

Desde 1877 la concepción de la convivencia entre macroorganismos y microorganismos está presente en los estudios de ecología y micro ecología (Esser et al., 2019), esto se debe al constante contacto con los microorganismos existentes en el medio y los existentes en los macro organismos, derivado de este conocimiento y gracias al avance de las técnicas moleculares y de secuenciación se han desarrollado diversos conceptos, estos con frecuencia pueden confundirse entre sí. En esta sección se abordará la definición de los conceptos más importantes en el estudio de los sistemas micro ambientales como el que se desarrolla en el sistema digestivo de los macro organismos.

2.2.1.1. Holobionte

El concepto de holobionte (del latín *holo*: todo y *bios*: vida) fue introducido por Guerrero et al (2013) al enfatizar la necesidad de estudiar al macroorganismo y todas las comunidades microbianas que lo rodean y habitan como una sola unidad y no como sujetos de estudio separados, definiéndolo como el macroorganismo y todas las comunidades de microorganismos que tienen sus nichos en el macroorganismo (Figura 3, Esser et al., 2019). Posteriormente este concepto se usó para designar a los corales, en los que se observa una estrecha interacción entre macroorganismo y microorganismo, en este caso animal-alga-bacteria (Valdespino et al., 2014). Existen dos componentes esenciales del holobionte: el huésped o comunidades de microorganismos y el hospedero o macroorganismo.

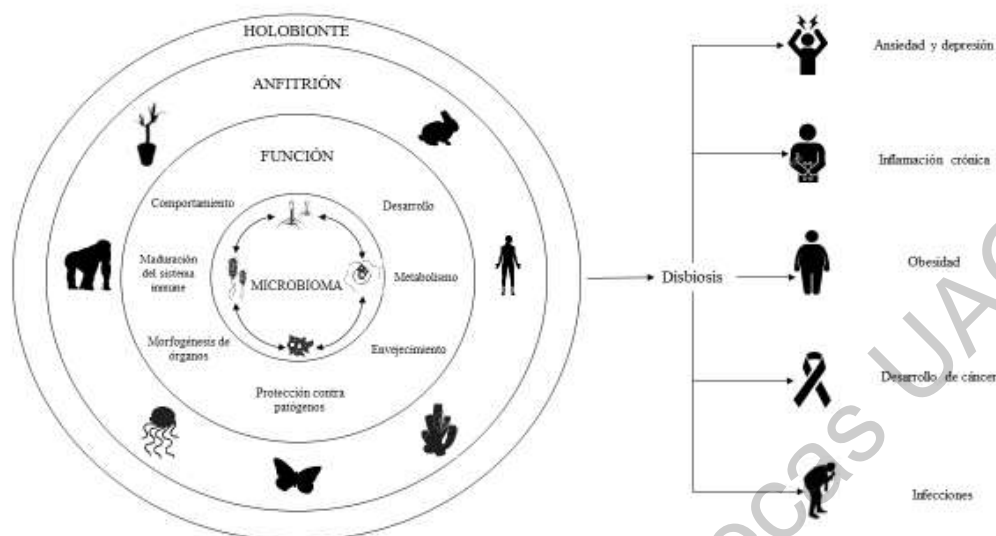


Figura 3. Esquematzación de un holobionte o meta organismo. Se observan los componentes del concepto y la interacción que tienen mutuamente (Modificación de Esser et al., 2019).

2.2.1.2. Hologenoma

El hologenoma se define como la totalidad de los genes en el holobionte, es decir, la diversidad genética resultado de la suma del genoma del hospedero y el genoma de todas las comunidades microbianas que residen en él, y se basa en cuatro consideraciones primordiales: i) todos los holobiontes contienen comunidades microbianas con abundancia y diversidad diferente entre individuos, ii) las comunidades microbianas participan activamente en el fitness del holobionte, iii) una importante parte del genoma de las comunidades microbianas y del hospedero son transmitidas de forma horizontal y vertical a las siguientes generaciones, otorgando características únicas al holobionte, y iv) la variación genética entre holobiontes se da por el cambio genético del hospedero o de las comunidades microbianas sin embargo, el genoma de las comunidades microbianas se puede adaptar a los cambios del ambiente con mayor velocidad que el genoma del hospedero (Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2019). Este concepto se usa para hacer referencia no solo a la identificación de las comunidades microbianas presentes en el holobionte, sino, al estudio y análisis del genoma completo del hospedero y de todas las comunidades microbianas; comúnmente este enfoque de estudio requiere de herramientas

para el análisis de la expresión de dichos genes y la interacción que tienen entre ellos (Yoon et al., 2015).

2.2.1.3. Microbioma

El genoma del hospedero cambia lentamente a lo largo de su evolución en comparación del genoma de las comunidades microbianas. El concepto de microbioma permite al investigador separar el estudio de este cambio solo en las comunidades microbianas. Con frecuencia, este concepto se confunde con la identificación de los microorganismos que componen a las comunidades microbianas (se desarrolla en el siguiente punto), pero el microbioma se define como todos los genomas que componen a las comunidades microbianas, esto incluye los dominios Eucaria, Bacteria, Archea y Nucleocoeva (virus) (Resenberg and Zilber-Rosenberg 2019, Yoon et al., 2015).

2.2.1.4. Microbiota

La microbiota comprende las comunidades microbianas que conviven con el holobionte. Las cuales son identificadas a partir de muestras ambientales, esto generalmente, no abarca a todos los microorganismos localizados en el ambiente y generalmente esta identificación se realiza usando una fracción de un gen que esté conservado en toda la comunidad estudiada, pero que contenga suficiente variación para poder hacer una discriminación entre un género y otro, en ocasiones hasta entre cepas (Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2019).

Los genes más usados para esta identificación son los genes ribosomales, 16s y 18s en análisis metataxonómicos. No obstante, se han desarrollado metodologías que usan la subunidad grande ribosomal secuenciando los genes 23s y 28s (Yilmaz et al., 2011; Bengtsson-Palme et al., 2015), los cuales pueden ser diferenciados por su peso molecular, tamaño del espacio intergénico o por la secuenciación de los nucleótidos que lo componen. La mayoría de los estudios que hacen uso de la secuenciación para la identificación de la microbiota utilizan una o 2 regiones de este gen, lo que minimiza el gasto económico y provee de una correcta identificación de las comunidades microbianas. Cabe mencionar que existen pocos estudios que utilicen ambos genes que analizar Eucaria (gen 18s) y Bacteria (gen 16s) (Yoon et al., 2015; Morris, 2018; Rosenberg y Zilber-Rosenberg, 2019).

2.2.2. Disbiosis vs Eubiosis

La estrecha relación que forma el holobionte es tan importante que un desequilibrio afecta de forma drástica tanto al huésped como al hospedero. La relación de la microbiota con el sistema gastrointestinal, no solo comprende el ámbito nutricional, sino que abarca varios aspectos como el inmune, el de desarrollo y el estado de salud (Cerqueda-García y Falcón, 2016).

Metchnicoff definió la eubiosis como el mantener una relación equilibrada entre la microbiota comensal y la microbiota patógena y cuando este equilibrio se rompe, la microbiota patógena comienza a ocupar nichos en el ecosistema, aumentando su propensión a reproducirse exitosamente llamado fitness (Metz et al., 1992) y provocando una disbiosis (Lebas et al., 1996). Desde la perspectiva de holobionte, el microbioma se divide en funcional y disfuncional (Inkpen, 2019). El microbioma cambia a lo largo de la vida del holobionte y su composición depende de factores como la especie, la dieta, y el ambiente en el que se desarrolla el holobionte (Kostic et al., 2013).

La microbiota funcional o eubiótica se compone, por lo general, por los phyla Firmicutes y Bacteroides, al ocupar diversos nichos en el ecosistema gastrointestinal y producir diversas sustancias como los ácidos grasos volátiles, regula el crecimiento de la microbiota mala, la cual pertenece por lo general al phylum γ Proteobacteria, el cual se encuentra en bajas concentraciones de forma sana en el microbioma gastrointestinal (Sekirov et al., 2010). Este equilibrio, aunque estable, puede romperse por diversos factores, como la acción de antibióticos, patógenos externos y estrés prolongado, así como, factores propios de la defensa contra patógenos del huésped como la diarrea y la inflamación, transformando el microbioma del holobionte en disfuncional o disbiótico (Sekirov et al., 2010; Clemente et al., 2012; Iebba et al., 2016).

El microbioma disbiótico se define como el cambio del microbioma funcional a un microbioma disfuncional (Clemente et al., 2012). El cambio puede ser en tres niveles: i) cambio en la microbiota, cuando se modifica la diversidad microbiana o la abundancia de una o varias comunidades (Iebba et al., 2016), ii) cambio en el genoma del microbioma, es decir, ganancia o pérdida de uno o más genomas por parte de la microbiota (Kriss et al., 2018) y iii) cambio metabólico, la diversidad, abundancia y genoma son los mismos de una microbiota funcional, pero al cambiar uno o más sustratos en la dieta los

metabolitos producidos cambian alterando la salud del holobionte (Brown et al., 2012). Dichos cambios provocan una serie de eventos como son: la producción de metabolitos propios de la inflamación, aumento de la motilidad y producción de moco intestinal, y la falta de ingesta de alimento por parte del hospedero, los cuales tienen como consecuencia la proliferación de microorganismos patógenos, causando un cambio en la estructura de la microbiota (Iebba et al., 2016).

2.2.3. Influencia del microbioma sobre la nutrición y salud del hospedero

El holobionte depende fuertemente de la presencia del microbioma para su desarrollo y evolución, un ejemplo es el microbioma que se desarrolla en el ambiente digestivo, ya que es el más abundante y diverso en los vertebrados (Montalban-Arques et al., 2015) y provee al hospedero de dos funciones desarrolladas por el microbioma digestivo. La primera es la posibilidad de aprovechar nutrientes de los carbohidratos estructurales de origen vegetal por la acción enzimática de los microorganismos produciendo ácidos grasos volátiles, como el ácido acético, propiónico y butírico (Figura 4), los cuales juegan un papel importante en los animales. Por ejemplo, en los rumiantes el propionato se metaboliza en el hígado como precursor de la glucosa en la producción de leche (Flint et al., 2008). En humanos, se ha demostrado que el ácido acético es usado por el microbioma para su crecimiento y el ácido butírico se usa como fuente de energía por los enterocitos (Pattayil y Harikumar-Thampi, 2019). La segunda función es que el microbioma digestivo también sintetiza productos como las vitaminas. Las familias de *Bacteroides* y *Firmicutes* tienen la capacidad de sintetizar vitaminas del complejo B, en la mayoría de los herbívoros y el humano (Rodionov et al., 2019).

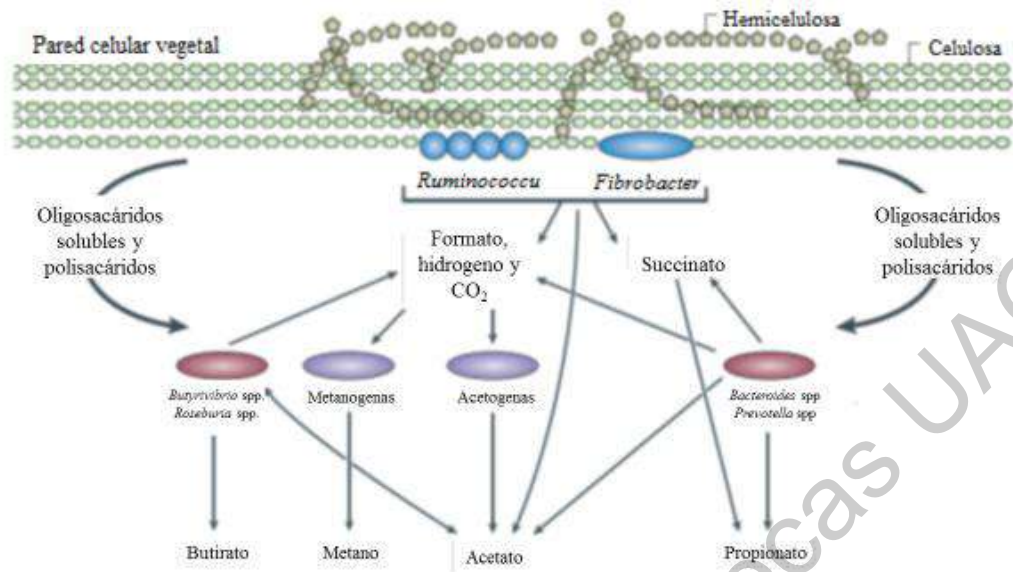


Figura 4. Uso de los carbohidratos estructurales de origen vegetal por el microbioma. Bacterias en azul como *Ruminococcus* y *Fibrobacter* están especializadas en la degradación primaria, bacterias como *Butyrivibrio* y *Bacteroides* en rojo usan oligosacáridos y polisacáridos solubilizados y las bacterias Metanógenas y Acetógenas usan metabolitos de la primera degradación para la formación de ácido acético y metano (Flint et al., 2008).

Por otro lado, el microbioma tiene otra función importante, el desarrollo de la tolerancia del sistema inmune y la maduración de este. Estos dos procesos comienzan desde el nacimiento, ya que es el primer contacto que tiene el sistema inmune con la microbiota (Maynard et al., 2012), el cual se inicia desde el canal de parto y posteriormente al momento del amamantamiento (Grönlund et al., 2011).

El desarrollo de una microbiota propia por parte del mamífero está relacionada con la tolerancia del sistema inmune. El tejido linfóide asociado a la mucosa gástrica contiene elementos que están maduros al momento del nacimiento, como los linfonodos mesentéricos. Los folículos linfoides aislados empiezan a madurar después del nacimiento con ayuda de los linfocitos T reguladores (Treg), los cuales expresan CD4 y FoxP3, manteniendo así el balance entre linfocitos proinflamatorios (Figura 5, Chistiakov et al., 2015).

La activación de dichas células está mediada por el retinol, que estimula la diferenciación de linfocitos Treg y la producción de interleucina 10. Esta última, también se encuentra

en la leche materna, tiene un efecto antiinflamatorio, y es ingerida por el mamífero junto con la microbiota que se encuentra en el pezón, lo cual permite al microbioma propio ser tolerable por el sistema inmunológico. El proceso de maduración y tolerancia es constante y dinámico durante la etapa de crecimiento, y requiere de la microbiota externa, el sistema inmune y la alimentación para su correcto desarrollo. (Maynard et al., 2012; Chistiakov et al., 2015).

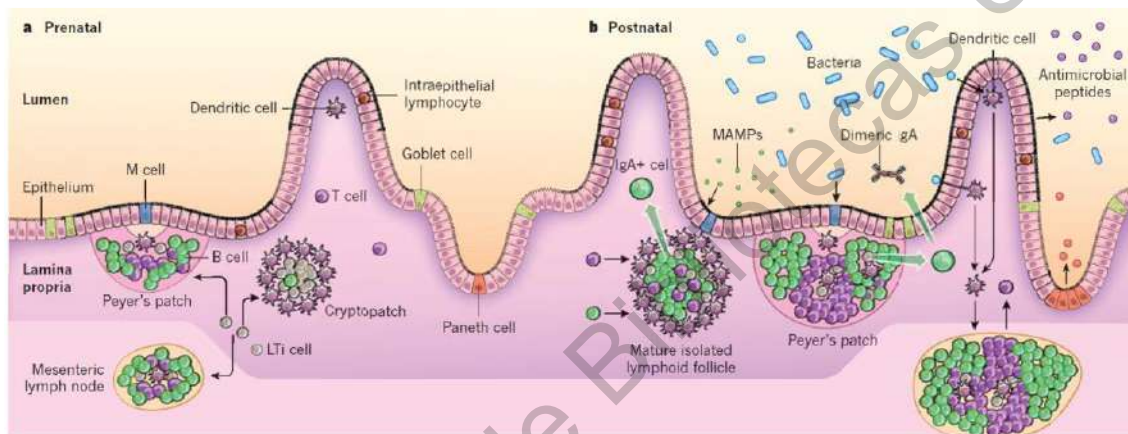


Figura 5. El tejido linfático asociado a la mucosa gastrointestinal establece una relación simbiótica perinatal entre la microbiota y el intestino.

a) Prenatalmente, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos se desarrollan por el estímulo de células inductoras de tejido linfático (CiTL) y se dirigen a sitios del intestino. Esto, induce el reclutamiento de células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B listos para la respuesta inmune a la presencia microbiana. Los linfocitos intraepiteliales se establecen en el epitelio antes del parto. b) Postnatalmente, los microorganismos colonizan el tracto digestivo del recién nacido inmediatamente. Se muestra de izquierda a derecha: los patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs) reconocidos por los receptores en las células epiteliales intestinales y las células dendríticas (DC) estimulan el reclutamiento adicional de linfocitos B y linfocitos T, madurando los nódulos linfáticos aislados. Los nódulos linfáticos aislados liberan linfocitos productores de IgA (Maynard et al., 2012).

La maduración del sistema inmune gastrointestinal y mantenimiento de la tolerancia comienzan con el cambio de dieta del mamífero (Figura 6), es decir cuando su dieta ya

no se compone solo de leche, con este evento se amplían los antígenos ingeridos por el mamífero desafiando al sistema inmune y al microbioma ya establecido hasta ese momento (Chistiakov et al., 2015). En cuanto al balance y producción de linfocitos, esta aumenta y se mantiene hasta la maduración del sistema inmune y esto varía entre especies. Comienza con el descenso de la inmunidad aportada por la leche materna y comienza la producción de anticuerpos por parte de sistema adaptativo gracias a la estimulación constante los receptores de la células T (Liu y Rhoads 2013; Montalban et al., 2015; Chistiakov et al., 2015).

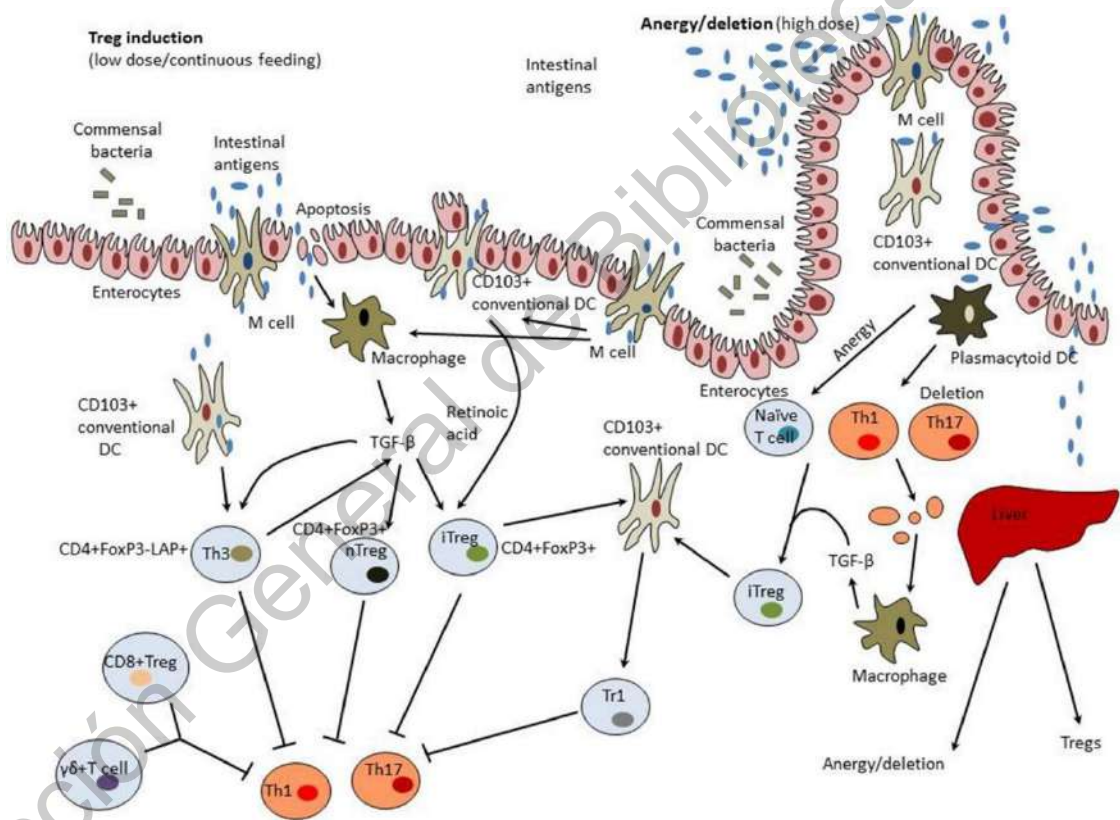


Figura 6. Mecanismos de inducción de tolerancia de la mucosa intestinal. (Chistiakov et al., 2015).

2.2.4. Diversidad y abundancia microbiana

En esta sección se abordarán las definiciones de diversidad y abundancia desde el punto de vista ecológico, ya que es en el que se basan los parámetros actuales de análisis en ecología microbiana.

2.2.4.1. Definición

Los conceptos de diversidad y abundancia se han utilizado desde 1950, no obstante, ha sido difícil poder llegar a una definición concreta y aceptada por todos los investigadores, debido a que estas medidas dependen de diversos factores (Núñez 1990).

La diversidad abarca dos factores de estudio: 1) el número de especies diferentes en una comunidad, también conocido como riqueza de especies, concepto dual que relaciona la riqueza o número de especies y 2) la abundancia de individuos que componen una de las especies. Esto supone la primera dificultad, el primer concepto tiene dos formas de interpretación: el total de especies (S) y la cantidad total de individuos de todas las especies (N), por ejemplo “se reportan 4 especies en una población de 100 individuos en total”, y el número de especies solamente (S), por ejemplo, “se reportan 25 especies distintas en la muestra A”. En el caso del segundo concepto se relaciona el número de especies (S) con la abundancia relativa de cada especie, por ejemplo, “se identificaron 4 especies (A, B, C, y D), con una abundancia de: A) 30 individuos, B) 20 individuos, C) 40 individuos y D) 10 individuos. Esto se aplica solo si: el área de estudio se puede delimitar de manera precisa en tiempo y espacio y que todas las especies puedan ser identificadas y enumeradas (Mason et al., 2005). Lo anterior relaciona entonces ambos conceptos, diversidad y abundancia sin embargo, estos dos parámetros son ortogonales entre sí, es decir, son independientes; ya que se puede tener un alta diversidad con una abundancia relativa muy baja, por ejemplo “se identificaron 2520 especies con una abundancia relativa de no más de 2 individuos por especie”, pero si se interpreta con relación al número de individuos en total sería “se identificaron 2520 especies en una población de 6000 individuos” (Núñez 1990, Mason et al., 2005).

Por lo tanto, la diversidad se definirá como el número de especies identificadas en una muestra ambiental con relación a la cantidad de individuos que forman parte de cada especie. En cambio, la abundancia se definirá como el número de individuos que forman parte de cada especie identificada en una muestra ambiental (Villarreal et al., 2004).

Para el análisis de diversidad se usan dos enfoques, la diversidad alfa y diversidad beta. La diversidad alfa es aquella que se presenta en una comunidad determinada y se considera homogénea, es decir, la diversidad local o de una muestra. En cambio, la diversidad beta analiza el cambio o reemplazo en la composición de especies entre las

comunidades o muestras de un área mayor pero dentro de un mismo contexto ambiental (Villarreal et al., 2004).

2.2.4.2. Estimadores usados para el análisis de la diversidad y abundancia microbiana

Debido a que existen diferentes interpretaciones de los conceptos de diversidad y abundancia, se han desarrollado diversas formas de estimar su valor en la ecología, por lo que se abordarán los estimadores utilizados en el estudio de la microbiota gastro intestinal.

2.2.4.2.1 Diversidad alfa (riqueza específica)

2.2.4.2.1.1 Métodos directos

Índice de rarefacción: Este método es usado para analizar muestras de tamaño desigual, calculando el número esperando de especies de cada muestra al reducirla a un tamaño de la muestra igual para todas, reduciendo la mayor a la de menor tamaño para poder compararlas (Villarreal et al., 2004, Alcolado 1998).

Curva de acumulación de especies: Métodos usado para el cálculo del número de especies esperadas a partir de un muestreo. Se observa el número de especies que se van acumulando con respecto al número de muestras acumuladas y tienen 2 expresiones: i) logarítmica, en la cual el número de especies esperadas disminuye de manera proporcional al número de especies ya identificadas hasta llegar a cero, y ii) la exponencial, donde la disminución se da exponencialmente hasta llegar a cero (Villarreal et al., 2004).

2.2.4.2.1.2. Métodos no paramétricos

Los métodos no paramétricos son usados en comunidades complejas que no se ajustan a una distribución estadística o modelo determinado, es decir, cuando se desconoce el número de individuos debido a que se desconoce el comportamiento de distribución de las especies.

El índice de Chao 2 estima el número de especies esperadas tomando en consideración el número de especies únicas (que se observan solo en una muestra) y el número de especies dobles (observadas en 2 muestras) (Villarreal et al., 2004, Heip et al., 1998).

El método por equidad tiene en cuenta la abundancia de cada especie y la uniformidad en la que se observan distribuidas. Por lo que el índice de Shannon-Wiener teoriza que todas

las especies identificadas están representadas en la muestra, indicando la uniformidad en la abundancia (Villarreal et al., 2004).

2.2.4.2.2. Diversidad alfa (especies en relación con su abundancia)

Por dominancia: Discrimina especies que no tienen una alta abundancia dando prioridad a las mejor representadas o dominantes (Villarreal et al., 2004).

Índice de Simpson: Muestra la probabilidad de que dos individuos extraídos aleatoriamente de la misma muestra correspondan a la misma especie (Villarreal et al., 2004).

Índice de Chao 1: Este método calcula el número de especies esperadas tomando en cuenta las especies raras, es decir aquellas que están representadas por un individuo (singletons) y aquellas que están representadas por 2 individuos (doubletons) (Heip et al., 1998, Alcolado 1998).

2.2.4.2.3. Diversidad beta

Por similitud o disimilitud: Como su nombre lo indica, hace uso de la semejanza o la falta de ella en la composición de las especies y/o sus abundancias, para ello hace uso de métodos cualitativos en donde solo se considera la composición de las especies (Villarreal et al., 2004).

Índice de Jaccard: este método hace relación entre las especies compartidas en las diferentes muestras y las que se encuentran exclusivas en una muestra (Heip et al., 1998).

Índice de Sorensen: En este se relacionan las especies compartidas en todas las muestras y el promedio aritmético de las especies en todas las muestras (Alcolado 1998).

2.2.4.3. Diversidad y abundancia microbiana en el tracto digestivo de herbívoros domésticos.

Los conejos y los rumiantes pertenecen al grupo de animales que se han adaptado y evolucionado para el consumo de carbohidratos estructurales de origen vegetal, esto gracias a la relación simbiótica que tiene con el microbioma digestivo. No obstante, las cámaras de fermentación que posee cada uno son diferentes anatómicamente y fisiológicamente entre sí, por lo que, sus microbiomas también son diferentes entre sí, sin embargo, ambas cámaras producen ácidos grasos volátiles. En esta sección se mostrarán

las diferencias anatómicas de ambas cámaras de fermentación, así como la diferencia en el microbioma digestivo de cada uno.

Los conejos y los rumiantes dependen de la actividad fermentativa para obtener nutrientes y salud, sin embargo, al comparar las cámaras fermentativas de dichas especies, podemos observar similitudes en las características físico-químicas y una diferencia marcada en la proporción Bacteroides-Firmicutes presentes (Cuadro 3). El proceso fermentativo, así como los productos finales son similares entre las cámaras de ambas especies, no obstante la cantidad de ácidos grasos volátiles producidos y los carbohidratos precursores son diferentes en proporción. Cabe mencionar que el tiempo que pasa el contenido cecal y ruminal en cada una de sus cámaras de fermentación es muy diferente (Jacquier et al., 2014, Yáñez et al., 2015).

En el caso del rumen, la fermentación es mayormente celulolítica, ya que la fisiología del rumen permite un mayor tiempo de exposición a las enzimas microbianas y la rumia permite fraccionar las partículas de fibra, haciendo más fácil su degradación (Yáñez et al., 2015). En el caso del ciego como antes se mencionó la fermentación es más hemicelulolítica, sin embargo, a grandes rasgos la fermentación ruminal y cecal produce metabolitos que son aprovechados por el huésped, teniendo como diferencia el tipo de sustrato (celulosa o hemicelulosa) y el perfil microbiano que cada ecosistema presenta (Michelland et al., 2010).

Cuadro 3. Características físico-químicas y porcentaje de *Firmicutes* y *Bacteroides* en el rumen de la vaca y el ciego del conejo.

	Rumen	Ciego
Materia seca (%)	10-18	21-22
pH	5.5-6.9 media 6.4	5.5-6.5
Potencial de reducción mV	-350 a -400	-160
Temperatura °C	38-41	39-41 corporal
Bacteroides (%)	56.3-74	4%
Firmicutes (%)	10-13.9	90%

(McNitt et al., 2013, Combes et al., 2013, Combes et al., 2017, Yáñez et al., 2015, Kovitvadhi et al., 2015, Michelland et al., 2010).

2.2.4.3.1. Rumiantes

En los rumiantes, el número de bacterias varía entre 10^{10} y 10^{11} por gramo de líquido ruminal, lo cual representa entre 3 y 8 kilos de bacterias en el rumiante adulto. El núcleo microbiano de los rumiantes es similar en un 89.4%, identificándose 7 grupos bacterianos considerados dominantes, esto representa el 67.1% de núcleo antes mencionado y se compone por *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales*, y *Clostridiales*. En el caso de las Archeas, los géneros, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter ruminantium* *Methanosphaera sp.* y *Methanomassiliicoccaceae* representan el 89.2% de este dominio en el rumen. Los protozoarios que se han reportado en el rumen son: *Dasytricha ruminantium* *Polyplastron multivesiculatum* *Diplodinium dentatum*, *Entodinium caudatum*, *Epidinium caudatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Isotricha intestinalis*, y *Ophryoscolex purkynjei* (Newbold et al., 2015). Y los géneros *Entodinium* y *Epidinium*, son los dominantes en el rumen (Henderson et al., 2015). Los bacteriófagos que se han reportado en el rumen son Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae (Klieve, 1988; citado por Gilbert y Klieve, 2015)

2.2.4.3.2. Conejos

En el ciego se han identificado diversos grupos bacterianos, como *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Firmicutes*, no obstante, la variabilidad en abundancias es muy grande entre estudios (Abecia et al., 2007a). Un estudio filogenético reportó que el 90% de las secuencias identificadas por pirosecuenciación pertenecen a los phyla *Firmicutes*, y el 4 % *Bacteroidetes*, las cuales son las familias más frecuentes en el tracto gastro entérico de los mamíferos, aunque también hay *Actinobacteria* en 0.9% y *Proteobacteria* en 0.7%. Del filo *Firmicutes*, las familias dominantes fueron *Ruminococcaceae* con 45% y *Lachnospiraceae* con 35% (Combes et al., 2012). En el caso de las Archeas se han reportado en el conejo: *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* y *Euryarchaeota* (Zhu et al., 2016). Los estudios sobre virus en el tracto gastrointestinal del conejo son pocos, y solo se ha reportado coronavirus del género *Betacoronavirus* (Lau et al., 2012).

2.2.5. Métodos para el estudio de la microbiota gastrointestinal

El estudio de la microbiota consiste en la identificación de las comunidades microbianas que se desarrollan en un ambiente en específico, en el caso de los sistemas gastrointestinales se han desarrollado diversos métodos para su identificación. En esta

sección se describirán los métodos clásicos y moleculares, mayormente utilizados para el estudio de la microbiota gastrointestinal, así como las técnicas más actuales de secuenciación, desde la primera generación hasta la generación actual (tercera), y las herramientas computacionales para el análisis y la interpretación de los datos de secuenciación.

2.2.5.1. Métodos de estudio clásico

Las técnicas de microbiología clásica para el estudio de la microbiota son el cultivo microbiano, pruebas bioquímicas y la microscopía, las cuales son una excelente herramienta para conocer las características generales de los microorganismos que permanecen en el tracto gastrointestinal.

2.2.5.1.1. Cultivo microbiano

Desde la innovación realizada por Louis Pasteur y Robert Koch en sus investigaciones sobre la relación de los microorganismos con las enfermedades, el uso de medios o cultivos para el crecimiento microbiano está presente de forma fundamental en la investigación científica (Koch 1881, citado por Sarhan et al., 2019). Lo que ha permitido el aislamiento y la identificación usando sus características morfológicas y metabólicas, obteniendo una composición genética para clasificarlos, gracia al diseño ya sea de 1) medios de cultivo simples, con una composición conocida, 2) medios mínimos o sintéticos, con los ingredientes mínimos para el crecimiento de microorganismos y 3) medios complejos, donde se trata de asemejar los nutrientes que puede encontrar el microorganismo en el ambiente donde se desarrolla (Basu et al., 2015).

En los estudios de ecología microbiana, el cultivo fue la base del conocimiento a partir de la mitad de los años 80s, pero ahora se sabe que tiene una limitante, ya que el microbioma es complejo y se forma por diversas comunidades microbianas, teniendo diversos requerimientos nutricionales y ambientales (Sarhan et al., 2019), y los microorganismo del sistema digestivo no crecen en medio y condiciones convencionales de cultivo, sobre todo las comunidades de Archaea, virus y Eucarya (Hiergeist et al., 2015). Lo anterior conlleva a sobreestimar la diversidad de las especies, y otorga mayor importancia solo a ciertas comunidades microbianas; no obstante, estas técnicas lograron ampliar el conocimiento de las características de microorganismos con baja abundancia en el tracto digestivo, como la resistencia a los antibióticos que presenta *Clostridium*

difficile y ha sido la herramienta más importante en el descubrimiento de especies bacterianas nuevas (Costa y Weese 2019).

Para el conteo de microorganismos se utilizan diferentes técnicas, entre las que se encuentra el número más probable (MPN por sus siglas en inglés), el cual consiste en la determinación del número de células o microorganismos en una muestra a partir de diluciones en medio líquido evaluando el crecimiento por turbidez y realizando una regresión estadística (Oblinger y Koburger, 1975). En el caso del conteo total bacteriano, se realiza un conteo de las colonias cultivadas en un medio sólido, bajo la premisa que cada colonia representa una unidad formadora de colonia (UFC) (Pommerville, 2010). En los Cuadros 4 y 5 se muestran los diversos tipos de medios de cultivo que se utilizan para el aislamiento e identificación de diversos microorganismos.

No obstante, las técnicas de aislamiento, identificación y determinación de abundancia por cultivo pueden tener un alcance limitado en el estudio de la ecología microbiana, ya que hay microorganismos que no son cultivables y que pueden ser identificados mediante pruebas moleculares (Lagier et al., 2012, Sarhan et al., 2019).

Cuadro 4. Clasificación de cultivos por su estado físico.

Tipo de cultivo		
	Líquido	Sólido
Fundamento	Crecimiento de microorganismos en nutrientes en estado líquido.	Crecimiento de microorganismos en nutrientes en estado sólido, uso de agar.
Tipo de recipiente	Tubo de ensayo, matraz, botella.	Caja de Petri, tubo de ensaye.
Tipo de siembra	Por dilución, y por inmersión.	Por inmersión, en doble capa, en superficie, en estría, masiva y volumétrica.
Lectura	Turbidez, cambio de coloración, sedimentación, formación de capa superficial.	Observación directa y cambio de coloración.
Ventajas	Permite cultivar una gran cantidad de microorganismos.	Permite observar la morfología de las colonias formadas.
Desventajas	No permite la formación de colonias definidas.	La cantidad de cultivo producido es menor en comparación del medio líquido.

Información (Morse y Meitzner, 2010)

Cuadro 5. Clasificación de medios de cultivo.

Clasificación de medios por su uso			
Tipo de medio	Fundamento	Ventajas	Desventajas
Nutritivo	El medio tiene los nutrientes necesario para el crecimiento de microorganismos sin necesidades especiales.	Permite incrementar el número de células de una muestra dañada o muy pequeña. Se usa como medio de transporte.	La contaminación con otras comunidades microbianas es más frecuente.
Enriquecido	El medio contiene elementos necesarios para el crecimiento de microorganismos exigentes.	Permite el aislamiento de comunidades microbianas fuera de su nicho natural.	
Selectivo	Los ingredientes favorecen el crecimiento de determinadas comunidades microbianas sobre poblaciones generales.	Permite separar comunidades microbianas específicas de muestras complejas.	Los ingredientes son de un costo mayor y su preparación es más compleja y requiere experiencia.
Inhibidor	Uno o más ingredientes adicionados restringe por completo el crecimiento de determinada comunidad microbiana.	Evita la contaminación por comunidades externas y permite el aislamiento de comunidades específicas con exigencias generales.	
Identificador	Los ingredientes permiten comprobar alguna propiedad metabólica de la comunidad microbiana que facilita su identificación.	Las comunidades pueden ser identificadas por medio de este cultivo, así como, comprobar ciertas características metabólicas.	Requiere de conocimiento previo de las características metabólicas de las comunidades a identificar Por lo general requiere de varios ensayos con diferentes ingredientes identificadores.

Multiplicador	Este medio permite obtener una gran cantidad de células de un microorganismo ya aislado.	Permite aumentar el número de microorganismos en muestras dañadas o con baja densidad celular.	La contaminación es muy factible.
---------------	--	--	-----------------------------------

(Morse y Meitzner, 2010; Pommerville, 2010).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.2.5.1.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se utilizan para la identificación y caracterización de cepas microbianas, basándose en sus propiedades metabólicas, es decir la capacidad de producir cierta enzima para su clasificación y dependen en su mayoría de un pre cultivo bacteriano para su uso. Lo que significa que comparten limitaciones con el método de cultivo microbiano y se clasifican en i) pruebas de lectura inmediata, como son las pruebas de la catalasa y oxidasa, ii) pruebas rápidas que se pueden leer en menos de 6 h, como la hidrólisis del hipurato y la prueba de ureas, iii) pruebas lentas que se leen entre las 18 y 48 h, como las pruebas de reducción de nitratos y fermentación de azúcares, y pruebas basadas en la resistencia a la bacitracina y el crecimiento en caldo hiper salino.

La industria ofrece pruebas manuales para múltiples antígenos, las cuales permiten realizar hasta 50 pruebas y expresarlos en forma numérica, por un código definido por el fabricante como, por ejemplo, se encuentran: API (bioMerieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), Biochemical ID systems (Microgen) entre otras. Adicionalmente, se ofrecen sistemas automatizados que simplifican en gran medida las tareas y son más exactas al eliminar el error humano en algunos procesos, por ejemplo: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider entre otros (Bou et al., 2011). No obstante, las pruebas bioquímicas son rápidas y proporcionan un panorama general de la actividad de la microbiota de una muestra ambiental (Gu et al., 2009). No obstante, es importante recordar que dependen del cultivo bacteriano.

2.2.5.1.3. Microscopía

El microscopio óptico ha tenido una evolución que ha ido de la mano con el descubrimiento de los microorganismos y su relación con el entorno y la salud de los seres vivos (Masters, 2008). Este desarrollo tecnológico al igual que las pruebas bioquímicas, son herramientas de identificación de microorganismos en la ecología microbiana, por lo que, dependen del aislamiento o cultivo de microorganismo para su observación. No obstante, junto con las técnica molecular, hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés), es posible observar diferentes comunidades microbianas en el tracto digestivo, haciendo a la microscopia una herramienta de uso común en estudios sobre la microbiota digestiva (Catto et al., 2019).

La clasificación de la microscopia diagnóstica se muestra en el Cuadro 6 y las tinciones o fluorocromos para observar la muestra se detallan en el Cuadro 7.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Cuadro 6. Tipos de microscopía

Tipos de microscopía			
Técnica	Fundamento	Ventajas	Desventajas
Óptica	La células se tiñen aumentando el contraste.	La más usada en pruebas biológicas, relativamente económica.	Requiere de una tinción anterior a la observación.
De campo brillante	Las células se observan sin teñir, resaltando partes naturalmente coloreadas.	No requiere tinción previa, es posible observar microorganismos vivos.	Se requiere un ojo entrenado para identificar las estructuras.
De campo oscuro	La luz se intensifica en forma de cono sobre el objetivo.	Permite ver el detalle de ciertas estructuras celulares. No requiere de tinción previa.	
En contraste de fase	La luz se intensifica con un cono hueco sobre un objeto y se usa un anillo que reduce la intensidad de la luz provocando un cambio de fase en un cuarto de longitud.	No se requiere tinción previa, tiene mejor definición que en las técnicas anteriores.	Se requiere un ojo entrenado y es más caro que en las técnicas anteriores.
Diferencial de contraste de interferencia	Dos rayos de luz polarizada, la célula proyecta una sombra lateral lo que permite observar relieves de las células.	El detalle obtenido supera a las técnicas anteriores, con o sin tinción. Pueden observarse células viables.	El equipo es más costoso y es necesario capacitación especialidad para su uso e interpretación.
De fluorescencia	Un fluorocromo marca a la célula objetivo y el microscopio posee una lámpara especial que excita dicha molécula, por medio de un filtro se puede observar la célula marcada.	Permite diferenciar microorganismos y estructuras específicas una vez marcadas.	Depende de la especificidad del fluorocromo y del correcto marcaje de la muestra.

Confocal	Un láser escanea la célula produciendo múltiples imágenes bidimensionales que posteriormente, se unen en un objeto tridimensional por medio de un software.	Mayor resolución. Estructuras en modelo tridimensional. Análisis por estrato de la imagen.	Se requiere capacitación. El costo del equipo es elevado.
Electrónica de transición	Un haz de electrones es proyectado sobre cortes ultra finos de la célula. Algunos electrones atraviesan, otros rebotan y otros son absorbidos resultando en imágenes con un aumento de un millón de veces	Resolución de un millón de aumentos Fácil interpretación Puede o no estar teñida la muestra	Requiere un corte previo de las células a observar Costo elevado y se requiere capacitación
Electrónica de barrido	Un haz de electrones escanea la superficie de la célula, dispersándose o creando electrones secundarios que producen una imagen tridimensional de la superficie del objeto.	Las imágenes en tres dimensiones, alta resolución. No requiere corte previo	Costo elevado y se requiere capacitación

(Vázquez et al., 2010).

Cuadro 7. Clasificación de tinciones usadas en la microscopía.

Clasificación de tinción usados en microscopía				
Técnica	Fundamento	Tipo de fijación	Tipo de tinción	Microscopía aplicable
Gota pendiente	Observación de microorganismos in vivo sin tinción. Evalúa movimiento de microorganismos.	Ninguno.	No aplica.	Contraste de fase y diferencial de contraste de interferencia.
Tinción de cápsula o tinta china	La cápsula evita que las estructuras celulares se tiñan y permite observar siluetas celulares.	Por calor.	Simple negativa.	Óptica, de campo brillante, de contraste de fase.
Tinción rosa de Bengala o azul de metileno	Tinción por un solo colorante básico (azul de metileno) o ácido (rosa de Bengala).		Simple, positiva.	
Tinción de Gram	La técnica detecta la presencia de peptidoglicanos, este elemento retiene el cristal violeta y presentan un color azul, células negativas presentan un color rosado.		Compuesta, diferencial.	Óptica.
Tinción de Writh				

Tinción de Giemsa	Se derivan del fundamento Romanowsky, donde los colorantes se unen a elementos básicos y ácidos en la célula permitiendo su observación.			
Tinción ácido-alcohol resistente	Se fundamenta en la resistencia de las células a ácidos y alcoholes debido a un alto contenido lipídico en la pared celular.			
Tinción Schaeffer Fulton o verde malaquita	La tinción permite observar endosporas. El colorante verde malaquita más calor colorea la endospora y la safranina tiñe el resto de la célula.			
Tinción azul algodón de lactofenol	El fenol inactiva la descomposición, el ácido láctico preserva estructuras y el azul de algodón tiñe el citoplasma y la quitina de hongos.	Por impronta.	Compuesta positiva.	Óptica.
Marcaje para fluorescencia	La técnica consiste en marcar células o estructuras celulares con uno o varios fluorocromos.	Por secado a temperatura ambiente.	Compuesta positiva o diferencial.	De fluorescencia.

(Tortora et al., 2007; López et al., 2014)

2.2.5.2. Métodos de estudio molecular

El estudio de la ecología microbiana comenzó haciendo uso de las técnicas clásicas de la microbiología (ver en sección 2.2.5.1), pero sus limitaciones y la complejidad de las comunidades microbianas que conforman el microbioma dan poca información o mal interpretada. Sin embargo, el descubrimiento del ADN por Watson y Crick en 1950 y el desarrollo del PCR por Kary Mullis, a mediados de 1980 (Tamay de Dios et al., 2013), se desarrollaron múltiples técnicas para el estudio y clasificación de microorganismos que no pueden ser cultivados o analizados con los métodos clásicos de microorganismos que no pueden ser cultivados (Dahm, 2005).

El estudio de la ecología microbiana hace uso de numerosas herramientas y técnicas moleculares debido a los alcances y limitaciones de las mismas (Cuadro 8). Por lo general se requiere de más de una técnica molecular para estudiar a profundidad un nicho micro ecológico como el que se encuentra en el tracto gastrointestinal (Zoetandal et al., 2004; Fraher et al., 2012; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018).

Cuadro 8. Técnicas moleculares usadas en el estudio del microbioma y la microbiota gastrointestinal

Técnicas moleculares en estudios de ecología microbiana no basados en la secuenciación				
Técnica	Fundamento	Equipo	Ventajas	Desventajas
PCR	La amplificación en cadena de la polimerasa produce millones de copias de un fragmento del ADN permitiendo la visualización por electroforesis.	Termociclador.	Económico, interpretación sencilla.	Cualitativa, muestras ambientales contienen elementos que interfieren con la reacción de la polimerasa.
Quantitative PCR (qPCR)	La amplificación de cada producto de la reacción de la polimerasa es registrada en cada ciclo de la prueba por la integración de un fluorocromo.	Termociclador, detector de fluorescencia.	Cualitativo cuantitativo, identificación filogenética.	Laborioso, difícil de interpretar. Depende una curva estándar.
DGGE, TGGE, TTGE	La electroforesis desnaturalizante consiste en la separación de fragmentos de ADN de entre 200 a 700 pb. La ruptura es más rápida a menor uniones G-C.	Sistema de electroforesis en gel, foto documentador.	Rápido, semi cuantitativo, el material genético es recuperable.	Requiere de un PCR previo. Uso de un cluster que evita la separación completa de los fragmentos.

RISA	El análisis del espacio intergénico ribosomal (RISA por sus siglas en inglés), se fundamenta en la amplificación del espacio entre los genes ribosomales.	Termociclador, sistema para gel de electroforesis.	Sencillo, semi cualitativa y semi cuantitativa. Produce matrices.	De fácil contaminación, programas informáticos para identificación. Depende del PCR.
ARISA	El análisis del espacio intergénico ribosomal automatizado es la automatización de la técnica RISA, elimina visualización manual.	Termociclador, electroforesis capilar, detector de fluorescencia.	Cualitativa, cuantitativa.	Alto costo, depende del PCR.
T-RFLP	La restricción terminal de la longitud del fragmento polimórfico consiste en amplificación por PCR, marcaje de fragmentos con fluorocromo en la parte 5', digestión por enzimas de restricción y separación de fragmentos por electroforesis.	Termociclador, detector de fluorescencia y equipo de computo.	Cualitativa y cuantitativa, mayor sensibilidad y especificidad.	Costo elevado, algunos fluorocromos se pierden en la separación de los fragmentos.
SSCP	El análisis de la conformación de polimorfismos en cadena simple es la amplificación y la separación de la doble cadena por electroforesis y los cambios o mutaciones afectan la distancia que recorren.	Termociclador, sistema para electroforesis.	Rápido, sencillo, permite observar cambios en el microbioma de una muestra.	Depende del PCR, semi cualitativo, semi cuantitativo, la estandarización de la temperatura es laboriosa.

FISH	La hibridación fluorescente in situ es la unión de una sonda marcada con un fluorocromo a una sección específica del genoma. La lectura puede realizarse con un microscopio o con un citómetro.	Microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo de fluorescencia.	No se requiere PCR, permite la identificación filogenética.	Depende de la especificidad de la sonda diseñada, la muestra puede interferir con la sonda.
Dot-blot hybridization	La hibridación de sonda de mancha es la unión de una sonda al fragmento de ADN fijo en membrana de nitrocelulosa. La sonda es detectada por un anticuerpo marcado y detectado por cromatografía o electroforesis.	Cromatógrafo o sistema de electroforesis.	No requiere de un PCR, cualitativa, semi cuantitativo.	Diseño de sondas específicas, laborioso, muestra puede interferir con la unión de la sonda.
Diversity microarrays	Los microarreglos son placas de cristal o silicio con microporos con sondas para diversos microorganismos, la unión a fragmentos es detectada por fluorescencia o un indicador químico de color.	Equipo para la creación de chips y escaneo de las señales.	Rápidos, permiten la identificación filogenética, no requiere de PCR previo.	Elevado costo, baja especificidad, la muestra puede interferir con la unión de los fragmentos a las sondas.

(Zoetandal et al., 2004; Fraher et al., 2012).

Existen pruebas que poseen poca especificidad en la identificación de organismos como el DGGE, TGGE, TTEG, RISA y T-RFLP, pero proveen información de fácil contraste y comparable entre 2 o más grupos de estudio (Marsh et al., 2000; Nocker et al., 2007; Fukuda et al., 2016). Por lo que son usadas como pruebas tamiz en dichos estudios.

El análisis del espacio intergénico ribosomal automatizado (ARISA por sus siglas en inglés) es como su nombre lo indica, la automatización de la técnica RISA, elimina el error humano en la visualización de sustituyendo el gel de electroforesis clásico, obteniendo así un perfil microbiano mediante la separación electroforética de productos de PCR marcados con fluorescencia y la posterior detección por un láser sensible en un sistema de secuenciación automatizado. De esta manera es posible detectar cambios de tamaño desde las 400pb hasta 1200pb (Fisher y Triplett 1999, Nocker et al., 2007).

El T-RFLP da una mejor comprensión de la microbiota presente en matrices complejas como la digestiva, al poder identificar las comunidades microbianas con mayor precisión y clasificarlas con una diferencia de 1 o 2 nucleótidos, apoyándose en la información previamente generada en la secuenciación del gen 16s (Marsh et al., 2000). De hecho, al compararlo con la técnica de secuenciación de nueva generación, tiene un desempeño muy parecido y de identificación comparable con la secuenciación, teniendo solo como desventaja el alto costo de la técnica (De la Fuente et al., 2014).

Para el estudio de comunidades microbianas, por lo general se amplifican regiones del gen 16s, las cuales presentan gran variabilidad en su secuencia, esta técnica es relativamente sencilla de aplicar en laboratorios de tipo I proporcionando una diferenciación entre muestras, con la posibilidad de identificar las bandas de mayor interés por medio de la secuenciación. No obstante, cuando la variación es en la abundancia estas técnicas no lo pueden detectar en comparación con otras técnicas como la qPCR (Zeng et al., 2015).

Las sondas para el qPCR se dividen en tres y todas se basan en el principio de fluorescencia de resonancia por transferencia de energía (FRET por sus siglas en inglés). Requiere del intercambio de energía entre un donador y un aceptor que cuando se encuentran juntos se inhibe la fluorescencia y se activa cuando se alejan (Costa, 2004; Tamay de Dios et al., 2014).

La sonda de hidrólisis requiere del efecto de la exonucleasas del ADN polimerasa y se compone por un oligonucleótido marcado con el fluoróforo en los extremos 5' y 3', que al ser cortado por la exonucleasa en la amplificación se activa la fluorescencia siendo proporcional al incremento de amplicones producidos, el producto comercial más popular es la TaqMan de Thermo Fisher (Costa, 2004).

En el sistema de sondas de hibridación, se usan dos sondas que se unen a la secuencia de ADN blanco, al aumentar la cantidad de amplicones unidos a las sondas marcadas aumenta la distancia entre el donador y el aceptor lo que incrementa la fluorescencia, los productos más usados con este fundamento son SYBR Green de Applied Biosystems y TaqMan de Thermo Fisher (Cuadro 9).

Las sondas de horquilla son las más específicas, ya que solo son fluorescentes al unirse a la secuencia de ADN de interés, debido a su diseño en forma de horquilla colocando el donador y el aceptor en cada extremo, las sondas más populares son: molecular Beacons, Scorpions, Sunrise primers y LUX primers (Aguilera et al., 2014; Ruijter et al., 2014).

La técnica de qPCR ha sido usada en estudios de diversidad bacteriana cuando se conoce el núcleo microbiano de la muestra analizada, ya que se requieren primers específicos para la identificación de grupos o especies microbianas. No obstante, una de las limitaciones que tiene dicha técnica es el diseño de los primers, ya que frecuentemente se usan cultivos puros para su validación y pueden no comportarse de la misma manera en una muestra ambiental. Por otra parte, la obtención de la curva estándar se realiza con cultivos puros de cada microorganismo de interés, lo que puede no corresponder con el número de ciclos necesarios en la muestra ambiental. Aunado a esto, por lo general se usa SYBR Green por las ventajas que tiene sin tomar en cuenta las desventajas sobre todo en estudio de muestras complejas formadas por diversas comunidades microbianas que se asemejan genéticamente (Collado et al., 2009, Zeng et al., 2015).

Cuadro 9. Comparación entre las sondas más populares en qPCR: SYBR Green y TaqMan

Comparación SYBR Green vs TaqMan		
	SYBR Green	TaqMan
Especificidad	Media.	Alta.
Reproductibilidad	Media.	Alta.
Uso en amplificación de 2 genes en la misma reacción (Multiplexing)	No.	Si.
Ensayos pre-diseñados comerciales	No.	Si.
Expresión de genes	Bajo nivel de cuantificación.	Alto nivel de cuantificación.
Aplicaciones	Expresión de genes. Detección de patógenos. Inmunoprecipitación de la cromatina.	Expresión de genes. Detección de patógenos. Inmunoprecipitación de la cromatina. Genotipificación. Análisis de vías. Análisis de microRNA. Detección de mutaciones. Análisis de proteínas. Multiplexing.

(ThermoFisher, 2015)

2.2.5.3. Secuenciación

2.2.5.3.1. Definición

La secuenciación se define como el proceso molecular para descifrar la serie de nucleótidos (adenina, citosina, timina y guanina) contenidos en las moléculas de ADN modelo, que se puede hacer usando diversas tecnologías (Clavel et al., 2016; Garrido et al., 2017).

2.2.5.3.2. Método de degradación química (Maxam y Gilbert)

El método de degradación química fue desarrollado en 1977 por Allan Maxam y Walter Gilbert (Maxam y Gilbert, 1977), también es conocido como degradación del ADN de forma química, por corte de dimetil sulfato, hidracina y piperidina, estas sustancias tienen un efecto específico en las uniones de los ácidos nucleicos y al aplicar calor promueven la ruptura de dichos enlaces liberando a los ácidos nucleicos en 4 patrones específicos: guanina, adenina+guanina, citocina+timina y citocina. Cada uno de los patrones genera una banda en un gel de acrilamida. Estas bandas son visibles por medio de un marcador radioactivo (Maxam y Gilbert, 1977). La ventaja principal de esta técnica es la secuenciación desde el primer nucleótido a diferencia de la secuenciación Sanger (Kraus y Tahara, 1993). La desventaja radica en la visualización de fragmentos de más de 250 pb, ya que en el gel de acrilamida no es posible separarlos con claridad (Sanger y Coulson, 1978).

2.2.5.3.3. Método de degradación enzimática (Sanger)

Esta técnica fue desarrollada en los años 70, por Frederik Sanger y también es conocida como el método de terminadores de cadena. Para este método es necesario tener cuatro elementos: un ADN molde, una enzima (ADN polimerasa) cuya función es la unión de nucleótidos a la cadena, un iniciador o primer donde se unirán los nucleótidos y nucleótidos modificados (ddA, ddG, ddC, ddT), lo que resulta en fragmentos de diversos tamaños los cuales se separan en un gel de electroforesis (Garrido et al., 2017, Song et al., 2018). Esta técnica es considerada la primera generación de secuenciación y de su principio se desarrollaron los métodos de segunda y tercera generación (Ambardar et al., 2016). La ventaja principal es secuenciar fragmentos de más de 300 pb con un alto rendimiento; sin embargo, este rendimiento disminuye en trastornos genéticos heterógenos (Rodríguez y Armengol, 2012).

2.2.5.3.4. Secuenciación masiva

A partir de la secuenciación de Maxam y Gilbert y la secuenciación de Sanger, se desarrollaron nuevas técnicas. La segunda y tercera generación de secuenciación se enfocó en la cantidad de microorganismos secuenciados en un solo ensayo y la velocidad de análisis.

2.2.5.3.4.1 Plataformas de segunda generación

Todas la plataformas que pertenecen a esta generación requieren de dos pasos: la preparación del molde o template y consiste en: la extracción del material genético (DNA o RNA) obteniendo material genético en buena cantidad, de alta calidad y con el menor número de sustancias contaminantes (Ambardar et al., 2016, Oulas et al., 2015).

Posteriormente se construyen librerías de fragmentos de 150 a 800 pb por medio de: sonicación, cocteles de endonucleasas no específicas o el método por transposasas. Se eliminan los fragmentos más pequeños de 150 pb y se agrega el iniciador (Oulas et al., 2015, Garrido et al., 2017). Los fragmentos se unen a una superficie solida (perlas de cristal, superficies de iones o celdas de flujo) de 2 formas (Figura 7, Metzker, 2010).

La pirosecuenciación hace uso de PCR por emulsión o emPCR que es la dilución y compartimentación de moléculas de plantilla en gotas de agua en una emulsión de agua en aceite. Cada gota contiene una molécula plantilla única y funciona como un reactor de micro-PCR. Illumina usa un PCR de puente en este caso la superficie de la celda de flujo está recubierta con oligonucleótidos monocatenarios que corresponden a las secuencias de los adaptadores, los fragmentos se unen a la superficie de la celda y por acción de la polimerasa se produce un fragmento de extremo libre formando "puentes" con un oligo complementario en la superficie (Metzker 2010, Ambardar et al., 2016, Garrido et al., 2017).

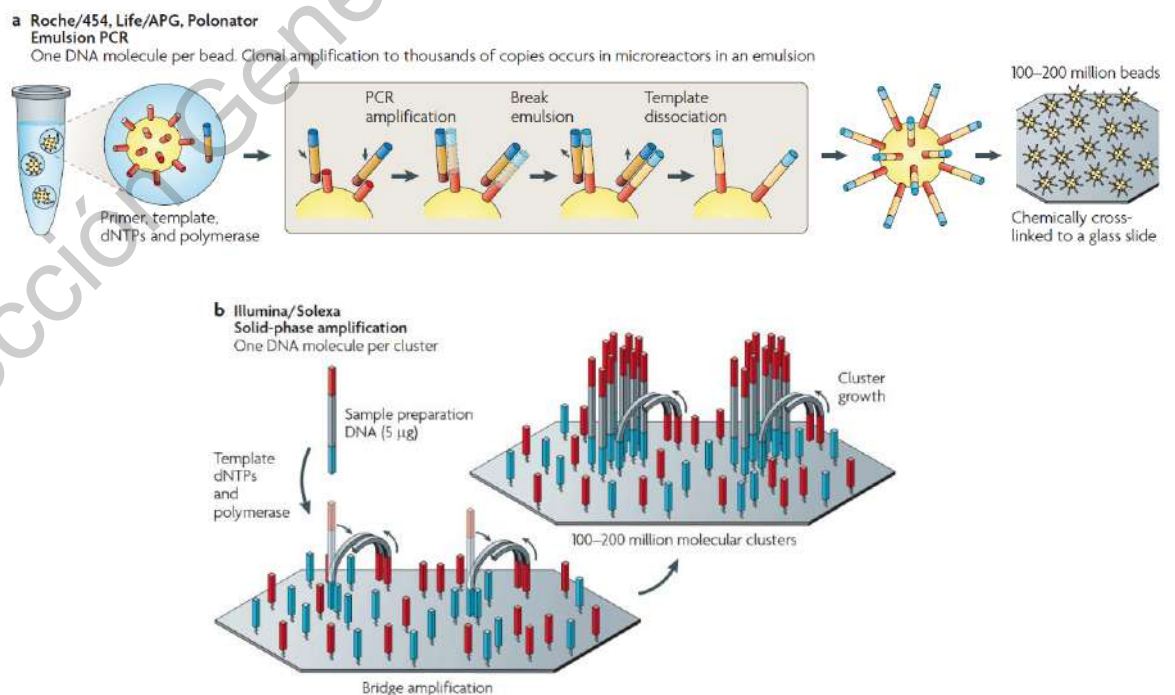


Figura 7. emPCR (a) y PCR de puente (b): se muestran los tipos de PCR usados en la amplificación del molde o template (Metzker, 2010).

Al finalizar la amplificación clonal de los templates de DNA, el siguiente paso es la secuenciación, existen dos métodos: por síntesis y por hibridación y ligación.

La secuencia por síntesis se divide en:

Pirosecuenciación: el template está unido a una placa de picotitre y la amplificación es por emPCR. El pirofosfato (PPi) liberado durante la reacción de polimerización se convierte en ATP por la acción de la sulfurilasa. En presencia de ATP, la luciferasa convierte la luciferina en oxiluciferina que genera luz visible. La luz producida por la reacción se detecta y mide mediante un fotodiodo de avalancha, un tubo fotomultiplicador o una cámara con dispositivo de carga acoplada (Metzker, 2010; Garrido et al., 2017)

La secuenciación por terminación reversible: Este método requiere una fijación en celda de flujo y amplificación de template por medio de PCR de puente. Este método usa nucleótidos de terminación reversible y que están marcados con fluorescencia. La ADN polimerasa incorpora nucleótidos modificados a la cadena en síntesis libera la señal de fluorescencia, un color para cada base. La competencia natural entre los cuatro nucleótidos presentes durante cada ciclo de secuenciación reduce el error que causan los homopolímeros (Garrido et al., 2017; Metzker, 2010).

La secuenciación por detección de iones de hidrogeno: El método se basa en el registro de iones liberados al momento de la incorporación del nucleótido y no depende de bases alteradas, enzimas o detección óptica. El DNA de plantilla se une a las partículas de esfera iónica en un micro pozo. Cada pozo contiene una sola partícula de esfera iónica y se agrega un solo tipo de dNTP detectándose la liberación de iones de hidrógeno. El ion activa un transmisor de efecto de campo sensible a iones, el cambio en el pH se detecta mediante una capa de detección y se traduce en una señal digital, medida en segundos (Metzker 2010, Garrido et al., 2017). En comparación con otros métodos de secuenciación, donde la detección es indirecta usando escáneres láser o cámaras, la detección en este método es independiente y, directa (Oulas et al., 2015).

La secuenciación por hibridación y ligación depende de la especificidad de la DNA ligasa en lugar de la DNA polimerasa. El DNA a secuenciar se une a perlas y se amplifican por

PCR. Esto se deposita en una placa de vidrio donde las perlas se unen de forma covalente. El método requiere la hibridación y ligadura de varias sondas codificadas con una o dos bases de ocho o nueve bases y constan de una o dos bases seguidas de tres bases degeneradas y tres bases universales que están unidas al marcador fluorescente. Las sondas se unen con los iniciadores por la acción de la ADN ligasa y se detectan mediante la fluorescencia mientras que las sondas no ligadas se lavan. (Metzker, 2010; Ambardar et al., 2016).

La elección de la plataforma de secuenciación en un estudio de la microbiota debe estar acorde con la naturaleza del objetivo. Las diversas plataformas presentan ventajas y desventajas (Cuadro 10). No obstante, la segunda generación de secuenciación es hasta el momento la más usada en estudios de microbioma. Esto permite la comparación entre estudios con diversas necesidades (Metzker, 2010; Ambardar et al., 2016; Garrido et al., 2017; Song et al., 2018).

Cuadro 10. Comparación entre las plataformas de segunda generación de secuenciación.

Comparación de plataformas de secuenciación de segunda generación						
Plataforma	Tipo de secuenciación	Tamaño de lectura	Rendimiento	Porcentaje de errores	Ventajas	Desventajas
Roche 454.	Pirosecuenciación.	330-600	450MB.	1	Lecturas de gran tamaño, rápido.	Gran cantidad de errores, alto costo, bajo rendimiento, venta descontinuada.
Illumina	Secuenciación por terminación reversible.	75-300	15Gb.-1.8Tb.	0.26-0.8	Bajo costo por Gb, alta precisión, alto rendimiento, la plataforma más usada en estudios de microbioma.	Lecturas cortas, lento, equipo de alto costo.
Ion Torrent	Secuenciación por detección de iones de hidrogeno.	200	1.22-2G.b	1.78	Bajo costo, rápido, equipo fácil de operar.	Gran cantidad de errores, lecturas cortas.
SOLiD	Secuenciación por hibridación y ligación.	35-75	160Gb.	0.01	Alta precisión y alto rendimiento.	Alto costo, lento, lecturas cortas.

(Metzker, 2010; Ambardar et al., 2016; Garrido et al., 2017; Song et al., 2018)

2.2.5.3.4.2. Plataformas de tercera generación

El avance en las tecnologías de secuenciación dio como resultado nuevos secuenciadores. Las mejoras consisten en: eliminar la necesidad del uso de programas bioinformáticos para el ensamblaje y el sesgo de la PCR al momento de la detección e identificación de la base secuenciada.

La verdadera secuenciación de una sola molécula (tSMS por sus siglas en inglés), el ADN objetivo se le adiciona una cola poli adeninas (dA). La cola de poli A se emparejan con millones de poli tiaminas (dT) -oligonucleótidos anclados a un cubreobjetos de vidrio. La secuencia de cada fragmento se determina agregando nucleótidos con el mismo fluoróforo de cianina Cy5. Cada unión de nucleótidos se graba en imágenes con una cámara para obtener secuencias de 30 bases de largo para cada fragmento de cola poli (dA) emparejado (Gupta 2008).

La secuenciación de una sola molécula en tiempo real consiste en la fijación de la polimerasa (proveniente del bacteriófago f29) en nano pozos de la guía de onda de modo cero. El complejo formado por un ADN objetivo y un iniciador con fluoróforos (cada base un color) se adiciona a cada pozo. Una cámara de detección de fluorescencia de longitud específica en tiempo real registra la fluorescencia de cada nucleótido unido (Korlach et al., 2010).

La secuenciación de una sola molécula por nanoporos lee la incorporación de nucleótidos, a medida que la secuencia de ADN pasa a través de un nanoporo proteicos incrustados en una membrana polimérica.. Los poros tienen un diámetro interno de 1 nm, la conductancia eléctrica del poro se altera y se registra dicha señal (Garrido et al., 2017; Ambardar et al., 2016; Gupta, 2008).

La secuenciación de hibridación y ligadura se basa en la construcción de la biblioteca insertando cuatro adaptadores de aproximadamente 70 bases dentro del ADN objetivo a intervalos regulares. Se conoce como tecnología de ligación combinatoria de la sonda de anclaje y da como resultado una mayor longitud de lectura. La amplificación clonal da como resultado grupos de ADN denominados nano-esferas de ADN que se producen en una sola reacción. El ADN amplificado clonalmente en nano-esferas promueve una mejor secuenciación superando las tres limitaciones de SOLiD: longitud de lectura corta, error

en la precisión de la secuenciación de base repetitiva y análisis de secuencia (Next Gen Seek 2012).

Las tecnologías anteriormente mencionadas fueron desarrolladas por diversas compañías (Cuadro 11), así como las de segunda generación de secuenciación, la tercera generación presenta ventajas y desventajas que deben ser consideradas acorde a las necesidades y alcances de cada estudio.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Cuadro 11 Comparación entre las plataformas de tercera generación de secuenciación.

Plataformas de tercera generación de secuenciación						
Plataforma	Tipo de secuenciación	Tamaño de lectura	Rendimiento	% de errores	Ventajas	Desventajas
Heicos Biosciences.	Verdadera secuenciación de una sola molécula.	25	35Gb.	0.5	Alto rendimiento, alta precisión.	Lectura corta, costo elevado.
Pacific Biosciences.	Secuenciación de una sola molécula en tiempo real.	10-40kb	2-20G.b	13-15	Rápido, gran tamaño de lectura.	Falta de programas bioinformáticos para el análisis, poco preciso.
Oxford Nanopor Technologies (MinION).	Secuenciación de una sola molécula por nanoporos.	200kb	5Gb.	38.2	Portátil, económico, poca mano de obra.	Equipo se un solo uso, la precisión mas baja de las plataformas de secuenciación.
Complete Geqnomics.	Secuenciación de hibridación y ligadura.	70b	10Gb.	1	Supera las deficiencias de su predecesor SOLiD.	Alto costo, lectura corta en comparación a las plataformas de las misma generación.

(Gupta, 2008; Ambardar et al., 2016; Garrido et al., 2017).

2.2.5.4. Herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación masiva en plataformas de segunda generación deben ser procesados por programas bioinformáticos. Esto consiste en la limpieza, el ensamblaje y la identificación de las secuencias obtenidas. A este proceso se le conoce como análisis bioinformático.

La variedad de procesos bioinformáticos se muestra en la figura 8, los cuales se pueden aplicar a los datos generados por la secuenciación, la elección del camino a seguir depende del tipo de estudio y si la secuenciación fue de un genoma entero, un gen o una sección de un gen como la región V3-V4 del gen ribosomal 16s. En esta sección se abordarán algunos de los soportes informáticos de acceso libre más usados para el análisis metataxonómico de la microbiota.

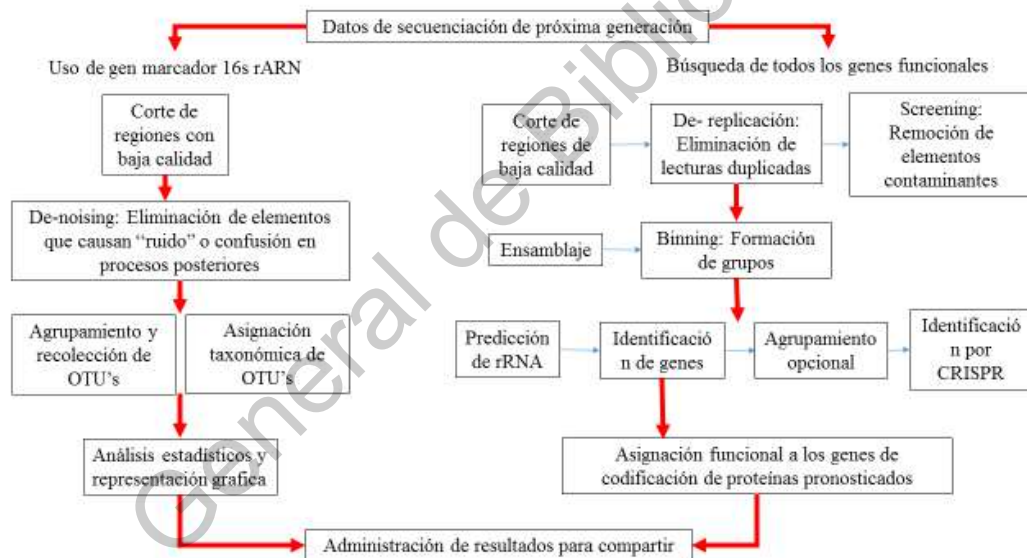


Figura 8. Diagrama de flujo de pasos de metagenómica básica actualmente en práctica. (Modificado de Oulas et al., 2015).

2.2.5.4.1. Estudio metataxonómico

La microbiota es una parte del microbioma de un ecosistema específico el cual puede ser identificado por medio de la secuenciación de una fracción o todo el gen de la subunidad pequeña del ribosoma 16s debido a que todas las bacterias y archaeas lo presentan en su genoma (Suárez, 2017) y para obtener la mayor eficiencia en el uso de plataformas de secuenciación de segunda generación, se elige una sección de dicho gen que contenga una zona conservada y una zona variable (Song et al., 2018). De esta forma obtendremos

un fragmento relativamente pequeño (400 a 500 pb en el caso de la región V3-V4) que proporcionará suficiente información para la identificación de los integrantes de cada comunidad, pudiendo discernir entre estratos de dominio y phylum hasta nivel de género y en algunos casos especie, así como su abundancia (Deurenberg et al., 2016, Song et al., 2018).

Las secuencias crudas son procesadas, esto incluye el control de calidad, la eliminación de secuencias quiméricas y posterior agrupamiento de las secuencias por características de similitud y solapamiento (clustering). Posteriormente, se procede a la asignación taxonómica y el análisis estadístico para determinar las diferencias significativas comparadas con la secuencia de referencia las cuales están contenidas en bases de datos como SILVA, Greengenes, Ribosomal Database Project, NCBI BLAST y Unite (Oulas et al., 2015, Deurenberg et al., 2016, Song et al., 2018).

El procesamiento de estos datos se lleva a cabo por medio de distintas plataformas informáticas y cada una tiene su compendio de programas para cada paso (Suárez, 2017), a continuación, se describirá brevemente las plataformas más usadas en los estudios metataxonómicos.

2.2.5.4.1.1. Plataforma R statistics (Rstudio vista moderna)

La plataforma R statistics está disponible como Software libre bajo los términos de la Licencia pública general GNU de la Free Software Foundation en forma de código fuente. Compila y se ejecuta en una amplia variedad de plataformas UNIX y sistemas similares (incluidos FreeBSD y Linux), Windows y MacOS y posee varios lenguajes para estadística y gráficos en sistemas computacionales, nace como un proyecto GNU que es similar al lenguaje S que fue desarrollado en los Laboratorios Bell (anteriormente AT&T, ahora Lucent Technologies) por John Chambers y sus colegas (The R Foundation 2019). Se considera que R es un sistema estadístico, no obstante, es un entorno dentro del cual se implementan técnicas estadísticas que se pueden extender fácilmente a través de paquetes (The R Foundation 2019).

La plataforma R proporciona una amplia variedad de técnicas estadísticas (modelos lineales y no lineales, pruebas estadísticas clásicas, análisis de series de tiempo, clasificación, agrupamiento, etc.) y gráficas, y es altamente extensible. Una de las fortalezas de la plataforma R es la facilidad con la que se pueden producir trazados bien

diseñados con calidad de publicación, incluidos símbolos matemáticos y fórmulas cuando sea necesario. Se ha tenido mucho cuidado con los valores predeterminados para las elecciones de diseño menores en gráficos, pero el usuario conserva el control total (The R Foundation 2019).

2.2.5.4.1.2. Plataforma Mothur

La plataforma Mothur fue iniciada por el Dr. Patrick Schloss y su equipo de desarrollo de software en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Michigan.L. Los cuales buscaban desarrollar un solo software de código abierto y expansible para satisfacer las necesidades bioinformáticas de la comunidad de ecología microbiana. Esta plataforma es un compendio de diversas herramientas para el cálculo y análisis de secuencias genéticas (Schloss et al., 2009). Cada una de estas herramientas hace uso de diversos algoritmos de forma libre en independiente y flexible. En febrero de 2009 se lanzó la primera versión de Mothur, que tenía versiones aceleradas de los populares programas DOTUR y SONS. Desde entonces, se ha ido agregando funcionalidad a partir de una serie de otras herramientas populares. Actualmente, Mothur es la herramienta bioinformática más citada para analizar las secuencias del gen ribosomal 16s ya que puede procesar datos generados por las plataformas de secuenciación Sanger, PacBio, IonTorrent, 454 e Illumina (MiSeq / HiSeq) (Schloss 2017).

2.2.5.4.1.3. Plataforma Galaxy

Galaxy es un sistema de flujo de trabajo científico, que proporciona un medio para construir análisis computacionales de varios pasos similares a una receta. Por lo general, proporcionan una interfaz gráfica de usuario para especificar qué datos operar, qué pasos se deben tomar y en qué orden hacerlos. También es una plataforma de integración de datos para datos biológicos que admite cargas de datos desde la computadora del usuario, por URL, y directamente desde muchos recursos en línea (como UCSC Genome Browser, BioMart e InterMine); permitiendo la traducción entre estos formatos. Proporciona una interfaz web para muchas utilidades de manipulación de texto, lo que da flexibilidad a los investigadores de hacer su propio reformateo y manipulación personalizados, sin tener que hacer ninguna programación. Muchos formatos de archivos biológicos incluyen datos de intervalo genómico (un marco de referencia, por ejemplo: nombre de cromosoma o contig, y posiciones de inicio y parada), lo que permite que estos datos se integren.

Galaxy se escribió originalmente para análisis de datos biológicos, particularmente genómica. El conjunto de herramientas disponibles se ha ampliado enormemente a lo largo de los años y ahora también se usa para la expresión génica, el ensamblaje del genoma, la proteómica, la epigenómica, la transcriptómica y muchas otras disciplinas en las ciencias de la vida. La plataforma es independiente del dominio y se puede aplicar en teoría, a cualquier dominio científico (Galaxy Community Hub 2019).

2.2.5.4.1.4. Plataforma QIIME

La plataforma de percepciones cuantitativas de la ecología microbiana (QIIME por sus siglas en inglés) es una plataforma que sigue la construcción bioinformática de tubería (pipeline) de código abierto capaz de realizar proceso y análisis de datos crudos a partir de la secuenciación de ADN por plataformas de segunda y tercera generación, esta plataforma informática está diseñada para que el usuario pueda comparar y describir datos de secuenciación sin procesar a través de gráficos y estadísticas de calidad de publicación. Esto incluye la eliminación de errores por filtrado de calidad, selección de OTU, asignación taxonómica y reconstrucción filogenética, y análisis y visualizaciones de diversidad. QIIME se ha aplicado a estudios basados en miles de millones de secuencias de decenas de miles de muestras (Caporaso et al., 2010).

2.2.5.5. Diferencia entre plataformas bioinformáticas para el análisis de secuencias genéticas.

El uso de las unidades taxonómicas funcionales (OTU por sus siglas en inglés) es la forma más común para el estudio de la microbiota. No obstante, en años recientes se han detectado errores, ya que se basa en la agrupación haciendo uso de algoritmos de tamaño de secuencia o alineamiento por pares (Edgar 2010). La secuenciación de un fragmento de un gen que contenga una zona conservada y una hipervariable es solo el primer paso de un estudio metataxonómico, el siguiente paso es la clasificación y asignación de etiquetas de identificación para el posterior cálculo de abundancias y diversidades mencionadas en secciones anteriores, para este proceso es indispensable el uso de programas bioinformáticos que procesarán dicha información. Los programas son variados y poseen características de programación únicas, sin embargo, es posible separarlos en 2 grandes grupos: por agrupamiento o clustering y por asignación taxonómica primaria (Siegwald et al., 2017).

Los programas más comunes en estudios metataxonómicos que usan el método de agrupamiento son Mothur, Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME), Brazilian Microbiome Project (BMP) y MetaGenome Rapid Annotation Subsystem Technology (MG-RAST), los cuales a grandes rasgos realizan la clasificación en dos pasos, el agrupamiento de las lecturas basados en sus similaridad y la asignación taxonómica usando lecturas referenciadas en bases de datos como SILVA y GreenGenes las cuales son bases de uso libre (Trifi et al., 2019, Siegwald et al., 2017, Plummer et al., 2015).

En el caso de los programas más comunes que hacen uso de la asignación taxonómica primaria se encuentran, One Codex, Kraken y Classifier base on Reduced *K*-mers (CLARK), los cuales primero realizan una asignación taxonómica usando diseñadas para estos programas como MiniKraken, RefSeq 71 y OneCodex 28k (en el caso de la última es propiedad de la compañía con el mismo nombre) y posteriormente crea grupos de acuerdo a la etiqueta taxonómica da cada uno (Siegwald et al., 2017).

El método por agrupamiento permite tener varios conjuntos de lecturas que no se encuentren en la base de referencia, sin embargo, esta característica podría juntar dos géneros muy similares en uno sin hacer la discriminación correcta. En el caso del método por asignación taxonómica, esto no ocurre, ya que si estas lecturas se encuentran en la base de referencia se etiquetarán de manera distinta antes de ser agrupadas; pero, en el caso de las lecturas que no se encuentren en dicha base, serán agrupadas todas como no clasificadas sin hacer discriminación por su similaridad (Siegwald et al., 2017).

Debido a la versatilidad que presentan, los métodos que usan el clustering son las más citados en estudios metataxonómicos, como es el caso de Mothur y QIIME. Sin embargo, Mothur presenta un mayor número de errores en comparación de QIIME (8.5 a 9.1% más) (Siegwald et al., 2017), en el caso de la riqueza Mothur la sobreestima (Plummer et al., 2015) en un 234% de incremento y QIIME en un 80%. No obstante, ninguno de los dos afecta el estimador de diversidad de forma significativa (Siegwald et al., 2017).

En la plataforma Rstatistics se desarrolló de forma paralela un complemento que permite reducir los errores que presentan los dos programas anteriores, el algoritmo divisivo eliminador de ruido del amplicon 2 (DADA2 por sus siglas en inglés). Este algoritmo se diseñó originalmente para la plataforma Illumina en su versión MiSeq, pero se puede usar

a los amplicones del gen 16S rARN, aumentando un paso al análisis, la supresión/ de replicación de errores. Lo cual permite aumentar la precisión de identificación en el análisis como se muestra en el Cuadro 12 (Callahan et al., 2016, Allali et al., 2017)

Cuadro 12. Comparación de la precisión de los cinco lenguajes más usados en el análisis metataxonómico.

Secuencias de salida										
			Lecturas de salida (%)	Total	Referencia	Exacto	One off	Otras	Secuencias de referencia	
Balanceada	Forward	DADA2	99.2	93	59	33	1	0	57	
		UPARSE	99.1	81	48	29	2	2	53	
		MED	95.5	86	59	5	22	0	57	
		Mothur	96.3	249	44	25	15	165	49	
		QIIME	99.2	378	51	34	3	290	54	
Fusión	Fusión	DADA2	96.2	87	57	29	1	0	55	
		UPARSE	94.2	76	45	27	2	2	50	
		MED	91.1	64	56	6	2	0	54	
		Mothur	94.1	108	42	27	11	28	47	
		QIIME	94.1	170	45	28	4	93	50	
HMP	Forward	DADA2	95.1	151	23	112	8	8	21	
		UPARSE	96.7	161	20	123	10	8	21	
		MED	80.9	83	23	2	58	0	21	
		Mothur	95.4	849	20	177	47	605	21	
		QIIME	97.4	1375	20	177	60	1118	21	
	Fusión	Fusión	DADA2	92.3	67	23	40	2	2	21
			UPARSE	67.7	94	20	59	2	13	21
			MED	64.8	32	23	3	6	0	21
			Mothur	62.1	121	20	82	9	10	21
			QIIME	67.6	290	20	71	8	191	21
Extrema	Forward	DADA2	99.5	68	26	35	3	4	23	
		UPARSE	99.5	74	21	40	0	13	21	
		MED	86.4	95	16	0	79	0	13	
		Mothur	-	-	-	-	-	-	-	
		QIIME	99.5	3237	20	44	73	3100	20	
	Fusión	Fusión	DADA2	97.6	25	24	1	0	0	21
			UPARSE	69.9	23	18	4	0	1	18
			MED	67.6	32	17	0	15	0	14
			Mothur	94.3	44	23	14	0	7	23
			QIIME	69.9	36	19	8	1	8	19

Para esta comparación se usaron 3 comunidades muestra: una balanceada con 57 bacterias y archaea con identificación equitativa, la comunidad del proyecto del microbioma

humano (HMP por sus siglas en inglés) con 21 bacterias de identificación equitativa y una extrema con 27 bacterias que se diferencian entre sí por un solo nucleótido y abarcan las 5 clasificaciones taxonómicas (Callahan et al., 2016).

Lo anterior demuestra que el uso de DADA2 como algoritmo de identificación y construcción de OTU's presenta una mayor precisión en comparación a los algoritmos usados por los programas QIIME y Mothur. El uso del algoritmo DADA2 junto con la metodología de asignación taxonómica reduce al mínimo el sesgo por error y la falsa identificación de quimeras como grupos microbianos (Callahan et al., 2016).

QIIME2

La plataforma QIIME lanzó una nueva interfaz. QIIME2 permite al usuario la modificación de algoritmos y protocolos preinstalados. La flexibilidad de esta actualización permite que tenga una mayor versatilidad, similar a la de R estadistic. No obstante, R project lanzó una interfaz más amigable para el usuario (R studio) permitiendo al usuario realizar análisis sin la necesidad de realizar modificaciones exclusivamente en comando de línea (Bolyen et al., 2019).

LEfSe (Análisis lineal discriminatorio del efecto tamaño)

El análisis lineal de discriminación de tamaño es una herramienta diseñada para la comparación de microbiomas de grandes dimensiones. La cual se basa en la clase a analizar y la abundancia relativa. El método de comparación de clases se basa en la identificación de marcadores que alcanzan el limite establecido por la abundancia sin hacer diferencia entre máximas y mínimas abundancias. Al aplicar el análisis discriminatorio se agregan las variables algorítmicas del efecto en la variación del tamaño o máximas u mínimas abundancias (Segata et al., 2011). En este análisis se usan los índices: Kruskal-Wallis y Wilcoxon.

2.3. Sistema digestivo del conejo

2.3.1. Anatomía e histología del tracto gastro intestinal del conejo

El conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) es un mamífero herbívoro, originario del continente europeo, donde se encuentra de forma libre y en granjas. El conejo es pequeño y ágil, tiene una gran necesidad energética y proteínica, debido a un metabolismo muy rápido y exigente. Posee un sistema digestivo único, similar a los rumiantes y los caballos

en cuenta a la fermentación de carbohidratos estructurales de origen vegetal (Rees y Rees, 2003). Debido a su tamaño, el conejo debe ingerir comida constantemente y eliminar rápidamente carbohidratos de fermentación lenta, al fraccionar el alimento digerido en dos productos diferentes: el cecotrofo y las heces. Esto le permite eliminar la necesidad de una amplia superficie de absorción intestinal, además, la reingesta de los cecotrofos y su posterior digestión en el intestino logran cubrir sus necesidades proteicas y energéticas (Rees y Rees 2003; Brewer, 2006).

Anatómicamente, el tracto gastro intestinal tiene una longitud entre 4.5 y 5 metros en un conejo adulto y comienza con la cavidad oral, la cual es pequeña en proporción con el conejo, los labios están separados (labio leporino) y tienen una serie de vellos con una alta sensibilidad para detectar el alimento, ya que debido a la posición de sus ojos el conejo no puede ver los objetos a corta distancia (Rees y Rees 2003, Brewer, 2006), posee 3 incisivos (2 arriba uno abajo), sin caninos, 5 premolares (3 arriba y 2 abajo) y 6 molares (3 arriba y 3 abajo), cabe destacar que los incisivos del conejo no dejan de crecer a lo largo de su vida, por lo que es necesario el desgaste por roer. La lengua es larga, en comparación con el tamaño del conejo (Figura 9). Posee 4 pares de glándulas salivales, parótida, submaxilar, sublingual y zigomática. La parótida se localiza desde la base del oído y termina por debajo de la mandíbula, es la de mayor tamaño, su ducto recorre el músculo masetero junto al nervio facial y desemboca en la boca opuesto al último molar. La glándula submaxilar tiene forma de ovalo y se encuentra en el ángulo de la mandibular. La glándula salival más pequeña del conejo es la sublingual, a diferencia de otras especies. La glándula zigomática se encuentra antero ventral de la órbita al ángulo de la órbita ocular, debajo de la glándula lagrimal (Brewer, 2006).

El esófago se encuentra caudal a la boca, el cual está compuesto por tres láminas de músculo estriado semi-voluntario y no presenta glándulas de moco. Este recorre desde la cavidad oral hasta insertarse en el cardias (esfínter que regula la entrada de alimento al estómago), que está altamente desarrollado en el conejo (Brewer, 2006).

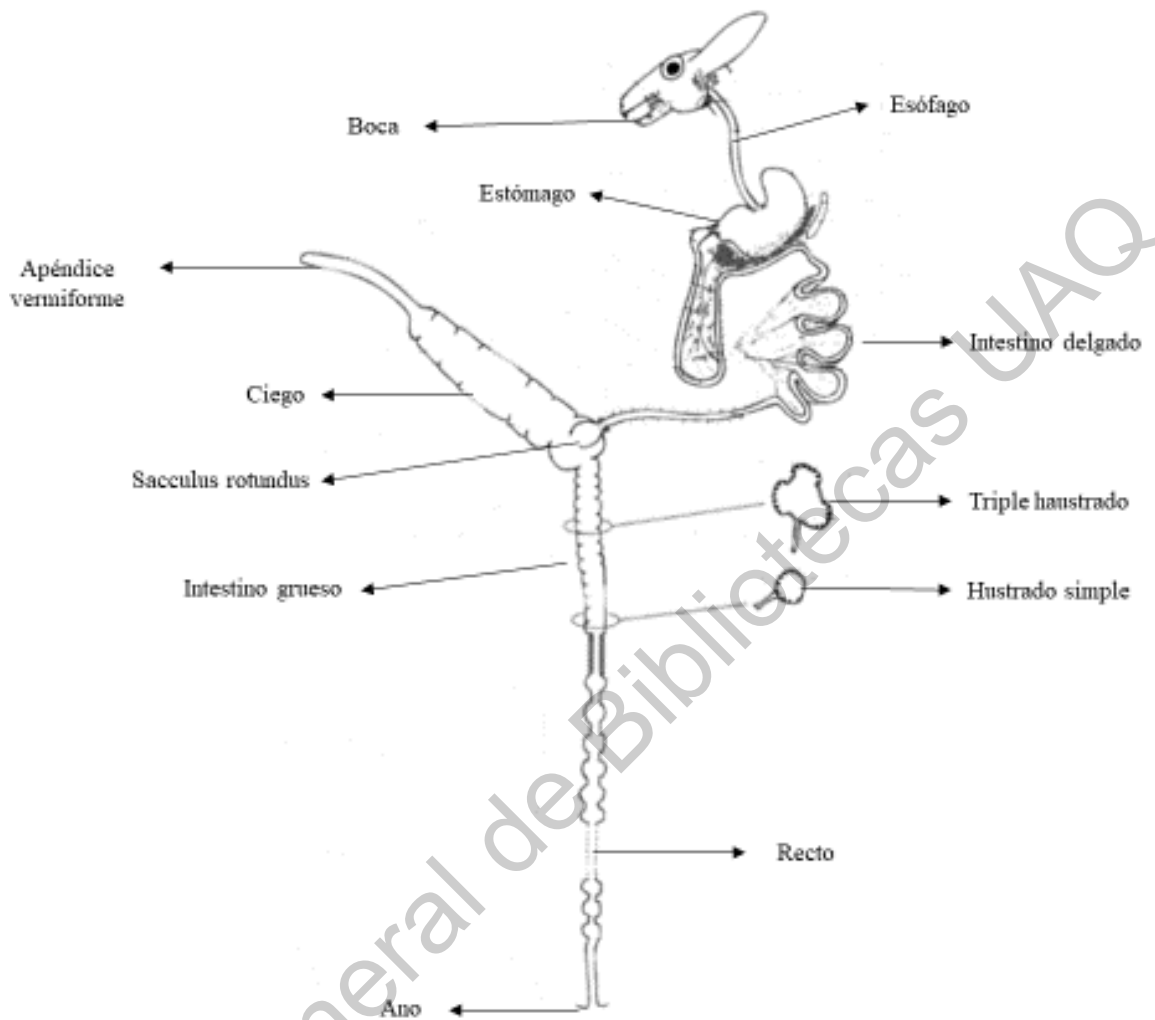


Figura 9. Diagrama del sistema digestivo del conejo. (Modificado de Rees y Rees, 2003)

El estómago del conejo contiene el 15% del volumen total de tracto gastro intestinal (Rees y Rees 2003; Johnson-Delaney, 2006; Brewer, 2006), en la raza Nueva Zelanda puede contener hasta 90 g (Rees y Rees 2003). Hay tres zonas principales, la zona del cardias, el fundus y la zona pilórica. La zona del cardias es amplia, de paredes delgadas que no presenta tejido de secreción y está conformada por un epitelio estriado escamoso, la capa muscular que se presenta en esta zona es una extensión del esófago (Rees y Rees 2003). El fundus la zona de secreción más grande en el estómago del conejo, contiene fosas gástricas de forma lineal conjugadas con células de secreción parietal (Brewer 2006, Johnson-Delaney 2006). La zona pilórica es la que presenta la mayor cantidad de musculo

estriado y al igual que el cardias, el píloro se encuentra fuertemente desarrollado (Rees y Rees 2003, Brewer, 2006).

El intestino delgado representa en el conejo el 12% del total de sistema digestivo, lo que en otras especies puede llegar a ser hasta el 22%, por lo que se considera que el conejo tiene un intestino delgado de longitud reducida (Rees y Rees 2003, Johnson-Delaney 2006, Brewer 2006). El duodeno hace un ángulo agudo con relación al píloro y se localiza cerca del hígado, tiene forma de bucle y rodea al páncreas, en el desembocan en la primera sección las enzimas hepáticas y en la última sección las enzimas pancreáticas (Johnson-Delaney 2006, Brewer 2006). Una particularidad de los conejos, caballos y ratones es la presencia de células de producción de moco y células de producción serosa, localizadas en el duodeno y el yeyuno (Brewer, 2006). Posteriormente, el yeyuno es la sección más larga del intestino delgado y es menos vascularizada en comparación con el duodeno. Además, la capa de filamentos de absorción es menos prominente en comparación de otras especies (Brewer, 2006). En cuanto a la presencia de placas de Peyer, se observa un aumento conforme se recorre hacia caudal, comenzando con un grosor de 3mm en la zona de duodeno y yeyuno, aumentando al comienzo del íleon (Johnson-Delaney 2006, Brewer, 2006). El íleon es la penúltima porción del intestino delgado, la cual contiene una cantidad importante de linfocitos agregados y desemboca en el sacculus rotundus (ámpula ileal), el cual es un órgano único en los conejos con una gran cantidad de folículos linfoides, convirtiéndolo en un órgano de importancia inmunitaria y dándoles una apariencia de panal de abejas (Brewer, 2006). A partir de aquí, el flujo del contenido intestinal es controlado por la válvula íleo-cecal, la cual conecta el íleon, el ciego y el colon, y se encuentra en la última porción del intestino delgado (Rees y Rees, 2003).

El intestino grueso se compone por dos órganos principales: el ciego y el colon. El ciego es grande, representa hasta el 40% del total del volumen gastrointestinal y es el órgano de fermentación en los conejos (Rees y Rees 2003, Johnson-Delaney 2006, Brewer 2006). Las paredes del ciego son delgadas y suaves, sin embargo su superficie de absorción es mayor a su tamaño relativo debido a su forma de espiral, esta característica se ha descrito también en tiburones y rayas (Brewer 2006). El ciego se divide en 3 secciones, la primera es la base del ciego y va de la zona umbilical craneal y cruza a la derecha. La segunda es el cuerpo del ciego y se dobla caudalmente situándose de forma paralela a la base del cuerpo. (Rees y Rees 2003) y termina en el apéndice vermiforme, el cual es un saco sin

salida de unas 12.7 cm de longitud, esta sección presenta una gran cantidad de tejido linfoide y células de secreción (Figura 10) (Johnson-Delaney 2006, Brewer 2006).

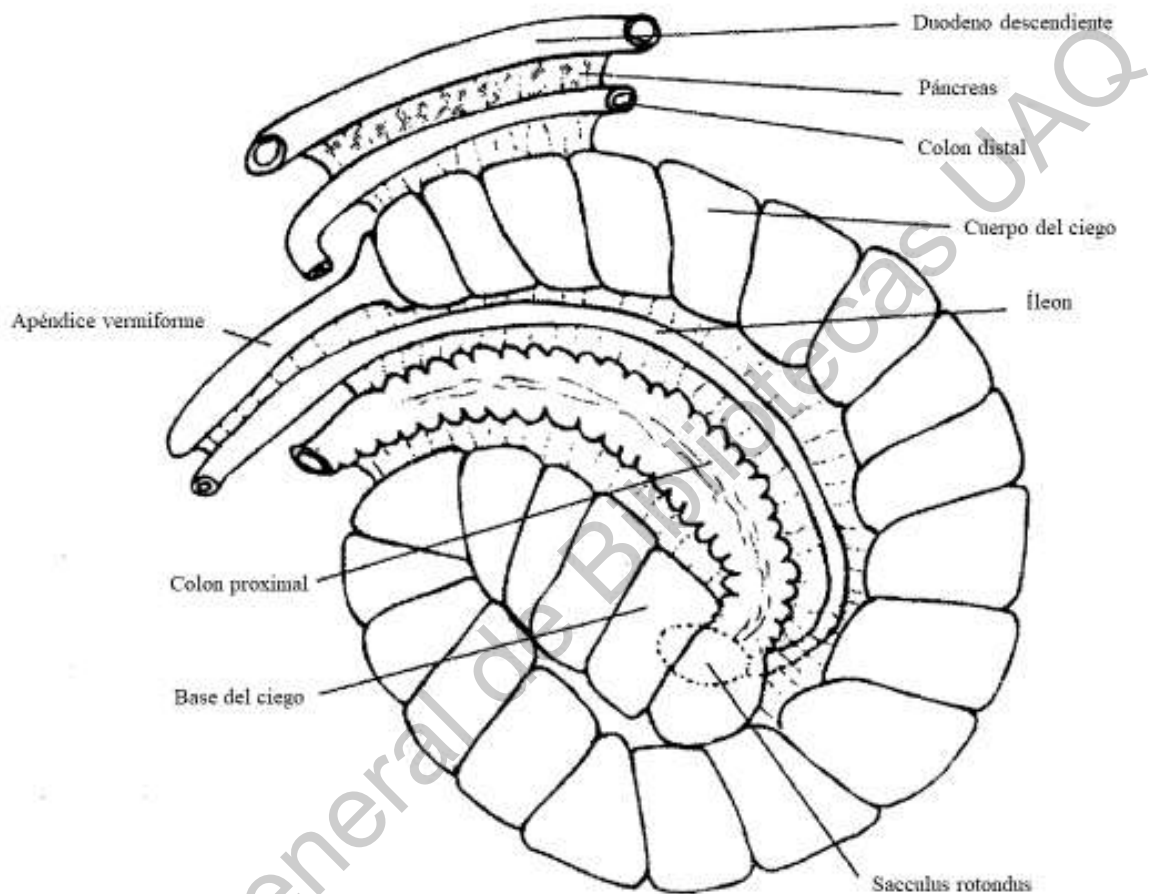


Figura 10. Diagrama del ciego del conejo (Rees y Rees, 2003).

El colon en conejos de raza Nueva Zelanda llega a medir 1 m de longitud, y se divide en la primera sección formada por 3 giros que se extienden hacia delante y 2 giros que se extienden hacia atrás, la característica principal de esta sección es que los 3 primeros giros presentan una formación triplemente haustrada y posteriormente solo se observa una formación simple haustrada (Figura 10), esta característica no se observa en carnívoros (Brewer 2009), la segunda sección lo forman el fusus coli, el colon descendente y el recto. El fusus coli es un órgano único en los lagomorfos, y es el que regula la calidad de los cecotrofos y las heces, mide entre 5 a 8cm contiene una capa de músculo en forma circular engrosado y una capa de mucosa hasta 5 veces más delgada en comparación a la del colon descendente (Brewer 2006). El aspecto del colon en los conejos es blanco, casi transparente

y con una vascularización baja, la capa muscular es más gruesa en comparación con los humanos y la submucosa más delgada. El intestino grueso termina con el colon descendente, y el recto, en el cual no se observan células de Goblet o de Paneth, se observan criptas de Lieberkuhn pero a diferencia del humano, estas no están agrupadas (Rees y Rees 2003, Johnson-Delaney 2006, Brewer 2003).

Las glándulas accesorias del sistema digestivo del conejo son el hígado, el cual es de forma más cilíndrica y presenta 4 lobulaciones y el páncreas el cual es difuso e irregular, localizado en el piso del peritoneo y se asocia al colon transversal, el estómago y el duodeno. Estas glándulas vierten sus productos en el duodeno, a diferencia de los caballos, los conejos si presentan vesicular biliar y se localiza en la depresión caudal del lóbulo derecho anterior (Brewer 2006).

2.3.2. Fisiología del tracto gastrointestinal

Los conejos comen hasta 30 veces por día, dividido en eventos de 4 a 6 min, ingiriendo de 2 a 8 g por evento (Johnson-Delaney 2006). En la boca la masticación del alimento presenta tres tipos de movimiento, 1) el de corte, el cual lo realizan los dientes incisivos, 2) el de molido, el cual lo realizan los premolares y molares y se lleva a cabo de un solo lado por tiempo, en este evento la mandíbula está en constante movimiento, hasta 200 ciclos por minuto y reduce el alimento a pequeñas partículas, y 3) la formación del bolo alimenticio y la deglución el cual se lleva a cabo por los molares y la lengua (Rees y Rees 2003, Brewer, 2006). El único momento en que el conejo no mastica es en la ingestión de los cecotrofos que son deglutidos enteros (Brewer, 2006).

La digestión del alimento comienza por la acción de las enzimas de la saliva, la amilasa y la galactocidasa, en el caso de la lipasa en los conejos se encuentra en baja concentración, para mantener el pH la saliva del conejo contiene cantidades importantes de potasio y bicarbonato (Rees y Rees, 2003).

El bolo alimenticio pasa por el esófago y llega hasta el cardias, que permite el acceso al estómago, donde se identifican tres procesos diferentes, diferenciados por el tipo de alimento ingerido, ya sea, leche, alimento seco o los cecotrofos (Rees y Rees, 2003, Johnson-Delaney 2006, Brewer, 2006). En el caso de la leche el pH estomacal es de 5-6.5 y se forma un cuajo semi solido gracias a la acción de una enzima similar a la renina, este cuajo permanece en el estómago 23.5 horas y la acción de los ácidos grasos octanoico

y decanoico, los cuales previenen la proliferación bacteriana en esta etapa gracias a su acción antimicrobiana (Rees y Rees, 2003). Durante los primeros 10 días de vida los gazapos dependen de la leche por completo, posteriormente a partir del día 20 la ingesta de material sólido compone la mayor parte de la dieta y comienza la formación e ingesta de cecotrofos y en el día 30 la ingesta de leche es mínima y la cecotrofia está totalmente establecida. Cuando empieza la ingesta de alimento sólido el pH desciende a 1-2 y se mantiene así durante la ingesta, también, se secreta gran cantidad de agua, el alimento permanece en el estómago de 3 a 6 horas y comienza la digestión de las proteínas gracias a la pepsina activada por el ácido clorhídrico; en este punto la producción de los ácidos octanoico y decanoico descienden (Rees y Rees, 2003, Brewer, 2006). En el caso de los cecotrofos estos son tomados y deglutidos sin masticar directamente del ano, estos están protegidos de la acción de los ácidos octanoico y decanoico por la capa de mucina que los recubre, esto aunado a la producción de lactato, aumenta el pH a 3 y aumenta el tiempo de permanencia de los cecotrofos en el estómago entre 6 y 8 horas (Rees y Rees, 2003). La cantidad de alimento consumido por el conejo es ampliamente mayor en relación con su tamaño que en otras especies; sin embargo, esto se compensa con el poco tiempo de permanencia en el tracto gastro intestinal que es de 17.1 horas en comparación con los bovinos en el cual su tiempo es de 68.8 horas (Johnson-Delaney, 2006).

Por la acción del píloro y la zona pilórica el quimo desemboca en el intestino delgado, este es estimulado por la motilina la cual es producida por los enterocromatocitos y su producción es estimulada por la grasa e inhibida por la presencia de carbohidratos. En el intestino se digieren y absorben la mayor cantidad de nutrientes, esto gracias a la acción de enzimas como la amilasa, quimo tripsina, lipasa y los ácidos biliares, dichas enzimas desdoblan y fragmentan los nutrientes en moléculas de fácil absorción (Johnson-Delaney, 2006). En el caso de la lisozima, esta también se encuentra en los cecotrofos, y es integrada en su formación (Brewer, 2006). Para elevar el pH del quimo proveniente del estómago, se vierten iones de bicarbonato en el duodeno proximal, el cual es reabsorbido en el yeyuno (Rees y Rees, 2003, Johnson-Delaney, 2006). El tránsito en el intestino delgado es de 10 a 20 min en el yeyuno y de 30 a 60 min en el íleon (Johnson-Delaney, 2006). En el conejo se identifican dos movimientos intestinales, la contracción de baja intensidad que aumenta inversamente proporcional a la distensión intestinal y las contracciones peristálticas, las cuales no están reguladas por el contenido intestinal

(Brewer, 2006). Estos movimientos transportan el quimo a lo largo del intestino delgado hasta llegar al ámpula ileal, y posteriormente son separados por la válvula cecal, dependiendo del tamaño de particular, es decir, las partículas más grandes como la fibra cruda de lenta fermentación son dirigidas hacia el colon, las partículas pequeñas se dirigen al ciego (Brewer, 2006).

El ciego provee las condiciones idóneas para la fermentación de carbohidratos, clasificándolo como un ecosistema abierto y continuo, debido a que tiene una microbiota autóctona, una entrada de nutrientes provenientes de la dieta y una salida de cecotrofos, los cuales contienen nutrientes y comunidades microbianas que serán reingeridas (Franz et al., 2011), donde la microbiota puede desarrollarse y mantenerse en un medio; permitiendo así una entrada y salida continua de sustratos y de microorganismos. El aporte constante de sustratos permite a las comunidades microbianas desarrollarse, replicarse y mantenerse en ecosistema en el que habita (Vantus et al., 2014) ; aunado a esto la motilidad y selectividad de la válvula ileo-cecal intervienen en el tiempo de retención, ya que los procesos fermentativos requieren de un tiempo determinado para poder llevarse a cabo, esto se ve afectado por la relación de la fracción fibrosa (celulosa y hemicelulosa). Además, en el conejo el tamaño de partícula afecta el tiempo de retención, siendo de 8 a 10 horas con partículas mayores a 1mm y de 14 a 42 horas para partículas más pequeñas (Franz et al., 2011). La presencia de un medio acuoso es necesario para las reacciones bioquímicas debido a que gran parte de las enzimas microbianas son extracelulares (Simpson y Campbell, 2015) y actúan en el líquido cecal, manteniendo una anaerobiosis relativa, es decir, el oxígeno liberado es metabolizado por las archeas (Zhu et al., 2015; Michelland et al., 2010) . Por lo que altas concentraciones de oxígeno originan CO₂ y H₂O (Krehbiel et al., 2003).

Los productos del ciego son los ácidos grasos volátiles (AGV) y los cecotrofos, estos últimos se dirigen hacia el fusus coli, donde son almacenados hasta su liberación, la cual ocurre una vez cada 23-24 h, esto los hacen posible los movimientos peristálticos y anti-peristálticos, del colon triplemente haustrado y el haustrado simple (Rees y Rees., 2003, Brewer, 2006). El contenido que no es dirigido al ciego, continua su paso por el colon de forma muy similar a los demás mamíferos herbívoros, dicho material forma las heces (Johnson-Delaney, 2006).

2.3.3. Cecotrofia

2.3.3.1. Definición e importancia de la cecotrofia

El conejo es un herbívoro y cuenta con el ciego, cámara de fermentación, que contiene comunidades microbianas que fermentan carbohidratos estructurales de origen vegetal, proveyéndole de nutrientes necesarios para su desarrollo y salud; no obstante, cuenta con una estrategia “la cecotrofia”, para aprovechar al máximo los productos de la fermentación (AGV y proteína de origen microbiano principalmente). La cual presentan todos los miembros del orden Lagomorpha (Romero, 2008).

La cecotrofia es la ingesta de cecotrofos tomados directamente del ano. Un cecotrofo es un conglomerado de fibra parcialmente fermentada en el ciego, microorganismos, vitaminas y minerales. Los cecotrofos se forman en el intestino grueso y se recubren de moco en el recto (Rees y Rees, 2003, Brewer, 2006).

Esta estrategia no solo le permite reciclar nitrógeno en forma de proteína microbiana, y obtener AGV, los cuales se producen dentro de los cecotrofos y son asimilados en el intestino grueso (Bellier et al., 1995).

La mayor cantidad de materia seca en la dieta del conejo se compone de carbohidratos estructurales de origen vegetal, que requieren de la acción de enzimas de la microbiota para la degradación. No obstante, debido a su tamaño y al acelerado tránsito de su sistema gastro intestinal, la fermentación de los elementos como la celulosa es muy pobre (Gidenne et al., 2002).

Aunado a esto, como en otras especies como los rumiantes, gran cantidad del aporte vitamínico del conejo es ofrecido por los microorganismos fermentadores del ciego, pero como se ha mencionado, el tránsito rápido no permite la digestión y absorción de dichos elementos en la primera digestión (De Blas et al., 2002).

En el caso de los conejos jóvenes la cecotrofia es de suma importancia debido a la maduración de su microbiota gastro intestinal y al bajo consumo de materia seca que tienen en las dos últimas semanas de la lactancia (Jacquier et al., 2014). En el primer caso, la sucesión primaria de la microbiota del intestino delgado y grueso, esta reforzada por la ingesta de los cecotrofos maternos, por lo que el proceso de cecotrofia debe ser correcto en la coneja lactante para proveer al gazapo de una microbiota funcional (Caña-Rodríguez

y Williams 1996, Combes et al., 2014), y esto es posible por la protección de mucinas que recubren al cecotrofo excretado por el conejo, lo cual permite que las comunidades estén protegidas de la acción antimicrobiana de diversos ácidos grasos como: hexanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, undecanoico y dodecanoico denominados como "el aceite del estómago del conejo" el cual se encuentra en la leche materna, así como de la acción de las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal (Caña-Rodríguez y Williams., 1966).

En conejos adultos, la cecotrofia se lleva una vez cada 23.5 h aproximadamente, pero en los conejos jóvenes, los cuales recién comienzan la producción de cecotrofos tienen un relativamente bajo consumo de materia seca y en ellos se identifica un segundo evento de cecotrofia. Lo que provee al conejo de una mayor cantidad de materia seca en la etapa de cambio de tipo de alimentación (Bellier et al., 1995).

2.3.3.2. Diferencias entre cecotrofos y heces

Distintas especies animales practican la coprofagia para poder obtener proteína de origen microbiano y minerales. No obstante, en el caso de los lagomorfos la producción de cecotrofos tiene un proceso muy diferente a la producción de heces. Anatómica y fisiológicamente la cecotrofia se separa de manera abismal de la coprofagia (Romero 2008, Litterio y Aguilar, 2017). En el Cuadro 13 se muestra la comparación nutricional de cecotrofos y heces.

Los núcleos de fermentación microbiana conocidos como cecotrofos se producen en el ciego, los cuales contienen una importante cantidad de nutrientes (en promedio: 29.5% de materia seca, 29.5% de proteína cruda, 2.4% de extracto etéreo, 22% de fibra cruda y 10.8% de cenizas), así como vitamina C y vitaminas del complejo B (Cubas et al., 2013), además el cecotrofo aporta 83% más niacina, 100% más riboflavina, 165% más ácido pantoténico, 42% más cianocobalamina y 100% más de proteína que las heces (Brewer, 2006). Los cecotrofos físicamente ofrecen el aspecto de bolas húmedas más claras, en forma de racimos y con un olor característico, distinto al de las heces (Carabaño et al., 2008, Abecia et al., 2005, Herrera y Pérez 2007).

En el caso de las heces, su aspecto es más grande rugoso y seco, no se encuentran en racimos y su textura es dura y seca en comparación de un cecotrofo (Figura 11). La cantidad de cecotrofos producidos diariamente aportan al conejo el 15% de la ingestión

total de materia seca y el 23 % del total ingerido de sustancias nitrogenadas, así como entre el 13-23 % de aminoácidos (lisina, metionina, tirosina, treonina y triptófano) y hasta un 30% de EM para el conejo (Combes et al., 2014, Rodríguez-Romero et al., 2012). En el cuadro 13 se exponen las diferencias entre las heces y los cecotrofos en los conejos.

Cuadro 13. Valores nutricionales de cecotrofos y heces de conejo.

Nutrientes (%)	Cecotrofos		Heces	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Materia seca	29.5	38-16	58.3	47-70
Proteína cruda	29.5	19-39	13.1	4-25
Extracto etéreo	2.4	0.5-5	2.6	0.1-5.3
Fibra cruda	22	10-34	37.8	15-60
Cenizas	10.8	3-18	8.9	0.5-18
Nitrógeno no proteico	35.1	25-45	37.7	30-46

(Modificado de Gecele,1986)



Figura 11. Cecotrofos y heces de conejo. Las heces se muestran a los extremos y los cecotrofos al centro. Las heces tienen un aspecto rugoso, seco y más grande, su expulsión es individual. Los cecotrofos presentan un aspecto suave húmedo (debido al recubrimiento de mucina) y de menor tamaño en relación con las heces (Foto: Xiao-Haitzi D. Puon Peláez).

2.3.3.3. Formación del cecotrofo

En condiciones naturales, los conejos realizan la cecotrofia siguiendo un ritmo circadiano, es decir, está asociada con las horas de luz, los cecotrofos son expulsados por el conejo en las primeras horas de luz y la expulsión de las heces se da entorno de la tarde y noche, a la caída del sol. Durante la cecotrofia no hay expulsión de heces con una reducida ingesta de alimento, esto es contrario cuando la cecotrofia termina (Romero, 2008).

La producción de cecotrofos se lleva a cabo en el ciego y el colon proximal, cabe destacar que la válvula íleo-ceco-cólica, tiene un papel determinante en la separación de las partículas del alimento y la dirección que estas tomarán. Esto se debe a que las partículas con un tamaño entre 0.3 y 0.5 mm y la fracción acuosa se dirigen hacia el ciego, mientras que las partículas más grandes ($> 0.6\text{mm}$) se dirigen hacia el colon, donde continúan su digestión hasta la formación de las heces (De Blas et al., 2002, Johnson-Delaney, 2006, Romero, 2008). Aunado al tamaño de partícula y la selectividad de la válvula íleo ceco cólica, la formación de los cecotrofos es posible por los movimientos peristálticos y anti-peristálticos del colon proximal, esto se debe a la presencia de las secciones triplemente-haustrada y la simple-haustrada (ver en sección 2.1.1). Las cuales permiten estos dos movimientos de forma natural, la motilidad del colon está controlada por el sistema nervioso central y por la aldosterona, lo que indica que la liberación de adrenalina tiene un efecto inhibitor en este proceso (Litterio y Aguilar, 2017).

El proceso de formación del cecotrofo, requiere primero de la digestión fermentativa de los carbohidratos estructurales de origen vegetal, la cual se lleva en el ciego y colon proximal, en esta etapa, la motilidad de estas secciones es alta, y se lleva a cabo durante la ingestión de alimento y expulsión de heces. Al finalizar este proceso, dicha, motilidad disminuye y el material que proviene del ciego pasa por el colon proximal y se va depositando en el Fusus coli, donde se da la forma de uva, se recubre de mucina (lo que lo protege del medio exterior y mantiene un pH entre 6-6.5 al interior) y se acomoda en forma de racimos (Rees y Rees 2003). Cuando este proceso concluye los cecotrofos son expulsados por el ano y tomados directamente por la boca del conejo (Romero, 2008).

2.3.3.4. La influencia de la dieta en la cecotrofia

El ritmo de producción de los cecotrofos puede ser influenciado por diferentes factores tales como: tiempo de ingestión, naturaleza del alimento, fotoperiodos, perfil microbiano

y estrés (Xiao et al., 2015). La dieta es un factor de suma importancia para la nutrición y salud del conejo, así como, para su función zootécnica de producción de carne, esto último puede contrastar con la salud y el bienestar del conejo, debido a la búsqueda de un mayor crecimiento a un menor costo (Combes et al., 2013).

El tiempo que pasan los sustratos en el ciego es de 10 a 12 h y la fermentación de los carbohidratos estructurales de origen vegetal es más efectiva sobre hemicelulosa y pectinas en comparación con la celulosa (Franz et al., 2011). Diversos estudios han probado diversas fuentes de nutrientes para encontrar la dieta “ideal” que tenga un mejor rendimiento productivo, no cause daño a la salud del conejo y tenga un costo menor para el productor (Liangzhan et al., 2016, Gidenne et al., 2012, Strychalski et al., 2014, Gómez-Conde et al., 2007, De Blas et al., 2007), donde se han evaluado distintas dietas con diversas fuentes de fibra (alfalfa, pulpa de remolacha, cascarilla de avena entre otras) sin afectar la fermentación, no así, la concentración de la fibra y la relación celulosa-hemicelulosa, las cuales afectan la producción de AGV, y el perfil microbiano del ciego, alterando el tiempo de retención de la ingesta y el consumo de fibra (Franz et al., 2011). El fotoperiodo afecta el comportamiento, alterando la relación tiempo de cecotrofia: tiempo de alimentación, lo que afecta el tráfico gastro-intestinal y la fermentación (McNitt et al., 2013 De Blas., 2007). No obstante, la cantidad de cecotrofos no varía (30 g/día), pero si en su composición (Gidenne et al., 2012, Combes et al., 2017). El perfil microbiano del cecotrofo se puede ver alterado por diversas condiciones como: las patologías digestivas como la enteropatía epizootica del conejo, en la cual el crecimiento de *Clostridium spp.* se incrementa causando la disminución o ausencia de la cecotrofia (De Blas et al., 2007, Romero 2008, Bäuerl et al., 2014). Factores estresantes pueden causar desde una baja en el consumo de alimento hasta la interrupción del consumo de los cecotrofos y afectar la producción debido al efecto antagonista que tiene la adrenalina sobre la aldosterona y las prostaglandinas (De Blas et al., 2007, Combes et al., 2017, Litterio y Aguilar, 2017).

En el caso del alimento, se ha relacionado que dietas con bajo contenido de fibra producen que la cecotrofia sea reducida, debido a una baja motilidad intestinal y un mayor tiempo de retención cecal. Estos aspectos están muy relacionados con perturbaciones como diarrea e impactación cecal (Combes et al., 2014, Hernández y Cobos, 2001). Existe un cambio en el consumo de los cecotrofos de acuerdo con la edad, los animales adultos

ingieren más cecotrofos durante la noche y los jóvenes hacen una distribución regular durante el día. Los procesos fisiológicos como la lactancia también pueden alterar el consumo de cecotrofos (Herrera y Pérez 2007, McNitt et al., 2013).

2.3.4. Microbiota gastrointestinal del conejo

Existe una relación entre la microbiota y el conejo, la cual define el ecosistema del tracto gastro intestinal, donde, el sistema digestivo del conejo confiere un sitio para el establecimiento de la microbiota así como, las condiciones ambientales y los nutrientes necesarios para su desarrollo (Herrera y Pérez, 2007; Gasmi et al., 2013) , ya que la microbiota aprovecha sustratos como los carbohidratos estructurales, al hidrolizarlos con enzimas bacterianas, acción imposible para las enzimas digestivas del conejo. Las actividades metabólicas de la microbiota dependen de la naturaleza de los sustratos entrantes (Vántus et al., 2014) y del perfil bacteriano cambia conforme la edad y el tipo de alimento consumido hasta llegar a un estadio maduro (Combes et al., 2014).

2.3.4.1. Establecimiento y composición de la microbiota en el tracto digestivo del conejo

La microbiota habita en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del conejo. Combes et al., (2013), demostraron que existe microbiota en el estómago (10^4 - 10^6 UFC/g en la edad adulta), intestino delgado (10^8 a 10^9 UFC/g en la edad adulta), ciego y colon (10^{10} a 10^{12} UFC/g en la edad adulta). Sin embargo, donde existe mayor abundancia es en ciego y colon. La microbiota del ciego del conejo está compuesta principalmente por bacterias, archaeas y levaduras comensales. Se estima que hay 10^{12} UFC/g de bacterias, mientras que la de archaeas son 10^7 UFC/g de contenido (Combes et al., 2013) . En cuanto a los eucaria, en el conejo se creía que carecía de hongos anaerobios y levadura en el ciego; sin embargo, se han reportado levaduras comensales, 10^6 UFC/g. (Kimsé et al., 2012).

La diversidad taxonómica del ecosistema digestivo del conejo se estudió primero por su capacidad para crecer en sustratos definidos y demostró que el conejo adulto alberga 10^7 y 10^6 UFC/g de bacterias celulolíticas y que las poblaciones de bacterias pectinolíticas y xilanolíticas son entre 10^9 y 10^{10} UFC/g en el colon y ciego(Adjiri et al., 1992).

Las especies cultivables identificadas con mayor frecuencia son *Eubacterium cellulosolvens* (bacteria celulolítica) y *Bacteroides ruminicola* (bacteria pectinolítica y xilanolítica) (Lebas et al., 1996). Adicionalmente se ha reportado bacterias celulolíticas

Ruminococcus albus, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y *F. intestinalis*, las cuales representan <7% de las bacterias totales, con un predominio de *R. flavefaciens* y *R. albus*, (Monteils et al., 2008). Sin embargo, se ha reportado la ausencia o la baja concentración de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Escherichia coli* y un predominio de *Bacteroides* (Combes et al., 2013). Entre los géneros bacterianos más comúnmente identificados se encuentran *E. coli* y *Clostridium spp.*; por lo que cabe mencionar que las dos bacterias poseen un potencial patógeno y se asocian con frecuencia en problemas diarreicos en conejos (Garrido et al., 2006) .

En estudios donde se usó secuenciación masiva de nueva generación se muestra el phylum Firmicutes, más abundante en: 45.5% en el estómago y 55.2% en el yeyuno. En el ciego el valor fue de 40.3%, que era aproximadamente igual que la abundancia de los Bacteroidetes con una relación Bacteroides o Firmicutes (51% Bacteroidetes y 45% Firmicutes); los Bacteroidetes se encontraron en todo el tracto digestivo y constituyeron 20-30% del número total de secuencias detectadas en el estómago, el yeyuno, el colon proximal, el colon distal y el recto (Combes et al., 2013; Crowley et al., 2017), presentando aproximadamente el doble de abundantes que los Firmicutes a los 14 días de edad. Paulatinamente los Firmicutes aumentaron su abundancia hasta representar más del 90% de la población a los 80 días de edad, tal vez por mayor contenido de fibra de la dieta (Crowley et al., 2017). En cambio, Bäuerl et al., (2014), reportan que el 78.25% de los phyla bacterianos en el ciego de conejos son Firmicutes, el 15.75% son Bacteroides, 2.40% son Verrucomicrobia y el 2.39% son Tenericutes.

Respecto a la microbiota al nacimiento, se ha observado que en animales axénicos, se produce no habrá colonización microbiana, y un conejo sin microbiota no puede sobrevivir por mucho tiempo (Vántus et al., 2014). Además, la composición de la microbiota de conejos criados en un sistema libre de patógenos (SPF, Specific Pathogen Free) difiere de los criados en un sistema convencional y la densidad de población fibrolítica es mayor en comparación con conejos SPF (Abecia et al., 2007b). La meta-comunidad del medio ambiente inmediato sirve de reservorio para la colonización del tracto digestivo de conejos jóvenes (Abecia et al., 2007a). Dicha colonización masiva del recién nacido se produce al nacer después de la exposición a la microbiota vaginal, fecal, y cutánea (Abecia et al., 2007a). Especies anaerobias facultativas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* colonizan el tracto gastrointestinal del recién

nacido, y producen entornos anaeróbicos en los primeros días de vida que permiten a los microorganismos anaerobios estrictos como *Bacteroides* y *Bifidobacterium spp.* Colonizar el tracto (Mueller et al., 2015).

Abecia et al. (2007b), demostraron que la prevención de la ingestión de heces maternas por los gazapos retrasó la implantación de *Bacteroides* en comparación con los gazapos que tuvieron acceso a las heces de la madre en el nido, así como la influencia de la microbiota cecal de la madre lactante, en lugar de la madre biológica en la composición inicial de la microbiota cecal del gazapo. Adicionalmente, los análisis de DDGE mostraron que, a los 26 días de edad, la composición de la microbiota de los gazapos criados junto a la madre tiene mayor similitud entre individuos que con los miembros de las misma camada que fueron separados de la madre (Abecia et al., 2007b). Después del nacimiento, la leche materna promueve la colonización del intestino y la maduración de la microbiota, también contiene microorganismos que varían desde el tiempo de calostro a la lactancia tardía (Mueller et al., 2015; Praveen et al., 2015). La microbiota de la leche materna está dominada por algunos géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* y *Bradyrhizobiaceae* (Praveen et al., 2015). Sin embargo, las poblaciones de la microbiota intestinal son dinámicas como lo reporta Combes et al., (2014), quienes compararon la concentración de phyla bacterianos (Bacteroides, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria) en el ciego de conejos (Cuadro 14) a diferentes edades (14, 35, 49 y 80 días), y reportan que a los 14 días hay una mayor cantidad de Bacteroides (63.35%) y menor de Firmicutes (29.04%) y posteriormente a los 80 días la concentración de Bacteroides descendió (6.68%) y la de Firmicutes aumentó (91.97%).

Cuadro 14. Cambio en la concentración de diferentes phyla bacterianos en conejos de diferentes edades en días (d).

Phyla bacteriano	14 d de edad	35 d de edad	49 d de edad	80 d de edad
Bacteroides	63.35%	32.93%	9.09%	6.68%
Firmicutes	29.04%	65.26%	87.69%	91.97%
Actinobacteria	0.69%	0.45%	1.52%	0.75%
Proteobacteria	6.91%	1.34%	1.70%	0.60%

(Modificado de Combes et al., 2014).

2.3.4.2. Microbiota y metabolismo del ciego

2.3.4.2.1. La microbiota cecal

En el ciego ocurre la digestión fermentativa con la ayuda de los microorganismos que habitan en el tracto gastro-intestinal del conejo, en un estudio se demostró que existe una población microbiana en el estómago (10^4 - 10^6 UFC/g en la edad adulta) e intestino delgado (10^8 a 10^9 UFC/g en la edad adulta), sin embargo, la mayor abundancia se encuentra en ciego colon (10^{10} a 10^{12} UFC/g) (Combes et al., 2013). Por lo tanto, el alimento que no fue degradado, así como los carbohidratos estructurales son utilizados principalmente por la microbiota cecal como sustrato metabolizándolos en ácidos grasos volátiles (AGV) los cuales son absorbidos por el epitelio cecal y utilizados en el hígado como fuente de energía (Oso et al., 2013). La producción de AGV puede cubrir del 30% al 50% de las necesidades energéticas de mantenimiento de los conejos adultos (Combes et al., 2013).

La población de microorganismos se estima que 10^{12} UFC/g son bacterias, mientras que las archaeas se estiman en 10^7 UFC/g de contenido (Combes et al., 2013). En cuanto a los eucaria, se creía que el conejo carecía de hongos anaerobios y levaduras en el ciego, sin embargo, en un estudio (Kimse et al., 2012) se reportaron levaduras comensales (10^6 UFC/g). Los protozoos son ausentes del ecosistema cecal, con la excepción en conejos positivos a coccidias (Combes et al., 2013).

La diversidad taxonómica del ecosistema digestivo del conejo se estudió primero por su capacidad para crecer en sustratos definidos y demostró que el conejo adulto alberga entre 10^7 y 10^6 CFU/g de bacterias celulolíticas y que las poblaciones de bacterias pectinolíticas y xilanolíticas son entre 10^9 y 10^{10} UFC/g en el colon y ciego (Rodríguez-Romero et al., 2012). Las especies cultivables identificadas con mayor frecuencia fueron *Eubacterium cellulosolvens* (bacteria celulolítica) y *Bacteroides ruminicola* (bacteria pectinolítica y xilanolítica) (Vantus et al., 2014).

En otro estudio, la fracción cultivable de la microbiota del tracto gastrointestinal de conejos adultos sanos, se caracterizó por la ausencia o la baja concentración de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Escherichia coli* y un predominio de *Bacteroides* (Combes et al., 2013).

2.3.4.2.2. Relación de la microbiota cecal con la nutrición y el sistema inmune del conejo

La microbiota metaboliza los carbohidratos que no fueron absorbidos por el huésped, la fragmentación de estos polisacáridos, se lleva a cabo por acción de enzimas β -glicosidasas, que rompen los enlaces de la hemicelulosa y celulosa resultando en glucosa, fructosa, celobiosa, xilosa (Rowland et al., 2017), estos carbohidratos ingresan al microorganismo y siguen una de dos rutas según su estructura (glucolisis o ruta de las pentosas), donde se produce fosfo-enol-piruvato, precursor del piruvato, el cual se puede transformar en succinato, acetil CoA, y lactato. El succinato se convierte en propionato y acetil CoA que es precursor del acetato y el butirato (Strychalski et al., 2014).

Además de su función de barrera, la microbiota participa en el desarrollo de órganos y células del sistema inmune, la diversificación de anticuerpos y los mecanismos de tolerancia digestiva (Valdivia et al., 2007). Algunos estudios (Carabaño et al., 2008; Combes et al., 2011; Bäuerl et al., 2014) han encontrado un desarrollo anormal de la GALT y una reducción en el número de linfocitos en animales libres de bacterias.

El sistema inmune intestinal del conejo (GALT tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal) contiene más células inmunes que en el resto del cuerpo, casi el 70% y está organizado en folículos linfoides llamados placas de Peyer y células aisladas dispersas en la lámina propia y el epitelio de las vellosidades (Valdivia et al., 2007; Schnupf y Sansonetti, 2012). Está principalmente ubicado en el intestino delgado y colon, como en la mayoría de los mamíferos, pero presenta dos estructuras adicionales, el *saco rotundus* que se encuentra en la unión íleo-cecal y el apéndice vermiforme, situado en el extremo del ciego (McNitt et al., 2013).

El área folicular del apéndice vermiforme incrementa su tamaño entre la 3^o y la 6^o semana de la vida, y mantiene la misma importancia relativa hasta la etapa adulta. El área de proliferación de los folículos también alcanza un máximo a las seis semanas (Abecia et al., 2007a; Valdivia et al., 2007; Rodríguez-Romero et al., 2012). Cabe mencionar que en el íleon se encuentra una gran concentración de tejido linfoide, que reconoce patógenos en el quimo menos acuoso (Domínguez et al., 2008).

El desarrollo del sistema inmune en el conejo y especialmente de las células B, se puede dividir en tres etapas. La primer etapa, fetal y neonatal, consiste en una linfopoyesis que creará el repertorio de linfocitos neonatal y se llevará a cabo en el hígado y la médula

principalmente y depende de factores genéticos y la transferencia placentaria durante la gestación (Valdivia et al., 2007; Carabaño et al., 2008). La segunda etapa consiste en la creación de un repertorio primario de anticuerpos entre las semanas 3 y 8 de la vida por la proliferación y diversificación de los linfocitos y el GALT (Valdivia et al., 2007). La última etapa corresponde a la formación de un segundo repertorio de anticuerpos en los adultos, el cual será centrado principalmente en la proliferación de las células B en los órganos linfáticos secundarios (Carabaño et al., 2008).

2.3.4.2.3. Metabolismo

El conejo como todos los herbívoros, depende de una relación simbiótica para su nutrición y salud (Abecia et al., 2007a, Combes et al., 2011, Vántus et al., 2014). En el ciego, dicha relación es de suma importancia, ya que la microbiota metaboliza los carbohidratos estructurales de origen vegetal incluidos en la dieta, gracias a la acción de enzimas microbianas como la β amilasa, que desdobla los enlaces 1-4 beta amilasa (Combes et al., 2011). Por lo tanto, el alimento que no fue degradado, así como los carbohidratos estructurales son utilizados principalmente por la microbiota cecal como sustrato, metabolizándose en ácidos grasos volátiles (AGV). Los cuales son absorbidos por el epitelio cecal y utilizados en el hígado como fuente de energía. La producción de AGV puede cubrir del 30% a 50% de las necesidades energéticas de mantenimiento de conejos adultos (Combes et al., 2013).

Diferentes estudios (Strychalski et al. 2014; Jacquier et al. 2014; Mišta et al. 2015; Xiao et al., 2015) han evaluado la relación de los carbohidratos de la dieta del conejo con la producción de metabolitos por la microbiota presente en el tracto gastro-intestinal.

Strychalski et al. (2014) (evaluaron el efecto de tres fuentes de hemicelulosa y celulosa harina de soya, granos de destilería y harina de colza, donde reportaron concentraciones elevadas de ácido acético en las dietas con harina de soya y grano de destilería ($17.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ $17.8 \mu\text{mol g}^{-1}$ respectivamente). El ácido propiónico fue mayor en el grupo con harina de soya. Aunado a esto se midió la actividad enzimática bacteriana (α y β glucosidasa, α y β galactosidasa, α -arabinopiranosidasa, β glucoronidasa y β xilosidasa), mostrando una baja en la arabinopiranosidasa empleando harina de soya (0.024 vs 0.073 y $0.86 \mu\text{mol g}^{-1}$) y una alta actividad de la glucoronidasa en los grupos con harina de colza y granos de destilería (46 y $58.5 \mu\text{mol g}^{-1}$) en comparación con la harina de soya ($43 \mu\text{mol g}^{-1}$).

Esto demuestra que diferentes concentraciones de hemicelulosa y celulosa afectan la actividad enzimática de la microbiota cecal del conejo. En cambio, Mista et al., (2015) compararon la concentración de AGV totales y metano en liebres y conejos, encontrando que el perfil y la concentración de AGV está determinada por la microbiota y está a su vez, se define por el perfil de carbohidratos de dieta. Adicionalmente, Jacquier et al. (2014) mencionaron que la adición de fibra dietaria rápidamente fermentable estimula la actividad microbiana en el ciego del conejo y modifica el perfil de fermentación si esto se aplica entre los 28 a 60 días de edad en comparación con conejos a los que no se les adicionó la fibra. Por último, Xicato et al., (2008) reportaron que encontraron una concentración alta de AGV cecales para los conejos alimentados con fibra rápidamente fermentable (98 mM) en comparación al grupo control (73 mM) y concluyeron que la inclusión de azúcares indigestibles estimula la excreción de urea en sangre hacia el ciego como sustrato para la microbiota, lo que contribuye a la proliferación de esta.

2.3.4.2.4. Importancia de los ácidos grasos volátiles en el conejo.

La producción de ácidos grasos volátiles representa entre el 30 y 50% de la energía de mantenimiento en el conejo (Combes et al., 2013, Vernay 1987, Gidenne 2015). En el conejo el ácido acético es el más abundante ($77 \text{ mmol } 100 \text{ ml}^{-1}$ en promedio con un rango de 65 a 87) seguido por el butírico ($17 \text{ mmol } 100 \text{ ml}^{-1}$ en promedio con un rango de 6 a 28) y por último el propiónico ($6 \text{ mmol } 100 \text{ ml}^{-1}$ en promedio y un rango de 3 a 11), presentando una relación propionato:butirato menor a 1 (Bellier et al., 1995, Gidenne 2015). Estas proporciones molares pueden variar por los niveles de fibra (Gidenne 2015). Los AGV se encuentran presentes desde el estómago, con la acumulación de cecotrofos en el fundus, con una concentración baja, que puede ir desde 0.80 a 0.56 mM, de igual manera podemos encontrar AGV en el intestino delgado en bajas concentraciones, con valores de 0.66 mM para el ácido acético, 0.14 mM para el propiónico y 0.20 mM para el butírico. La mayor concentración de AGV la encontramos en ciego y colon, con valores de 38 a 76 mM (Vernay 1987). La absorción de dichos metabolitos es rápida y se lleva a cabo principalmente en el ciego y el colon proximal, desapareciendo el 50% de butirato, el 43% de propionato y el 30 % de acetato en aproximadamente 20 min a partir de su producción (Marty y Vernay, 1984).

Los productos finales de la fermentación en el conejo son utilizados por la microbiota o son absorbidos en la mucosa gastrointestinal por difusión pasiva, se ha observado que no

hay diferencia de concentración de estos metabolitos entre sangre arterial y venosa, lo que indica que los AGV absorbidos son completamente metabolizados por la pared gastro-entérica (Marty y Vernay, 1984).

Dichos productos aparte de ser usados por la microbiota, también la modulan de dos maneras diferentes, la primera es cambiando el ambiente en el que se encuentran, ya que como toda reacción química necesita un balance entre la producción y el consumo de dichos metabolitos, modificando a su vez el potencial de óxido-reducción y el pH. Lo que permite que las comunidades microbianas autóctonas prosperen y eviten el crecimiento de comunidades patógenas (Macfarlane y Macfarlane, 2003). El segundo método consiste en el efecto estimulante o inhibidor de células inmunitarias y en el desarrollo de linfocitos reguladores, que son los responsables de la tolerancia del sistema inmune a la microbiota autóctona del sistema gastrointestinal, logrando este efecto por la vía de Ffar2, que es un receptor libre de ácidos grasos y es un regulador de la transcripción en nódulos linfáticos y células mononucleadas (Smith et al., 2013).

Los ácidos grasos octanoico (C 8:0) y decanoico (C 10:0) también conocidos como ácidos caprílico y cáprico, confieren protección contra agentes patógenos en la etapa de lactancia. Estos componentes son sintetizados en la glándula mamaria de la coneja e ingeridos por el gazapo (Strong et al., 1972) y se le conoce como aceite estomacal, representando el 13% del contenido graso en la leche de los conejos; teniendo una acción antimicrobiana extremadamente fuerte, es decir 4 veces más actividad antimicrobiana en caso de C 8:0 y entre 8 y 10 veces más en el caso de C 10:0 (Cañas-Rodríguez y Williams, 1966). Lo que permite que la cuajada de la leche pueda permanecer en el estómago con un pH relativamente neutro (5-6.5) sin que exista una proliferación de bacterias patógena como *E. coli* (Skrivanova et al., 2009), ya que daña a la membrana citoplasmática de la bacteria (Kim y Rhee, 2013).

2.3.4.2.5. Producción de ácidos grasos volátiles en el ciego

La mayor parte de las comunidades bacterianas que habitan el tracto gastrointestinal, usan el camino glicolítico para obtener energía de los carbohidratos, teniendo como metabolitos secundarios al piruvato y la acetil-CoA, los cuales son factores claves para el proceso de fermentación (Figura 12) y se pueden obtener de diversas fuentes de carbono como la fructosa, almidón celulosas y hemicelulosa (Macfarlane y Macfarlane, 2003). La

otra vía usada por las comunidades bacterianas es la vía pentosa-fosfato, la cual metaboliza pentosas como la pectina y los xilanos, descarboxilando la glucosa-6-fosfato de forma oxidativa transformándola en ribulosa-5-fosfato. Posteriormente con la acción de transketolasas y transaldolasas se forma triosa y hexosa fosfato, moléculas que pueden integrarse a la vía de la glicólisis hasta llegar al piruvato (Macfarlane y Macfarlane, 2003; Des Besten et al., 2013).

El piruvato es transformado en ácidos orgánicos o alcohol, de forma anaerobia mediante tres vías: En la primera vía el piruvato es reducido a lactato o etanol, en la segunda vía se genera H_2 de forma exergónica o endergónica y la tercera vía se da por la carboxilación de fosfoenolpiruvato formando oxaloacetato y fumarato, ésta está regulada por las NADH deshidrogenasa y la fumarato reductasa. La finalidad de las tres vías es la formación de acetyl-CoA, H_2 y CO_2 (Des Besten et al., 2013). La acetyl-CoA es hidrolizada y forma acetato y metano, también se puede formar a partir de CO_2 resultando en una molécula de acetyl-CoA por la vía de Wood-Ljungdahl. El propionato es formado del fosfoenolpiruvato o por la reducción de lactato por la vía del acrilato. El butirato requiere 2 moléculas de acetyl-CoA que son reducidas a butirato. Las bacterias utilizan lactato pueden formar butirato a partir de la producción de acetyl-CoA por la vía clásica. (Des Besten et al., 2013).

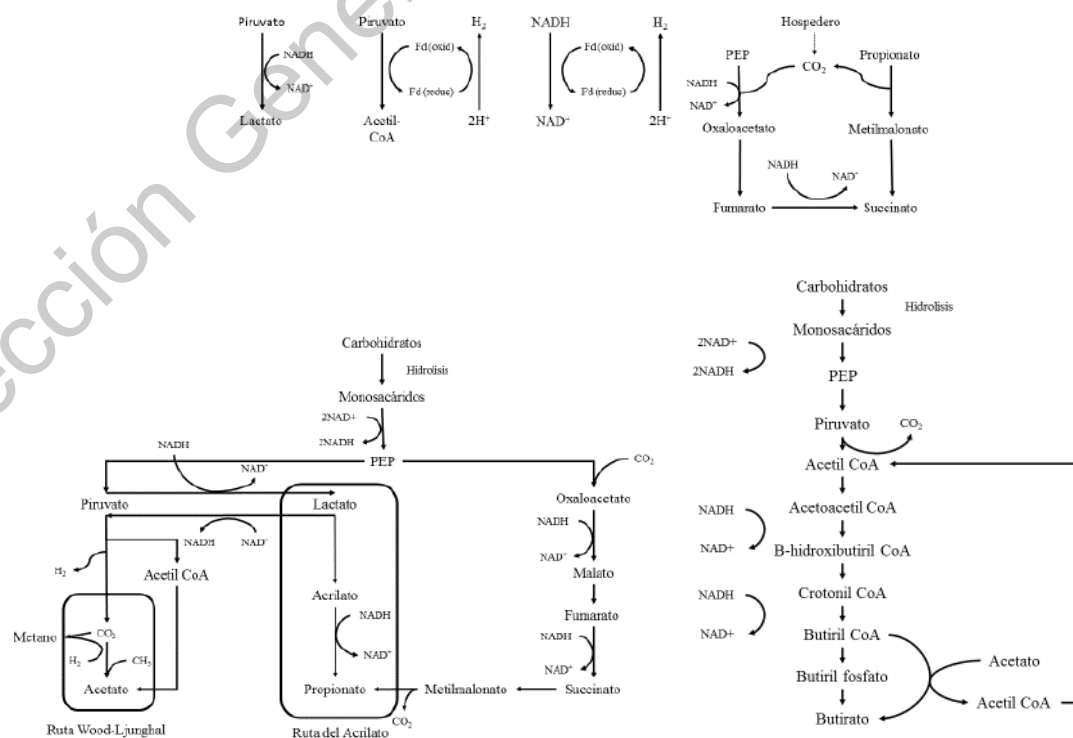


Figura 12. Esquema de la formación de acetyl-CoA, acetato, propionato y butirato en anaerobiosis. (Modificado de Des Besten et al., 2013)

2.4. Fibra: carbohidratos estructurales de origen vegetal

El concepto de fibra es ampliamente usado en estudios de nutrición tanto humana como animal (Lovegrove et al., 2015, Carabaño et al., 2008, Krause et al., 2003(1–3) aunque el concepto es muy amplio, en el campo de la nutrición, describe a un ingrediente de origen natural que compone la dieta del individuo en estudio. Sin embargo, este ingrediente tiene múltiples características físicas y químicas, que le confieren diversas funcionalidades (Lovegrove et al., 2015).

2.4.1. Tipos de carbohidratos de origen vegetal

La fibra o los carbohidratos estructurales de origen vegetal (CEOV) presenta diversos tipos de monosacáridos, los cuales son: 1) almidón, el cual comprende la amilosa y la amilopectina con enlaces 1-4 α ; 2) glucosas estructurales, las cuales comprenden la celulosa y glucanos mixtos con enlaces 1-3, 1-4 y 1-6 β ; 3) hemicelulosa, compuesta por xiloglucanos, glucomananos, galactomananos y galactanos, que presentan enlaces 1-4 β y 1-6 α ; 4) pectinas, como los homogalacturanos formados por cadenas de 1-4 α D-ácido galacturónico y 5) oligosacáridos, como los fructanos que presentan un enlace 1-2 β D-fructosa (Lovegrove et al., 2015).

El almidón está formado por la amilopectina y la amilosa. La amilopectina está formada por cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glicosídicos y altamente ramificadas en las posiciones α -1,6 por pequeñas cadenas de glucosa a intervalos de 10 nm a lo largo del eje de la molécula constituyendo entre 70 y 85% de almidón común. Por su parte, la amilosa es esencialmente una cadena lineal de α -1,4-glucanos con puntos de ramificación limitados en las posiciones α -1,6 y constituye entre 15-30% de almidón (Alcázar-Alay y Almeida 2015). El almidón se deposita en amiloplastos que son gránulos altamente organizados que varían en su abundancia, forma y tamaño desde <1 μ m hasta > 100 μ m dependiendo de las fuentes vegetales (Lovegrove et al., 2015; Yao et al., 2017).

La celulosa es una cadena no ramificada que comprende hasta aproximadamente 15.000 unidades de glucosa unidas por enlaces 1-4 β y enlaces de hidrógeno confiriéndole fuerza a la pared celular (Lovegrove et al., 2015). Los polímeros lineales se agregan en forma amorfa o regiones cristalinas. La celulosa está presente en hongos, algas y plantas

superiores, que van desde un pequeño porcentaje hasta el 90% de los carbohidratos de la pared celular; es insoluble en agua y resistente a la acción de las enzimas digestivas de los mamíferos (Jones, 2014).

El término hemicelulosa se utiliza comúnmente para referirse a polisacáridos de pared celular que sólo se solubilizan con un tratamiento alcalino. La mayoría de las paredes celulares contienen hemicelulosas, pero hay una gran variación en el contenido exacto entre especies, tipo de tejido y capas de la pared celular (Lovegrove et al., 2015; Zhu et al., 2014; Crincoli et al., 2016). La hemicelulosa está compuesta por arabinoxilanos, xiloglucanos, glucomananos, galactomananos, que presentan enlaces 1-4 β y 1-6 α . Los arabinoxilanos son cadenas lineales de xilosa unidas por enlaces 1-4 β en las que se observan sustituciones de xilosa por arabinosa, se encuentran generalmente en las paredes de las células monocotiledóneas, particularmente hierbas (Pituch-Zdanowska et al., 2015). La solubilidad en agua está fuertemente relacionada con el grado de ramificación de los arabinoxilanos, es decir, más ramificados más solubles que los menos ramificados (Lovegrove et al., 2015). Los xiloglucanos consisten en glucosas unidas con enlaces 1-4 β con sustituciones de glucosa por xilosa unida por un enlace 1-6 α . Los glucomananos comprenden unidades de glucosa y manosa unidos por enlaces 1-4 β con sustituciones ocasionales de glucosa unida con un enlace 1-6 α . Los galactomananos son cadenas de mananos unidos por enlaces 1-4 β con sustituciones de manosa por galactosa unida por un enlace 1-6 α . Los glucuronomananos son cadenas de manosa y ácido glucorónico unidos por enlaces 1-2 β con ocasionales sustituciones de galactosa y arabinosa. Los galactanos son polisacáridos que puede ser sulfatados y están compuestos por unidades de 1-3 β galactosa y (1-4) 3, 6 anhidro α galactosa (Lovegrove et al., 2015, Zebeli et al., 2012).

Las pectinas tienen una estructura extremadamente diversa, sin embargo, comparten características comunes, como la presencia de ácido galacturónico en la columna vertebral del polisacárido. los polisacáridos pécticos contienen entonces un homogalacturano compuesto por unidades de ácido galacturónico con enlaces 1-4 α y ocasionales residuos de rhamosa. Entre estos se encuentran el rhamnogalacturano-I y el rhamnogalacturano-II. El Rhamnogalacturano-I es una cadena de disacáridos formados por ácido galacturónico y rhamosa con sustituciones de arabinosa y arabinogalactano. En cambio, el rhamnogalacturano-II es una columna de homoglucanos con ramificaciones

laterales, que consta de 12 azúcares diferentes y 20 enlaces diferentes representando el componente menor de las paredes celulares de las plantas (Lovegrove et al., 2015; Jones 2014).

Otros oligosacáridos presentes en tejidos vegetales son los fructanos, constituidos principalmente por oligómeros fructosa con enlaces 1-2 β , con alguna glucosa esporádica estando presentes en varias especies de plantas (Crincoli et al., 2016).

En la figura 13 se muestra de forma esquemática la unión de los términos más usados para referirse a los CEOV, así como su estimación química (ver sección 2.4.4.)

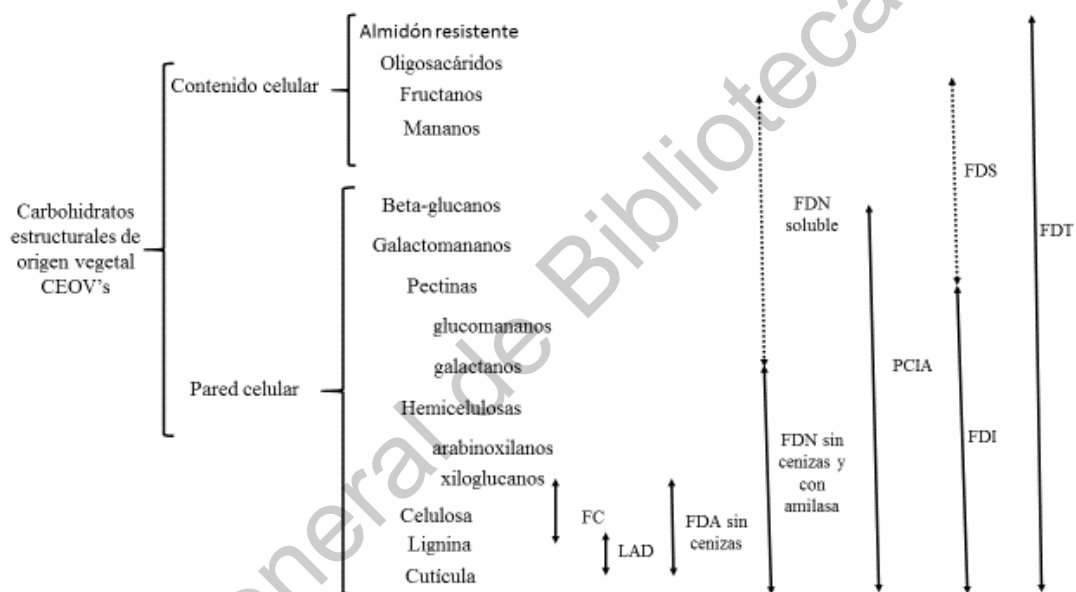


Figura 13. Esquema de términos de referencia para los carbohidratos estructurales de origen vegetal. FC: Fibra cruda, LAD: Lignina ácido detergente, FDA: Fibra detergente ácido, FDN: Fibra detergente neutro, PCIA: Pared celular insoluble en agua, FDS: Fibra dietética soluble, FDI: Fibra dietética insoluble, FDT: Fibra dietética total. (Modificado de Gidenne 2015).

2.4.2. Carbohidratos estructurales de origen vegetal en la dieta del conejo

La alimentación en la producción cunícola es proporcional el alimento suficiente para cebar su apetito, sin embargo, nutrir al conejo requiere que se satisfagan las necesidades metabólicas, fisiológica y productivas (Martínez et al., 2004). Una de las características más relevantes en la nutrición del conejo es la energía bruta, la cual se define como: la energía que tiene en un ingrediente o alimento. Una vez ingerido, éste se digiere y dicha

energía es absorbida en un 65% aproximadamente a esto se le conoce como energía digestible, el resto se pierde en la formación de las heces lo que aproximadamente significa en 25% de la energía bruta y el 10% restante es convertido en gases por la microbiota, principalmente por el dominio Archaea (Martínez et al., 2004; Lebas et al., 1996). De la energía absorbida el 58% es usada para el desempeño metabólico o energía metabolizable eliminándose el resto por la orina, esto se traduce en que el 33% de la energía bruta se usa en el mantenimiento metabólico y el 25% en la producción de carne y pelo (Martínez et al., 2004).

Teniendo en cuenta lo anterior y con la premisa de que en la producción de carne de conejo se requiere la mayor ganancia de peso o producción de musculo al menor costo (Olivares et al., 2009).

La alimentación está compuesta por los CEOV, esto puede llegar a un tercio del peso vivo del conejo debido a ser una fuente de nutrientes, regular la motilidad digestiva y ser el elemento principal para la formación de cecotrofos (De Blas et al., 2002), cubriendo así las necesidades de fibra y energía (Cuadro 15).

Cuadro 15. Necesidades de energía digestible, metabolizable, fibra cruda, fibra detergente neutro y fibra detergente ácida en las etapas de destete, engorda y gestación.

Nutriente/factor	Unidad	Destete	Engorda	Engorda gestación
Energía digestible	MJ	10.7	10.2	10.2
Energía metabolizable	MJ	10.2	9.8	9.8
FC	g/kg	140-150	150-160	145-155
FDN	g/kg	310-335	330-350	320-340
FDA	g/kg	165-185	180-200	160-180

Fibra cruda (FC), Fibra detergente neutro (FDN) y Fibra detergente ácido (FDA). (Datos de McNitt et al., 2013)

Otra característica importante en la alimentación de conejos productivos es la forma en que se ofrece el alimento, para los sistemas semi intensivo e intensivo (ver sección 2.1.3.). El alimento comercial se fabrica en pellets, la dieta es formulada siguiendo las necesidades productivas y los ingredientes son molidos, mezclados e integrados por

medio de presión y calor (Martínez et al., 2004), homogenizando el consumo de nutrientes y minimizando el desperdicio. En el Cuadro 16 se muestra el criterio de la composición promedio de los CEOV de las dietas comerciales que se ofrecen en la producción cunícola.

Cuadro 16. Composición promedio del pellet comercial en su fracción fibrosa ofrecido en la producción cunícola.

Criterio químico g/kg	Rango
Fibra dietética total	450-600
FDN	280-460
FDA	150-230
FC	120-180

FDN: Fibra detergente neutro, FDA: Fibra detergente ácido, FC: Fibra cruda. (Modificado de Gidenne, 2015).

2.4.3. Importancia de los Carbohidratos estructurales de origen vegetal para la nutrición y salud del conejo

2.4.3.1. Carbohidratos estructurales de origen vegetal y la fisiología digestiva

El aspecto más importante de los CEOV en su fisiología es la producción de cecotrofos, y estos son el resultado de tres pilares principales: la anatomía digestiva del conejo, las comunidades microbianas contenidas en el ciego y su actividad de fermentación y la composición de la dieta, en especial la cantidad y calidad de CEOV en ella.

Con lo anterior es necesario enfatizar que los datos sobre el ritmo de producción de los cecotrofos son muy discutibles, puesto que diferentes factores influyen tales como: tiempo de ingestión, naturaleza del alimento, fotoperiodos, perfil microbiano y estrés (Xiao et al., 2015).

El tiempo que pasan los sustratos en el ciego es de 10 a 12 h y la fermentación de los carbohidratos de la pared celular es más efectiva sobre hemicelulosa y pectinas en comparación con la celulosa (Franz et al., 2011). Esto se ha observado en múltiples estudios (Liangzhan et al., 2016; Gidenne et al., 2012; Strychalski et al., 2014; Rusell et al., 2009; Gómez-Conde et al., 2007), donde se han evaluado distintas dietas con diversas

fuentes de fibra (alfalfa, pulpa de remolacha, cascarilla de avena entre otras) sin afectar la fermentación, no así, la concentración de la fibra y la relación celulosa: hemicelulosa, las cuales afectan la producción de AGV's, y el perfil microbiano del ciego, alterando el tiempo de retención de la ingesta y el consumo de fibra (Franz et al., 2011).

El fotoperiodo afecta el comportamiento, alterando la relación tiempo de cecotrofia: tiempo de alimentación, lo que afecta el tráfico gastro-intestinal y la fermentación (McNitt et al., 2013; De Blas et al., 2007). No obstante, la cantidad de cecotrofos no varía (30 g/día), pero si su composición (Gidenne et al., 2012; Combes et al., 2017).

2.4.3.2. Carbohidratos estructurales de origen vegetal y el desarrollo de la microbiota cecal

En secciones anteriores se mencionó la estrecha relación que tiene el macro organismo con su microbioma de tal manera que forma un solo ente conocido como holobionte (Valdespino et al., 2014), esta relación incluye el alimento que consume el macro organismo a lo largo de su vida, en el caso del conejo, como mamífero, su primer alimento es la leche y esta tiene un papel esencial en el desarrollo y salud del sistema digestivo, no obstante, el conejo tiene su primer contacto con los CEOV cuando ingiere las heces maternas, las cuales también le proveen parte del segundo repertorio de comunidades microbianas que se desarrollarán en el ciego (Abecia et al., 2007b), las cuales además de comunidades microbianas también contienen una cantidad importante de CEOV (Cuadro 13), la cual contribuye a dichas comunidades tengan los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Posteriormente, el conejo comienza a consumir alimento sólido, es decir los pellets que forman el alimento de la coneja lactante, este pellet contiene una cantidad importante de CEOV (Cuadro 16) así como comunidades microbianas que podrán establecerse y desarrollarse en el ciego del conejo en desarrollo.

2.4.3.3. Carbohidratos estructurales de origen vegetal y el sistema inmune gastrointestinal

La relación entre hospedero y huésped es vital para el desarrollo y la salud del conejo, esto incluye el desarrollo del sistema inmune. En el tracto gastrointestinal, el tejido linfóide asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT por sus siglas en inglés) tiene un estrecho contacto con todo lo que el conejo ingiere desde el momento de su nacimiento (ver sección 2.3.4.2.2.). Esto incluye ingredientes en la dieta así como comunidades

microbianas. En el caso de la fibra se han descrito dos formas de interacción con el sistema inmune, el primero de forma directa, ya que al ser digerida por la microbiota cierta cantidad de antígenos son detectados y reconocidos por las células M, colaborando con la tolerancia a estos antígenos, ya que el contacto es en una etapa temprana del desarrollo del tejido linfoide (Zhu et al., 2013) y de forma indirecta al ser el elemento principal para la producción de AGV's por parte de la microbiota fermentativa del ciego (ver sección 2.3.4.2.3.2), ya que estos AGV's regulan la respuesta inflamatoria al unirse al receptor GPR43 y esta es inhibida (Maslowski et al., 2009).

2.4.3.4 La microbiota cecal y el sistema inmune intestinal

La microbiota participa en el desarrollo de órganos y células del sistema inmune, la diversificación de anticuerpos y los mecanismos de tolerancia digestiva (Valdivia et al., 2007).

El sistema inmune intestinal del conejo (GALT tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal) contiene más células inmunes que en el resto del cuerpo, casi el 70% y está organizado en folículos linfoides llamados placas de Peyer y células aisladas dispersas en la lámina propia y el epitelio de las vellosidades (Valdivia et al., 2007; Schnupf y Sansonetti, 2012). Está principalmente ubicado en el intestino delgado y colon, como en la mayoría de los mamíferos, pero presenta dos estructuras adicionales, el *saco rotundus* que se encuentra en la unión íleo-cecal y el apéndice vermiforme, situado en el extremo del ciego (McNitt et al., 2013).

El área folicular del apéndice vermiforme incrementa su tamaño entre la 3^o y la 6^o semana de vida, y mantiene la misma importancia relativa hasta la etapa adulta. El área de proliferación de los folículos también alcanza un máximo a las seis semanas (Abecia et al., 2007a; Valdivia et al., 2007; Rodríguez-Romero et al., 2012). Cabe mencionar que en el íleon se encuentra una gran concentración de tejido linfoide, que reconoce patógenos en el quimo menos acuoso (Dominguez et al., 2008).

El desarrollo del sistema inmune en el conejo, y especialmente de las células B, se puede dividir en tres etapas.

La primera etapa, fetal y neonatal, consiste en una linfopoyesis que creará el repertorio de linfocitos neonatal y se llevará a cabo en el hígado y la médula, principalmente y depende

de factores genéticos y la transferencia placentaria durante la gestación (Valdivia et al., 2007; Carabaño et al., 2008).

La segunda fase consiste en la creación de un repertorio primario de anticuerpos entre las semanas 3 y 8 de la vida por la proliferación y diversificación de los linfocitos y el GALT (Valdivia et al., 2007).

La última etapa corresponde a la formación de un segundo repertorio de anticuerpos en los adultos, el cual será centrado principalmente en la proliferación de Las células β en los órganos linfáticos secundarios (Carabaño et al., 2008).

Algunos autores han encontrado un desarrollo anormal de la GALT y una reducción en el número de linfocitos en animales libres de bacterias (Carabaño et al., 2008; Combes et al., 2011; Bäuerl et al., 2014).

2.4.4. Estudio y análisis de los carbohidratos estructurales de origen vegetal

Los métodos clásicos para determinar la fibra pueden desglosarse en métodos gravimétricos. Los métodos gravimétricos se basan en pesar el residuo que queda después de una solubilización enzimática o química de los componentes que no son fibra (Simpson y Campbell 2015).

Los métodos moleculares también conocidos como métodos enzimático-químicos consisten en aislar los residuos de la fibra por acción enzimática y en liberar por hidrólisis ácida los azúcares neutros que constituyen los polisacáridos de la fibra y medirlos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GLC) o colorimétricamente (AOAC, 2010; FAO, 1997; Van Soest et al., 1991), es decir miden y analizan los metabolitos resultantes de la digestión de estos carbohidratos para clasificarlos.

2.4.4.1. Método clásico (físico-químico)

Los métodos gravimétricos son más sencillos y rápidos, se limitan al cálculo de las fibras totales o de las fibras solubles e insolubles, los métodos enzimático-químicos en cambio son más complejos y lentos, proporcionan la cantidad de cada uno de los azúcares neutros y ácidos, se puede estimar por separado la lignina y añadirla a la suma de los azúcares individuales dando el contenido de fibra total (AOAC, 2010; Van Soest et al., 1991).

Métodos químico-gravimétricos: Fibra cruda: Se basa en el tratamiento secuencial con ácidos y álcalis en condiciones estandarizadas. Con este método se subvalora en forma importante el contenido de fibra ya que se disuelve gran parte de la hemicelulosa y lignina, cantidades variables de celulosa, así como toda la fibra soluble (AOAC, 2010; Van Soest et al., 1991). Los valores de fibra cruda no tienen relación con el verdadero contenido de fibra ya que el contenido total de fibra generalmente es 3 a 5 veces mayores que los valores reportados por esta prueba.

Fibra detergente neutro: En este estudio se incluye celulosa, hemicelulosa y lignina como componentes principales, originalmente se aplicó a los forrajes, y su posterior aplicación a los alimentos con almidón, lo cual reveló interferencia con el almidón, por lo tanto, se implementó el uso de amilasas (FAO, 1995; Van Soest et al., 1991). El uso de alta temperatura con un tratamiento de amilasa a corto plazo tiene las ventajas de minimizar el efecto de actividades secundarias no deseadas y es un procedimiento más rápido (AOAC, 2010).

Este procedimiento hace uso de una solución caliente de lauril-sulfato de sodio y la subsecuente determinación gravimétrica del residuo. Este método da una buena estimación de la fibra insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina). La ventaja de este método es que permite determinar la fibra insoluble por un método relativamente simple. La gran desventaja es que la fibra soluble se pierde, además se puede subestimar la fibra insoluble en alimentos como la soya y la papa, por la disolución de complejos proteína-fibra (FAO, 1995).

Fibra detergente ácido: Este método consiste en someter la muestra a ebullición con bromuro de cetil-trimetil-amonio en medio ácido y subsecuente filtración y lavado del residuo, para la determinación de celulosa, lignina, ceniza insoluble en ácido y silicio (AOAC, 2010).

Lignina: El contenido de lignina se determina mediante el método de ácido detergente con ácido sulfúrico, descrito por Robertson y Van Soest (Van Soest et al., 1991). Este método requiere la extracción previa con solución ácido detergente. Es un método más laborioso y variable que la FDN (Russell et al., 2009).

2.4.4.2. Método molecular

Método enzimático-gravimétrico: Estos métodos se basan en digerir las proteínas e hidratos de carbono con enzimas, además es necesario la determinación y descuento de cenizas y proteínas remanentes (AOAC, 2010). En este método se hace uso de enzimas como: alfa amilasa, pepsina y pancreatina, así como, proteasa y gluco-amilasa. Existen ciertos ensayos que contemplan la dispersión de la muestra en buffer fosfato 7,4 y adición de bilis y enzimas pancreáticas (Russel et al., 2009). Las principales ventajas de estos métodos es que son relativamente exactos y precisos comparados a otros procedimientos. Más aún, estos métodos son simples, económicos y sencillos de realizar. Sin embargo, no dan información detallada sobre los componentes de la fibra total (FAO, 1995).

2.5. Enteropatía Epizoótica del Conejo

La Enteropatía Epizoótica del Conejo (EEC) es una disbiosis que afecta conejos de granja tanto en sistemas intensivos como semi-intensivos, aunque también hay informes en conejos domésticos pero se consideran raros (Haligur et al., 2009). Tiene un impacto negativo en la producción de conejos desde la década de 1990 (Licois et al., 1998; Le Bouquin et al., 2009), con hasta el 95% de los animales en cualquier producción de conejos afectados en algún momento, lo que resulta en niveles de hasta 90% de morbilidad y hasta 80% de mortalidad (Licois et al., 2005).

Los conejos afectados tienen entre 3 y 7 semanas de edad y muestran una reducción en su consumo diario de alimento del 50% al pasar de 110 g por día a 55 g por día durante aproximadamente 7 días (Pérez de Rozas et al., 2005). La disbiosis contribuye a pérdidas del 10% al 20%, aunque hay casos en que esto puede alcanzar del 20% al 60% en animales maduros (Cheeke, 1995; Gutiérrez et al., 2008). Aunque la EEC no siempre es mortal, los conejos que sobreviven a la enfermedad tienen un peso menor en comparación con los conejos sanos en el mismo sistema de producción. Estas condiciones causan una disminución en la productividad, principalmente debido al retraso del crecimiento y al bajo aumento de peso (Finzi et al., 2008; Pérez de Rozas et al., 2005).

2.5.1. Historia

Hay informes contradictorios en la literatura científica sobre los orígenes de EEC. El primer informe potencial de la condición se remonta a más de 100 años, basado en una descripción de síntomas similares a EEC, aunque el término enteropatía no se usaba en

ese momento. La enteropatía mucoide (Bergdall y Dysco 1994), uno de los nombres anteriores utilizados para la afección, se conoce desde hace más de 40 años. Sin embargo, la primera descripción definitiva de la condición se remonta a EEC que surgió tanto en Francia como en España a fines de 1996 (Licois et al., 2005). En Galicia, al menos 700 granjas fueron afectadas a finales de 1997 (Fernández, 2006). El monitoreo reveló que de 1997 a 2002 más del 90% de las granjas de conejos franceses se vieron afectadas por EEC. Desde entonces, en Europa se ha informado en varios otros países, incluidos Gran Bretaña, Portugal, Hungría y Bélgica. En México, la EEC se observó por primera vez a fines de 2001 y principios de 2002, afectando a diferentes centros de producción, pero principalmente en conejos de entre 5 y 7 semanas de edad (Rodríguez-De Lara et al., 2008). La condición persiste en México, con estudios recientes que informan niveles variables de mortalidad en el rango de 30 a 70% (Pérez, 2013), y una incidencia de EEC de alrededor del 31% (Pérez et al., 2015).

2.5.2. Signos y lesiones

Los signos más comunes de la EEC son: distensión del abdomen, dilatación generalizada en el tracto gastrointestinal, parálisis cecal en algunos casos y presencia de moco abundante (Licois et al., 2000). Debido a la ausencia de inflamación y lesiones macroscópicas e histológicas (aparte de la hiperplasia de las células caliciformes en el intestino delgado), se utilizó el término enteropatía mucoide (Allen y Bryant, 2009; Licois et al., 2005; Pérez de Rozas et al., 2005). La EEC puede ser difícil de diagnosticar debido a la similitud de los signos entre esta y otras enteropatías (Licois et al., 2005). Durante los brotes de EEC, los conejos reducen su nivel de ingesta de alimentos y agua, y en casos extremos dejarán de comer y beber. Los conejos afectados muestran diarrea leve y moco translúcido (Dewrée et al., 2007; Pérez, 2013). Después de la necropsia de animales que murieron por la afección, los animales muestran el estómago y el intestino delgado distendidos con la presencia de contenido gaseoso y acuoso. En el ciego el moco translúcido y prominente (Fernández, 2006; Haligur et al., 2009; Dewrée et al., 2007). Además de los signos clínicos mencionados anteriormente, esta enfermedad se caracteriza por ciertas alteraciones químicas, como las secreciones de Clions en el pH del íleon y el colon (Dewrée et al., 2007). Hay una disminución en el pH del estómago, así como en parte del duodeno y la orina. Se cree que esta disminución del pH se debe a la

falta de alimentos en el estómago, mientras que el aumento del pH en el colon se debe a la disbiosis microbiana (Pérez de Rozas et al., 2005; Bäuerl et al., 2014).

Histológicamente, hay una reacción inflamatoria en la lámina propia; presencia de restos celulares y bacterias en la luz intestinal; presencia de enterocitos apoptóticos en las criptas y vellosidades; dilatación y congestión de los vasos sanguíneos en la lámina propia y en la submucosa (Dewrée et al., 2007). En los estudios donde la enfermedad se reprodujo con inóculo cecal, no se han reportado lesiones en otros órganos (p. ej., hígado, bazo, ganglios mesentéricos, timo, corazón, riñones, glándula suprarrenal), aparte de los relacionados con los corticosteroides, que se utilizan para inducir inmunosupresión antes de la inoculación (Licois et al., 1998). Las características de las lesiones en el intestino delgado desempeñaron un papel importante en la sugerencia de que el inicio etiológico de EEC involucraba un agente viral para explicar los signos clínicos (Licois et al., 2000). Se han realizado estudios para facilitar la comprensión de este síndrome. Por ejemplo, se ligó el intestino, siguiendo la técnica descrita para la reproducción de shigelosis en conejos (Arm et al., 1965). Esto implica atar segmentos de 15 cm del tracto intestinal con ligaduras e introducir inóculos. Esto dio lugar a lesiones similares a las de la enteritis mucoide que se observan de forma natural (Cheeke, 1995), con un aumento de la β -galactosidasa II y una disminución de la actividad de la β -galactosidasa en relación con animales sanos (Cheeke, 1995). Hubo una disminución en la actividad de la celulasa, la xilanasa y la enzima degradante de insulina, que se asocia con el cambio microbiano en la enfermedad natural (Bergdall y Dysko, 1994).

2.5.3. Etiología

El estudio de la EEC ha tenido como principal dificultad la reproducción del síndrome (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Huybens et al., 2013, Jin et al., 2018). El uso del inóculo desarrollado a partir del contenido cecal de conejos con EEC ha sido el método más efectivo para reproducir el síndrome (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Huybens et al., 2013) logrando infectar del 30 al 50% de conejos por grupo.

El factor fibra en la dieta ha logrado reproducir la enfermedad en 20% de los conejos expuestos a este factor (Jim et al., 2018). Otros estudios han optado por el uso de conejos enfermos detectados en granja (Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017) donde se ha reportado la EEC como un problema crónico.

Varios estudios han asociado diversos microorganismos a la EEC (Cuadro 17). Aunque no se ha dilucidado completamente el cuadro etiológico, no obstante, se ha considerado que existe un cambio en el perfil microbianos de los conejos que presentan este síndrome por lo que se le considera una disbiosis (Bäuerl et al., 2014, Abecia et al., 2017; Jin et al., 2018).

Cuadro 17. Agentes microbianos asociados a la EEC en estudios moleculares.

Agentes relacionados	Método	Tipo de muestra	Referencia
<i>E. coli</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Eimeria spp</i>	PCR	Contenido cecal.	Marlier et al., 2006.
<i>Enterococcus spp</i> <i>Sporobacter spp</i> <i>Ruminococcus spp</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Bacteroides spp</i> <i>Escherichia spp</i>	Pirosecuenciación	Inoculo cecal (TEC).	Huybens et al., 2013.
<i>Akkermansia muciniphila</i> <i>Bacteroides-Prevotella</i> <i>Clostridium coccoides</i> <i>Methanobrevi bacter</i>	Pirosecuenciación	Contenido cecal.	Bäuerl et al., 2014.
<i>Bacteroides</i> <i>Blautia</i> <i>Dorea</i> <i>Clostridia no clasificados</i>	Pirosecuenciación	Cecotrofo.	Abecia et al., 2017.
<i>Bacteroides</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Sphingomoas</i>	Illumina MiSeq	Cecotrofo.	Jin et al., 2018.

Por otra parte, se sabe que cuenta como una condición muy contagiosa con altos niveles de morbilidad y tiene valores de mortalidad que varían desde muy bajo (<10%) hasta muy alto (> 80%). Aunque ahora se cree generalmente que la causa está asociada con una o más especies bacterianas, originalmente se sospechaba que tenía un origen nutricional y, más recientemente, una causa viral (Licois et al., 2000; Boucher, 1998). La EEC se transmite horizontalmente a través del contacto directo oral-fecal (preparación oral) y oral-oral (socialización). Esto es un reflejo del contacto cercano que existe entre los

animales en las producciones de vivero (Lebas et al., 1996). Más recientemente se ha demostrado que la comida no era el factor causal primario, aunque puede desempeñar un papel facilitador (Licois et al., 2000; Dewrée et al., 2007), con niveles elevados de fibra asociados con una menor susceptibilidad. Por ejemplo, se ha demostrado que el nivel y el tipo de fibra incluidos en la dieta tienen una asociación con la afección (De Blas et al., 2002). Los cambios fisiológicos digestivos asociados con la composición de la dieta surgieron debido a una alta cantidad de carbohidratos solubles y una baja cantidad de fibra que aumenta el pH del ciego y disminuye la tasa de tránsito intestinal, lo que a su vez tiene un impacto en la población microbiana porque puede aumentar el pH cecal, y promueve una mayor detección de *Clostridium* spp. (De Blas et al., 2007), aumenta la producción de toxinas α que causan daño a la mucosa cecal y agravan los signos (Romero et al., 2011). Además, se ha demostrado que los animales con una dieta alta en proteínas tienden a tener síntomas de EEC más graves y agravados (Lleonart, 1990). Estudios recientes (Jin et al., 2018) informaron que una dieta baja en fibra lidera la incidencia de EEC y puede desarrollar la enfermedad. Sin embargo, por el momento no ha sido posible replicar la enfermedad basándose únicamente en la dieta, ya que los intentos de inducir EEC puramente por cambios en la dieta no han tenido éxito.

2.5.4 Tratamiento

Para controlar la EEC se han utilizado pocos antibióticos, entre los cuales se encuentran la bacitracina y tiamulina. La tiamulina es un antibiótico semisintético derivado de la pleuromutilina y su mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis de proteínas a nivel de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano siendo el único que se usa en los alimentos y que hasta la fecha está autorizado en Francia (Dip et al., 2015; Boisot et al., 2004). En cambio, la bacitracina que es un antibiótico producido por una mezcla de polipéptidos cíclicos de síntesis no ribosomal relacionados unos con los otros y producidos por cepas de la variedad Tracy de la bacteria *Bacillus subtilis* que puede adicionarse 100 ppm en los alimentos está prohibida (Boisot et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado a nivel experimental que la tilosina (antibiótico de amplio espectro del grupo de los macrólidos) tiene una buena respuesta en el control de la EEC cuando se asocia con apramicina, sin embargo, su uso es restringido (Dip et al., 2015).

Los antibióticos de amplio espectro pueden ser utilizados para controlar los signos de la EEC (Bäuerl et al., 2014), pero al mismo tiempo pueden provocar otra clase de disbiosis. Lo que reitera la conveniencia de buscar alternativas al uso de antibióticos.

2.5.4.1. Antibióticos: ventajas y desventajas

Se calcula que 70% de los medicamentos antibióticos que se suministran en Estados Unidos son para los animales destinados al consumo humano. La mayoría de estos fármacos no está dirigido al tratamiento de infecciones, sino como promotores del crecimiento de los animales. Según la FDA este "uso excesivo" está contribuyendo significativamente a la resistencia que las bacterias han desarrollado a estos medicamentos (Cancho et al., 2000). La tendencia actual se inclina por no usar medicamentos en la producción de alimento de consumo humano, y en la Unión Europea existen normas que prohíben su uso (Caja et al., 2003; Falcão et al., 2007).

Recientemente la Organización Mundial de la Salud declaró que la resistencia humana a los antibióticos está provocando que los medicamentos disponibles actualmente en el mundo sean inútiles. La Estrategia Mundial de la OMS (WHO, 2001; Willyard, 2017; WHO, 2018), para contener la resistencia a los antimicrobianos responde a esas preguntas y proporciona un marco de intervenciones destinadas a reducir la aparición y la propagación de microorganismos resistentes mediante las siguientes medidas:

- reducción de la carga de morbilidad y propagación de las infecciones;
- mejora del acceso a los antimicrobianos;
- mejora del uso de los antimicrobianos;
- fortalecimiento de los sistemas de salud y de su capacidad de vigilancia;
- cumplimiento de los reglamentos y de la legislación;
- fomento del desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas.

Sin embargo, cada vez hay un número mayor de reportes sobre bacterias resistentes a los antibióticos en poblaciones animales y humanas lo que ha generado cuestionamientos sobre el uso continuado de estos antibióticos, tanto como tratamiento para los humanos, como a manera de ingredientes en el alimento animal (Caja et al., 2003). Los consumidores han expresado su preocupación acerca de la posibilidad de residuos de

antibióticos en la carne y la leche. En consecuencia, los antibióticos se han restringido fuertemente e incluso prohibido en la Unión Europea y en otros países. India y China también están considerando restricciones (Uyeno et al., 2015).

2.5.4.2 Tratamientos alternativos a los antibióticos

Existen alternativas a los antibióticos para mantener la salud y el desempeño entre las que se encuentran las buenas prácticas de manejo, la bioseguridad y los procedimientos de higiene, los cuales pueden reducir el riesgo de infección en las granjas, disminuyendo así la necesidad de administrar tratamientos con antibióticos (WHO, 2001). Otra alternativa son los probióticos, que en varios estudios han demostrado ser efectivos como promotores de crecimiento y en la prevención de enfermedades gastrointestinales de monogástricos (Rolfe, 2000; Soltan y El-Katcha, 2001; Callaway et al., 2008).

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa "a favor de la vida" y actualmente se utiliza para designar los microorganismos que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales (FAO, 2006). Metchnikoff y Tissier hicieron los primeros estudios con respecto al uso de bacterias con efectos benéficos en 1907, aun cuando la palabra "probiótico" no se acuñó hasta 1960, posteriormente se definió como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta favorablemente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal" (Callaway et al., 2008; FAO, 2006).

Existe controversia en cuanto a la definición operativa de los probióticos (por ejemplo, tipo de microorganismos, si tenían que estar vivos o no), pero ampliamente se ha aceptado como la preparación de microorganismos vivos, que cuando se administra en cantidad adecuada, tiene efectos beneficiosos sobre la salud de la persona o animal (Falcão et al., 2007; Callaway et al., 2008). Es evidente que estas definiciones han circunscrito la utilización del término probiótico a los productos que contienen microorganismos vivos e indican la necesidad de proporcionar una dosis, constante y apropiada de bacterias probióticas para obtener los efectos deseados (FAO, 2006).

Los mecanismos pueden variar de un probiótico a otro y pueden consistir en la combinación de eventos, resultando su estudio muy problemático y complejo. Tales mecanismos pueden estar relacionados con la producción de uno o varios metabolitos o enzimas específicos que actúan directamente sobre uno o más microorganismos, pero

también existe la probabilidad de que el probiótico sea la causa de que el organismo produzca la acción beneficiosa (FAO 2006).

De manera general se sugiere un número de posibles mecanismos de acción de los probióticos son: 1) reducción de reacciones metabólicas que producen sustancias tóxicas, la estimulación de enzimas del huésped, 2) la producción de vitaminas o sustancias antimicrobianas, 3) la competencia por la adhesión a células epiteliales y 4) un aumento de la resistencia a la colonización y la estimulación del sistema inmune del huésped (Uyeno et al., 2015).

Diferentes estudios han reportado diferentes mecanismos de acción de los probióticos basados en bacterias. Entre estos se encuentran la inducción un pH ácido por debajo de 4, en parte por la producción de AGV's como acetatos, butiratos, etc. Estos AGV's pueden llegar a unas concentraciones que impidan el crecimiento de microbios potencialmente patógenos. El pH ácido favorece el crecimiento de las bacterias tolerantes del ácido. Otros actúan produciendo gran cantidad de ácido láctico, como *Lactobacillus salivarius*, que ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* y en la reducción de la inflamación de la mucosa gástrica (Tormo, 2006). También se reporta que los lactobacilos y bifidobacterias promueven la maduración del intestino y su integridad. Son antagonistas de patógenos y contribuyen a la modulación de la inmunidad intestinal (Schiffrin y Blum, 2002). Adicionalmente, se ha reportado que *Lactobacillus* posee la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos, afectando a la composición del ecosistema intestinal, incrementando el efecto barrera no dependiente del sistema inmunológico (Sun et al., 2007). En ocasiones compiten con diversos patógenos en su adhesión al epitelio por medio de ciertos determinantes adhesivos. Sin la capacidad de aumentar la expresión de las mucinas ileocolónicas MUC2 y MUC3, coadyuvando al recubrimiento del intestino de una capa de moco, mecanismo inespecífico, pero muy eficaz de la lucha antibacteriana (Tormo, 2006).

Las bacterias probióticas tienen mecanismos de acción que influyen y modulan algunas respuestas inmunitarias, debido a la estrecha relación que tienen con el tejido linfoide asociado a la mucosa del intestino (Carabaño et al., 2008, Tormo, 2006). Estimulando la

producción de interferón gamma (IFN), la producción de IFN- α por los macrófagos y el estímulo de las células Th 1 (FAO, 2006).

Diversos estudios han reportado un efecto positivo en el crecimiento y la salud de conejos suplementados con probióticos (Trocino et al., 2005; El-Katch et al., 2011; Ezema y Eze, 2012; Kimsé et al., 2012). No obstante, hasta el momento no hay estudios evaluando el efecto de los probióticos en conejos con EEC.

2.6. Los carbohidratos estructurales de origen vegetal en la dieta del conejo como tratamiento para la Enteropatía Epizoótica del Conejo

Tanto nutriólogos como microbiólogos han comprobado que existe una estrecha relación entre los nutrientes adquiridos de la dieta, la microbiota y la salud del tracto gastro intestinal (Lovegrove et al., 2015; Martin y Nisbet, 1992; Krause et al., 2003; Gidenne et al., 2012). Por lo que han dirigido sus investigaciones a la manipulación del ecosistema microbiano del tracto gastrointestinal para mejorar la eficiencia de la producción y la salud de los animales domésticos y el hombre.

La disbiosis intestinal es una causa importante de progresión de la enfermedad y los síntomas gastrointestinales experimentados en individuos con trastornos digestivos inflamatorios (Wong et al., 2016). Aunque las terapias farmacológicas actuales pueden paliar y disminuir significativamente los signos de la enfermedad, no hay cura para dichas enfermedades. Sin embargo, los estudios continuos que investigan las intervenciones dietéticas diarias pueden resultar potencialmente eficaces para el control de signos en enfermedades gastrointestinales (Pituch-Zdanowska et al., 2015; Wong et al., 2016).

Los mecanismos postulados incluyen interacciones directas con la mucosa intestinal mediante inmunomodulación, o indirectamente a través del microbioma (FAO, 2006; Wong et al., 2016). Las especies componentes del microbioma pueden degradar los carbohidratos de la fibra y fermentar los productos para formar AGV's tales como el o los butirato(s) (Combes et al., 2013; Gidenne et al., 2012).

La mayoría de los estudios han utilizado suplementos de fibra que no eran de un solo tipo de fibras, sino más bien mezclas de diferentes fuentes de fibra. Los diferentes grados de disbiosis pueden contribuir a la disparidad de los resultados de los estudios. Parecería improbable que la intervención de la fibra fuera eficaz en el mantenimiento de la

recuperación de la enfermedad. Sin embargo, en ciertos tipos de disbiosis, el uso de antibióticos parece apropiado para ayudar a controlar los signos de la enfermedad (Combes et al., 2013; Simpson et al., 2015; Wong et al., 2016). Por lo tanto, los investigadores que utilizan la formulación de dietas deberían tener cuidado en mantener el porcentaje adecuado de inclusión de la fibra en la dieta, debido a que la fibra se obtiene de alimentos enteros o se administra en forma de suplemento alterado (Pituch-Zdanowska et al., 2015).

Las dietas altas en leguminosas están asociadas con una mayor diversidad microbiana y un predominio de *Prevotella* sobre *Bacteroides*. Las dietas ricas en carbohidratos solubles disminuyen los beneficios de las bacterias celulolíticas y aumentan las proteobacterias asociadas a las mucosas (incluidos los patógenos entéricos) (Simpson et al., 2015). Las dietas a corto plazo también pueden tener efectos importantes, particularmente aquellas exclusivamente basadas en animales, y aquellas dietas ricas en proteínas y de baja fermentabilidad, que aumentan la abundancia de *Bacteroides* y disminuyen *Firmicutes* (Combes et al., 2013; Adjiri et al., 1992), con una adherencia a largo plazo aumentando el riesgo de enfermedad del colon.

Existen tratamientos para prevenir la inflamación intestinal con fibras probióticas fermentables que potencian las *Bifidobacterias* beneficiosas o con fibras solubles que bloquean la adherencia bacteriano-epitelial (Simpson et al., 2015). Estos mecanismos pueden explicar muchas de las diferencias en la microbiota asociada con la ingestión a largo plazo de una dieta rica en fibras de frutas y hortalizas.

En conejos De Blas et al. (2002) reportan que el uso de diferentes niveles y fuentes de fibra muestra una tendencia lineal hacia una menor mortalidad, lo cual podría deberse a una mayor velocidad de tránsito digestivo y de renovación de la digesta en el ciego y/o por un cambio en las condiciones del medio cecal, es decir, mayor acidez y concentración de ácidos grasos volátiles y/o por una disminución (De Blas et al., 2002).

En el caso de la calidad de la fibra en la dieta sobre la mortalidad en el período de engorda Kovitvadhí et al., (2016) sustituyó la fuente de fibra soluble (pulpa de remolacha, cascarilla de soja) por fuentes de fibra larga lignificada (paja, granilla de uva, cascarilla de girasol). Los resultados indican que la mortalidad tiende a reducirse linealmente cuando se incrementa la proporción de las fuentes de fibra más lignificadas y fue atribuido

a la disminución del tiempo de permanencia del contenido en el ciego (De Blas et al., 2002).

Por lo que, en la producción cunícola los síndromes digestivos tienen un impacto negativo repercutiendo la ganancia económica. La EEC es un síndrome disbiótico del cual se desconoce la etiología y se le atribuyen diversos factores como el manejo y la nutrición. La aproximación que se le ha dado a esta enfermedad en los últimos años haciendo uso de la secuenciación masiva ha revelados el desequilibrio de en grupos bacterianos en el ciego de conejos con este síndrome. Uno de los tratamientos que se ha propuesto para mitigar los signos de la EEC es la inclusión de un nivel alto de fibra y de lignina (como indicador de fibra larga) minimiza la incidencia de problemas digestivos en conejos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que dietas con estas características no contribuyen al metabolismo cecal por lo tanto, suponen una baja en la eficacia alimenticia. No obstante, Jin et al., 2018, reportaron que la reducción de la fibra detergente neutro, produce el síndrome en el 20% de los conejos expuestos a esta dieta. . Lo anterior propone que los CEOV tienen un papel determinate en la presentación y control de la EEC, el presente trabajo aporta un perfil microbiano de la EEC haciendo uso de la secuenciación masiva y compara el efecto del aumento de FDN en la dieta en el perfil microbiano, la producción de AVG y los signos en conejos con EEC.

3. Hipótesis

El incremento de fibra detergente neutro en la dieta de conejos con el síndrome EEC tendrá un efecto positivo, disminuyendo los signos clínicos, mejorando así los parámetros productivos y cambiando el perfil microbiano del ciego.

4. Objetivos

Objetivo general

Determinar los microorganismos asociados a la EEC, así como la influencia de la inclusión de fibra insoluble sobre la microbiota gastrointestinal y los parámetros productivos de conejos infectados con enteropatía epizoótica del conejo (EEC).

Objetivos particulares

1. Identificar los microorganismos asociados a la EEC.
2. Evaluar el efecto del tratamiento sobre la fermentación y microbiota cecal en el conejo.
3. Determinar la influencia de la suplementación de fibra insoluble sobre los parámetros productivos.

5. Material y métodos

Para el desarrollo del presente trabajo se llevaron a cabo dos experimentos, el primero cual tuvo como finalidad comparar el perfil microbiano de conejos sanos y sospechosos a EEC producidos en una granja comercial y el segundo observar el efecto del aumento de FDN en la dieta sobre la microbiota, el metabolismo cecal y la salud de conejos con EEC. A continuación se describirán las consideraciones de la investigación y posteriormente cada experimento.

5.1. Consideraciones éticas

El protocolo experimental de esta investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, con el número de registro 93FCN2016 (Anexo A1).

5.2. Estudio metataxonómico de la Enteropatía Epizootica del Conejo

5.2.1. Localización e instalaciones

El experimento se llevó a cabo en una granja de producción cunícola comercial (Granja 1) Localizada en Jariepo, municipio Charo al norte del Estado de Michoacán en las coordenadas 19°45' de latitud norte y 101°03' de longitud oeste, a una altura de 1,900 metros sobre el nivel del mar, con clima templado con precipitaciones en verano de 1,145.5 milímetros y temperaturas que oscilan de 34.5 a 36.4°C.

Esta granja es privada y tiene como propósito la producción de carne de conejo para la venta en canal y la elaboración de subproductos como el jamón y embutidos varios; también tiene la función de granja de enseñanza, ya que el manejo de la unidad es realizado por alumnos, de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La producción usa jaulas tipo americana (80x60x40cm), con comedero manual y bebedero automático cada una. Dichas jaulas tienen un acomode de flatdeck.

5.2.2. Animales experimentales

5.2.2.1. Formación de los grupos experimentales

En la Granja 1 se realizó el diagnóstico de 6 conejos de 42 días de edad, con un peso de 449.16 g en promedio, así como la obtención de 6 conejos de la misma edad y sistema productivo (alimentación y manejo) sin presencia de signos clínicos de ninguna enfermedad y en aparente estado de buena salud y un peso promedio de 483.5 g.

Los conejos seleccionados se colocaron en jaulas individuales en 2 grupos: sanos y EEC positivos. Los grupos se alojaron en la zona de cuarentena de la misma granja en Morelia. Los animales diagnosticados con EEC se obtuvieron de acuerdo a un protocolo de diagnóstico clínico de la enfermedad, así como una necropsia para dar el diagnóstico definitivo de acuerdo a lo descrito en la sección 5.2.2.1.

La eutanasia de los animales se realizó conforme a lo descrito en la sección 5.2.2.1. Al grupo sano se le realizó la eutanasia y muestreo en la zona de rastro de la granja. Posteriormente, se realizó la limpieza y desinfección de las instalaciones y del material. A continuación, se prosiguió con el grupo EEC con el mismo manejo.

5.2.2.1. Protocolo de diagnóstico de Enteropatía Epizootica del Conejo

El diagnóstico de la enfermedad se realizó mediante el historial clínico de cada granja, registro de cada unidad productiva, y seguido por un diagnóstico clínico por parte del Médico veterinario responsable del proyecto en la búsqueda de signos clínicos: moco traslucido en heces, diarrea, abultamiento del abdomen, baja en el consumo de alimento y bruxismo (Licois et al., 2000; Pérez, 2013). Para considerar a los conejos sospechosos al síndrome EEC, estos debían presentar los siguientes síntomas: moco traslucido y abultamiento del abdomen. El diagnóstico definitivo se hizo mediante de la necropsia de animales con los signos clínicos, buscando moco traslucido en intestino grueso e impactación del ciego.

5.2.2.3. Eutanasia de animales experimentales

La eutanasia de los conejos de los conejos experimentales se llevó a cabo conforme a lo mencionado en la NOM-062-ZOO-1999, por medio de dislocación cervical por tracción mecánica y exanguinación yugular, ya que los conejos en este experimento pesaron menos de 1 kilo antes de la eutanasia.

5.2.4. Dieta

Los conejos fueron lactados durante 30 días en camada y posteriormente recibieron alimento para engorda (Conejina Turbo, Purina, Nestle S.A. México) *ad libitum* durante 12 días posterior al destete (Cuadro. 18)

Cuadro 18. Ficha técnica de la composición químico proximal de Conejina Turbo (Nestle Purina PetCare Company)

Ficha de análisis de nutrientes Conejina Turbo	
Nutriente	%
Proteína	16.0 mínimo
Grasa	3.0 mínimo
Fibra	17.0 máximo
Cenizas	10.0 máximo
Humedad	12.0 máximo
Elementos libres de nitrógeno	42.5
Calcio	1.0
Fosforo	0.55

5.2.5. Parámetros productivos

Solamente se obtuvo peso a los 42 días de edad mediante mediante una báscula (báscula pediátrica digital 20 kg, Maico, México) y el uso de cajas plásticas previamente taradas (Figura 15).



Figura 15. Pesaje de conejos durante el periodo experimental.

5.2.6. Muestreo

5.2.6.1 Obtención y manejo del contenido cecal

Al momento de la eutanasia de los conejos, se realizó una incisión en la parte abdominal para exponer el estómago, intestino delgado, ciego e intestino grueso. Se realizó una ligadura en la porción final de intestino delgado y otra al finalizar la válvula íleo cecocolica, posteriormente se realizaron 2 ligaduras para el corte, una 0.5 cm antes de la

ligadura del intestino delgado y otra 0.5 cm después de la ligadura de la válvula íleo-cecólica y se procedió al corte entre ambas ligaduras.

En un tubo plástico de 15 ml libres de ARNasas y ADNasas se vertió todo el contenido del ciego liberando la ligadura del intestino delgado, una vez que se llenó el tubo se almacenó inmediatamente a -20 °C para su conservación y transporte al laboratorio de Microbiología Veterinaria, de la FCN, UAQ, donde fueron almacenadas a -80 °C.

5.2.6.2. Obtención y manejo de tejido cecal e intestinal

Para la obtención de tejido intestinal se realizó una ligadura al comienzo de la válvula íleo-cecal, otra a 10 cm después de la ligadura del intestino delgado (inicio del colon) y una más a 3cm de la ligadura anterior. Se realizaron cortes para obtener la válvula íleo-cecólica y el colon ligados, los cuales fueron limpiados con PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₂) y después infiltrados con formol bufferado (pH 7) al 10% y sumergidos en frascos con el mismo formol.

En el caso del ciego, se realizó un corte longitudinal y se lavó con PBS, posteriormente se fijó con alfileres a círculos de corcho de 2 cm de diámetro y se sumergió en frascos con formol bufferado (pH 7) al 10%. De esta manera se obtuvieron muestras de ciego, válvula íleo-cecólica y colon. Los frascos fueron almacenados en una hielera sin refrigerantes y trasladados al laboratorio de Nutrición Animal, FCN, UAQ para su posterior análisis.

5.2.7. Analisis de las muestras

5.2.7.1 Extracción de DNA

La muestra de contenido cecal se descongeló en hielo. Se colocó 1.5 ml de contenido cecal un tubo de 2ml libre de ADNasas y RNAsas. Se cubrió con papel parafilm. Se perforó con una aguja estéril. El tubo se colocó dentro de un matraz (Matraces Fast-Freeze™, Labconco™, Kansas Estados Unidos de América). El matraz se refrigeró por 24 h a 0°C. El matraz refrigerado se colocó en la liofilizadora (FreeZone™ Freeze-Dry Systems 4.5L, Labconco™, Kansas Estados Unidos de América) durante 48h para su desecación.

La muestra liofilizada se usó para obtener ADN con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo Holanda). De acuerdo al siguiente protocolo, que se describe a

continuación. En un tubo de 2ml libre de ADNAsas y ARNAsas se pesaron 200 mg de perlas de cristal de 0.1 mm. Se adicionaron 50 mg de muestra liofilizada. Se añadió 1.4 ml de solución Buffer ASL. Se agitó por vortex durante 1 minuto. El tubo se calentó durante 5 min a 95°C. La homogenización se hizo mediante vortex durante 15 s. Posteriormente, se centrifugó a 13100 RPM durante 1 min, se transfirió 1.2 ml del sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml y se desechó el pellet. En el nuevo tubo se añadió 1 pastilla InhibitEX y se homogenizó con vortex por 1 min. El cual se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 5 min a 13100 RPM. En un tubo de 1.5 ml nuevo se transfirió 15 µl de proteinasa K, 200 µl del sobrenadante obtenido y 200 µl de solución Buffer AL. Posteriormente, se agitó por 15 seg, se incubó a 70 °C por 10 min. Se añadió 200 µl de etanol absoluto (96%) y se agitó con vortex. Se pipeteo la solución anterior en las columnas QIAmp (600µl) y se centrifugó por 1 min a 13100 RPM. Se desechó el tubo y se conservó la columna. Al finalizar, se llevo a cabo la purificación, agregando 500 µl de la solución Buffer AW1 y se centrifugó por 1 min. Se agregaron 500 µl de la solución AW2 a la columna y se centrifugó por 3 min. Se retiró el líquido y se volvió a centrifugar por 1 min conservando al final la columna. La elución del DNA se hizo agregando 200 µl de solución Buffer AE, se centrifugó por 1 min y se desechó la columna y el tubo con el ADN se almacenó a -20°C.

5.2.7.1.1. Concentración e integridad de ADN

La concentración y la pureza del ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América).

Para la integridad del DNA, se realizó mediante electroforesis vertical, utilizando geles de agarosa al 1%, donde se colocaron 2 µl de agente fluorescente (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, Fremont California, Estados Unidos de América) por 4µl de ADN y se corrieron a 70 volts durante 30 min, posteriormente fue visualizado en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos de América).

5.2.7.2. Secuenciación masiva

La secuenciación masiva del ADN del contenido cecal obtenido del muestreo del se realizó de forma comercial por parte de la empresa ZYMO con la plataforma de segunda

generación de secuenciación de ADN MiSeq® system (Illumina, San Diego California, Estados Unidos de América) donde se analizó la región V3-V4 del gen 16S rRNA.

La concentración del ADN de cada muestra fue de 50ng/μl. Cada muestra se colocó en tubos para PCR libres de ADNAsas y RNAsas estériles e identificados con números consecutivos en la tapa. Los números se incluyeron en una relación que contenía la información de cada muestra: origen de la muestra (contenido cecal de conejo) grupo al que pertenecía (sano o enfermo), concentración (ng/μl). Los tubos fueron almacenados en una hielera junto con refrigerantes y enviados al laboratorio Zymo Research Corp Irvine California Estados Unidos de América.

5.2.7.3 Análisis bioinformático

Los archivos obtenidos de la plataforma de segunda generación de secuenciación del fueron analizados por la empresa Zymo Research Corporation siguiendo el protocolo de la plataforma QIIME2, y se aplicó la metodología de Hall y Baiko (Hall y Beiko, 2018), la cual consiste en:

5.2.7.3.1 Visualización de la calidad de las secuencias

El comando muestra las primeras 10,000 secuencias de cada muestra. Posteriormente el comando para las secuencias (forward y reverse) y genera un índice de calidad basado en la posición de las bases apareada. La calidad de las secuencias junto con el tamaño de las mismas generó un punto de corte (Roser et al., 2019).

5.2.7.3.2. Eliminación de ruido (Denoising) con el algoritmo DADA2

El punto de corte generado en el paso anterior permitió el uso del algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016). Se produjeron 2 autoconocimientos computacionales: K-mers y tamaño de banda alineada. Se generaron diversas divisiones de secuencias únicas con su abundancia y calidad. La secuencia más abundante se comparó con todas las secuencias únicas y se formaron grupos de semejanza. Cada secuencia única generó un valor de P.

El valor de P menor generó una nueva división. La nueva división se comparó con todas las secuencias únicas y se formaron nuevas divisiones con las secuencias únicas que tenían la mayor probabilidad de pertenecer al grupo generado por el valor de P menor. El proceso anterior se repitió hasta lograr que el p-value de las abundancias de las secuencias únicas sobrepasara el límite OMEGA_A (Callahan et al., 2016).

El comando produjo 2 tablas: tabla BIOM (Biological Observation Matrix) y la tabla HDF5 de base estándar.

5.2.7.3.3. Filtro de secuencias

La información obtenida con el algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016) se generó y aplicó una tabla de filtro. La tabla de filtro excluyó las secuencias que no coincidieron en la prueba anterior. En la tabla de filtro también se incluyeron las secuencias que presentaban quimeras. Al finalizar el filtro se generó un reporte indicando las secuencias que fueron incluidas y las secuencias que fueron excluidas.

5.2.7.3.4. Clasificación taxonómica

Las secuencias incluidas después del paso anterior se clasificaron haciendo uso de las bases: silva_nr_v132_train_set y silva_species_assignment_v132.

5.2.7.3.5. Construcción filogenética

La construcción del árbol filogenético se generó con el algoritmo de UniFrac. Primero se realizó un alineamiento múltiple y se excluyeron los alineamientos que no tuvieran mínimo un 40% de bases conservadas. Posteriormente se construyó el árbol filogenético con las secuencias incluidas y el algoritmo Fast Tree. Por último se colocaron las “raíces” al árbol y se generó la representación gráfica.

5.2.7.3.6. Prueba de diversidad entre grupos

Con los objetos construidos en los pasos anteriores (tabla de OTUS, tabla de asignación taxonómica y árbol filogenético) se realizó el cálculo de los índices de diversidad. Los algoritmos usados fueron: Simpson, Shannon Chao1 y Fisher (Oksanen et al., 2019).

5.2.7.3.7. LEfSe (Análisis lineal discriminatorio del efecto tamaño)

Las tablas de OTU's y abundancias se usaron para el cálculo de LEfSet (Segata et al., 2011). Se usó la información de metadata (enfermos vs sanos). Posteriormente se generaron los biomarcadores de cada clase y la visualización de los OTU's representativos.

5.2.8. Diseño experimental

El diseño experimental fue totalmente al azar con un análisis ANOVA de una vía (Wayne 2002), con el siguiente diseño: $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$ el cual se analizó mediante el software IBM SPSS Statistics para Windows (Versión 19.0. Armonk, NY: IBM Corp).

5.3. Influencia de fibra detergente neutro en la salud y la microbiota de conejos con Enteropatía Epizoótica.

5.3.1 Localización e instalaciones

El experimento 2 se llevó a cabo en un área designada como unidad de experimentación cunícola no. 2, localizada en el campus Amazcala el cual pertenece a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. La cual está ubicada en Amazcala, Municipio del Marqués, a los 20° 42' 40.8 N y 100° 15' 24.7" O con altura de 1930 msnm; con clima de tipo templado semi seco con precipitación anual promedio de 400 a 500 mm³ (INEGI, 2011).

La caseta contó con malla mosquitera en ventanas, ventilación manual (apertura de ventanas). Se hizo uso de jaulas tipo americana con medidas de 90 cm de ancho, 60 cm de largo y 40 cm de altura (Figura 14).



Figura 14. Jaula tipo americana, para la engorda de conejos en sistema semi-intensivo.

Dichas jaulas fueron colocadas en batería con módulos de 2 jaulas y 2 módulos por grupo experimental. Cada jaula contó con 1 bebedero automático con toma de chupón y 2 comederos tipo tolva en forma de J; la cual tenía su charola metálica de recolección de heces, orina y desperdicio de alimento.

5.3.2. Animales experimentales

5.3.2.1. Formación de los grupos experimentales

Los conejos elegidos para formar los grupos experimentales, fueron obtenidos de una granja de producción comercial (Granja 2) localizada en Tláhuac, Ciudad de México. En el cual se realizó el diagnóstico de 8 conejos de 30 días de edad, con signos presuntivos de EEC y un peso promedio de 450.13 g. Así mismo, se obtuvieron 8 conejos del mismo

sistema productivo (alimentación y manejo) que no presentaran signos clínicos de ninguna enfermedad, en aparente buen estado de salud y un peso promedio de 628.20g. Los conejos seleccionados se trasladaron y alojaron en la unidad de experimentación no. 2 de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. Donde se alojaron cuatro grupos de 4 conejos de raza Nueva Zelanda de 30 días de edad en 4 jaulas tipo americana (90X60X40) equipadas con comedero y bebedero. Las dietas experimentales (ver sección 5.3.3) fueron administradas *ad libitum* a cada grupo.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

EEC-31%: Los animales sanos con dieta control (FDN 31%).

EEC-36%: Los animales sanos con dieta experimental (FDN 36%).

EEC+31%: Los animales positivos a EEC con dieta control (FDN 31%).

EEC+36%: Los animales positivos a EEC con la dieta experimental (FDN 36%).

5.3.2.2. Protocolo de diagnóstico de EEC

Los conejos diagnosticados con EEC y escogidos para este experimento fueron identificados mediante el protocolo descrito en la sección 5.2.2.1., pero sin el diagnóstico definitivo (necropsia).

5.3.2.3 Criterios de bienestar animal

Para el experimento, el dolor y sufrimiento de los animales fue evaluado de acuerdo a lo establecido por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal, Universidad de Zaragoza (Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal 2013), donde se evalúan signos indicativos de dolor y su escala (0-3= normal, 4-7= falta de confort o dolor; 8-11= sufrimiento y 12-15= dolor grave), los animales que obtuvieron una calificación entre 8 y 11 fueron eutanasiados.

En paralelo a esto se llevó un registro de la presencia de signos clínicos en ambos grupos.

5.3.2.4. Eutanasia de animales experimentales y manejo de cadáveres.

Al finalizar el experimento, los conejos que presentaron algún signo de enfermedad, se les realizó la eutanasia conforme a la norma NOM-033-ZOO-1995, por medio de dislocación cervical por tracción mecánica y exanguinación yugular ya que los conejos pesaron más de 1 kilo al momento de ser eutanaciados. Los cadáveres fueron manejados

como residuos peligrosos como lo indica la NOM-087-ECOL-SSA1- 2002. En el caso de los conejos sanos fueron donados a la unidad productiva de conejos de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro después de una cuarentena de 30 días.

5.3.3. Dieta

Las dietas experimentales fueron elaboradas para cubrir los requerimientos nutricionales recomendados para la salud gastrointestinal del conejo (Gidenne et al., 2010) y para el tratamiento recomendado para la EEC (Xiccató et al., 2008). Por lo que se elaboraron dos dietas con los mismos valores nutricionales, una con fibra detergente neutro de 31% (Dieta control) y otra con 36% (Dieta experimental),

Las dietas se formularon con los mismos ingredientes: Harina de alfalfa, pasta de canola, salvado de trigo, harina de girasol, sal común, carbonato de calcio, vitaminas y minerales, los cuales se compraron en forrajas cercanas al campus Amazcala. En el caso de la harina de alfalfa se elaboró en el campus Amazcala moliendo pacas de alfalfa hasta lograr la textura de harina (criba no. 10, 5, 1).

Las dietas 31% y 36% fueron analizadas con un análisis químico proximal (Cuadro 19).

Cuadro 19. Composición de ingredientes y análisis químico proximal de las dietas.

Composición de ingredientes			Análisis químico proximal*		
	Dieta 31 (%)	Dieta 36 (%)		Dieta 31 (%)	Dieta 36 (%)
Harina de alfalfa	51.9	45.9	Materia seca	91.15	91.26
Pasta de canola	39.66	39.66	Fibra detergente neutro	31.67	35.78
Salvado de trigo	6	12	Fibra cruda	17.65	17.83
Mezcla de vitaminas y minerales	1.26	1.26	Proteína cruda	15.79	16.03
Harina de girasol	0.68	0.68	Cenizas	8.81	8.64

Sal común	0.50	0.50			
-----------	------	------	--	--	--

*Datos obtenido en el Laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente a la Universidad Autónoma de Querétaro (Siguiendo lo establecido en los manuales de la AOAC, 2010, Möller, 2014).

5.3.3.1 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de las dietas experimentales se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente a la Universidad Autónoma de Querétaro. Siguiendo lo establecido en los manuales de la AOCC (AOAC, 2010).

5.3.4. Parámetros productivos

Los variables productivas obtenidas fueron las siguientes: peso de inicio (g), peso de crecimiento (g, cada tercer día), peso de finalización (g), consumo aparente de alimento (g/día/jaula), morbilidad, mortalidad y presencia de signos relacionados a EEC (abultamiento abdominal, diarrea y moco traslúcido en heces).

5.3.5 Muestreo y análisis de las muestras

5.3.5.1. Obtención y manejo de cecotrofos y heces

Las muestras de cecotrofos y heces se obtuvieron al finalizar el experimento día 70 (Licois et al., 2005). Para esto se colocaron dos conejos por jaula con una división plástica entre ambos. A cada conejo se le colocó un collar cónico de poliuretano desde (6 cm de diámetro angosto y 27cm de diámetro ancho) desde las 7:00 a las 11:00 am (Rodríguez-Romero et al., 2012). Los cuales se colocaron y fijaron al cuello de los conejos de 7:00 a 11:00 am. Se usaron charolas plásticas desinfectadas con cloruro de benzalconio al 2% y recubiertas con bolsas plásticas. Una vigilancia continua se llevo a cabo en espera de la expulsión del cecotrofo limpio, (cecotrofos o heces que tenían contacto con la orina fueron descartados). La colecta de las muestras se realizó con pinzas sin dientes y guantes. Las pinzas fueron lavadas y desinfectadas entre cada muestra recolectada y los guantes fueron sustituidos de igual manera.

La primer muestra colectada se colocó en tubos de 1.5 ml libres de ADNAsas y RNAsas y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, para su conservación y transporte al laboratorio de Microbiología Veterinaria, de la FCN, UAQ, donde fueron almacenadas a

-80 °C. La segunda muestra colectada se colocó en una bolsa individual y se pesó. La tercera muestra se usó para determinar el pH (ver sección 5.12.1.).

La colecta de las heces se realizó de la misma manera y de forma paralela a la recolección de los cecotrofos. No se realizó la determinación de pH en las heces.

5.3.2 Análisis de las muestras

5.3.2.1 Extracción de ADN

Las muestras de cecotrofos y heces previamente congeladas en los tubos fueron descongelados en hielo y colocados en tubos limpios libres de ADNasas y RNAsas. Para la extracción de ADN se usó el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo Holanda).

En el laboratorio, se realizó el procedimiento anterior (ver sección 5.2..) con las siguientes modificaciones: Se pesaron 220 mg de En una placa caliente se incubó por 5 min (cronometro) a 70 °C. Se centrifugó a 14,000 rpm.

El ADN extraído de cada muestra fue cuantificado y visualizado para observar su integridad de acuerdo a lo descrito en la sección 5.2.7.1. Posteriormente fue almacenado a -20 C, en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ hasta su envío a la empresa INMEGEN.

5.3.2.2. Secuenciación Masiva

La secuenciación masiva del ADN obtenido se realizó mediante la plataforma de segunda generación de secuenciación MiSeq® system, (Illumina, San Diego California, Estados Unidos de América) donde se identificó la región V3-V4 del gen 16S rRNA por la Unidad de Secuenciación e Identificación, Polimorfismos Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México.

La concentración del ADN de cada muestra fue de 20ng/μl, cada muestra se colocó en tubos para PCR libres de ADNasas y RNAsas estériles e identificados con números consecutivos en la tapa. Los números se incluyeron en una relación que contenía la información de cada muestra: origen de la muestra (cecotrofos o heces) grupo al que pertenecía (EEC-31%, EEC-36%, EEC+31%, EEC+36%), concentración (ng/μl).

5.3.2.3. Análisis bioinformático

Los archivos obtenidos de la plataforma de segunda generación de secuenciación de este experimento fueron analizados de la siguiente manera:

Las secuencias obtenidas se procesaron filtrando las lecturas de baja calidad y recortando los adaptadores de la secuenciación y dejando lecturas de 480pb con Trimmomatic (Bolger et al., 2014) y se hizo una inspección de la calidad de los datos con FastQC, posteriormente se hizo uso del software R Project for Statistical Computing siguiendo la guía de trabajo propuesta por Callahan y colaboradores (Callahan et al., 2016). Para el análisis se usaron los siguientes paquetes: Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) (Callahan et al., 2016), DECIPHER (Murali et al., 2018), Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013), Microbiome, Vegan (Lahti y Shetty, 2019). y Ggplot2 (Wickham, 2011).

El protocolo que se llevó a cabo en el paquete DADA2 consistió en: filtrar, identificar secuencias únicas (Dereplication), construir tablas de unidades taxonómicas operacionales, remover secuencias quiméricas, asignar identificación taxonómica, determinar la abundancia y la diversidad.

5.3.2.3.1. Filtración (Filtering)

El primer comando consiste en el corte de las secuencias a un tamaño determinado. Posteriormente, se filtran las secuencias por: el número de ambigüedades, calidad y errores esperados en cada lectura. Solo las lecturas en las que ambas secuencias (forward y reverse) cumplan con lo anterior pasan el filtro (Callahan et al., 2016).

5.3.2.3.2. Eliminación de réplicas (Dereplication)

La función creó una lista de secuencias únicas junto con su abundancia. Eliminó las secuencias que no cumplieron con el promedio de calidad obtenido de la lista de secuencias únicas usando el modelo del error de los datos (Callahan et al., 2016).

5.3.2.3.3. Eliminación de ruido (Denoising)

El algoritmo que se aplicó fue algoritmo core denoising. Se produjeron 2 autoconocimientos computacionales: K-mers y tamaño de banda alineada. Se generaron diversas divisiones de secuencias únicas con su abundancia y calidad. Las secuencias más abundantes se compararon con todas las secuencias únicas y se formaron grupos de

semejanza. Cada secuencia única generó un valor de P. El valor de P menor generó una nueva división. La nueva división se comparó con todas las secuencias únicas y se formaron nuevas divisiones con las secuencias únicas que tenían la mayor probabilidad de pertenecer al grupo generado por el p-value menor. El proceso anterior se repitió hasta lograr que el valor de P de las abundancias de las secuencias únicas sobrepasara el límite OMEGA_A (Callahan et al., 2016).

Se eliminaron todas las secuencias que no lograron pasar el filtro K-mer y tamaño de banda de alineamiento.

5.3.2.3.4. Eliminación de Quimeras y Quimeras de dos padres (isBimeraDenovo)

La identificación de quimeras y bimeras (quimeras de dos padres) se realizó de las secuencias excluidas con la mayor abundancia. Las secuencias se alinearon y se excluyeron todas aquellas alineaciones con más de 4 nucleótidos de diferencias entre las secuencias derecha e izquierda (padres) y la secuencia hija (Callahan et al., 2016).

5.3.2.3.5. Alineación (Merging)

Las secuencias incluidas después del protocolo anterior fueron alineadas por pares (forward y reverse) y se unieron en una sola secuencia fusionada (Callahan et al., 2016).

5.3.2.3.6. Obtención de la asignación taxonómica y abundancia

La asignación taxonómica se llevó a cabo con el paquete DECIPHER. En este paso se incluyeron las bases de datos silva_nr_v132_train_set y silva_species_assignment_v132. Se generó una tabla taxonómica, una tabla de secuencias y una tabla de abundancia de secuencias (Murali et al., 2018).

Los archivos generados con los paquetes DADA2 y DECIPHER se unieron en un solo objeto phyloseq, mediante el paquete Phyloseq. A partir de este punto todos los análisis siguientes se llevaron a cabo con este objeto (McMurdie y Holmes, 2013).

Posteriormente, el archivo phyloseq se analizó con el paquete Microbiome y se generaron: tabla de abundancia con identificación taxonómica, tabla de normalización de abundancia y tabla de núcleo de microbiota (Lahti y Shetty, 2019).

El objeto phyloseq se usó para generar la visualización gráfica de: identificación taxonómica, índices de diversidad y abundancia con identificación taxonómica mediante el paquete ggplot 2 (Wickham, 2011).

5.3.2.3.7. Análisis de índices de diversidad

El análisis de la alfa y beta diversidad fueron obtenidos mediante el paquete Vegan lo cual generó los índices solicitados (Oksanen et al., 2019).

5.3.2.3.8. Análisis estadístico de las secuencias

Para la comparación de las secuencias identificadas por DADA2 se realizó una prueba PERMANOVA siguiendo la metodología descrita en el manual del paquete Vegan (Oksanen et al., 2019). En el caso del análisis de la diversidad bacteriana, esto se evaluó mediante el cálculo del índice de Shannon, el índice de Simpson, el índice de Chao1 y los estimadores de cobertura basados en la abundancia (ACE), siguiendo la metodología de propuesta en el manual de la paquetería vegan (Oksanen et al., 2019).

5.3.3. Análisis del metabolismo cecal.

La segunda y tercer muestra obtenida de los cecotrofos se utilizaron para el análisis del metabolismo cecal, para el cual se llevó la determinación del pH, los ácidos grasos volátiles y el amonio.

5.3.3.1. Determinación de pH de cecotrofos

Para medir el pH se tomaron 2 g, se le agregó 5 ml de agua destilada en un vaso de precipitado, se agitó y se midió con un medidor multiparamétrico de pH (Edge HI2020-01, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA)

5.3.3.2. Determinación de ácidos grasos volátiles

Para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV), se recogieron 2 g de muestra en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml con 5 ml de acetona de calidad para HPLC y 1 ml de agua de calidad para HPLC. Esto se mezcló mediante agitación en vórtex durante 15 segundos, seguido de la adición de 100 µl de ácido fosfórico [v / v] al 85% y la solución se mezcló nuevamente mediante agitación en vórtex durante 10 segundos y se centrifugó durante 23 minutos a 21.000 g a 4°C. El sobrenadante se separó pasando a través de un filtro de 0.20µm. El filtrado se colocó posteriormente en viales de color ámbar con una tapa para llevar a cabo el análisis de cromatografía líquida y se almacenó a -80°C hasta su uso. La cromatografía de líquidos se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con un detector de ionización de llama y una columna DB-FFAP de 30 mx0,25 mm x 0,25 m (Agilent Technologies, Wilmington, North Carolina, Estados Unidos de América), para el análisis del sobrenadante filtrado se utilizó una jeringa de

0,2 µm. filtro (12a). Las condiciones siguieron un modo de división (20: 1) con una temperatura de entrada de 220°C y una presión de 168 kPa. Se inyectó un volumen de 1 µl, con un flujo constante de 1,4 ml / min, utilizando helio como vehículo. La temperatura del detector fue de 250°C. La columna operó inicialmente a 35°C, con un período de mantenimiento de 30 seg, antes de aumentar a 10 ° C/m hasta alcanzar 90 ° C. Esta temperatura se mantuvo durante 2 min, y fue seguida por un aumento de 12 ° C/m hasta alcanzar los 230°C y se mantuvo durante 6 min.

5.3.3.3 Determinación de amonio

La determinación de amonio se hizo mediante el enfoque de Kjeldahl (AOAC, 2010). Inicialmente, se recogieron 2 g de cecotrofos y se colocaron en un matraz Kjeldahl al que se agregaron 200 ml de agua destilada a 20 ° C, seguido de la adición de 4 perlas de vidrio en ebullición de 3 mm de diámetro (PROLAB) y 2 g de MgO. Luego se destiló utilizando una tasa de recuperación de 99.5%. La solución se neutralizó mediante la adición de 20 ml de H₂O, 20 ml, 20 ml de NaOH, durante 4 minutos. Los productos del proceso de destilación se recogieron en matraces Erlenmeyer de 500 ml. A cada matraz se le agregaron 100 ml de H₃BO₃ al 2% y 3 gotas de solución indicadora (20 ml de rojo de metilo al 0,05% y 4 ml de azul de metileno al 0,2%) para garantizar que la solución fuera ahora neutra. Las titulaciones se realizaron utilizando H₂SO₄ 0,1 M, que se gotea con una pipeta graduada hasta que cambia el color de la solución indicadora. Estos valores se compararon con un blanco (es decir, sin cecotrofos), y el N% del valor de amoníaco se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1: } N\% = [(A-B) * 0.014 * N * 100] / M$$

Dónde: A y B son el número de ml de H₂SO₄ utilizado en la titulación de las muestras de control y cecotrofo, respectivamente, N es la normalidad de H₂SO₄ y M es el peso de la muestra de cecotrofos en gramos.

5.4. Análisis bioestadísticos

Para el análisis estadístico de ambos experimentos se utilizó el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

5.4.1. Diseño experimental

Para el análisis de los resultados obtenidos en la comparación de las dietas (control y experimental) versus el estado de salud (EEC positivos y sanos) se usó un diseño factorial 2X2 con un análisis ANOVA de una vía (Wayne 2002).

Para comparar la abundancia entre los grupos del experimento 1 y 2 se usó una prueba de PERMANOVA (ver sección 5.3.2.7).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. Resultados

6.1. Estudio metataxonómico de la Enteropatía Epizootica del Conejo

6.1.1 Lesiones histopatológicas y peso de animales experimentales

Los conejos sospechosos de EEC presentaron un peso promedio de 449.16 g, en cambio los conejos sanos tuvieron un promedio de 483.5 g, sin embargo no fueron estadísticamente significativos ($P > 0.05$). A la inspección, los conejos sospechosos presentaron residuos de heces diarreicas en la zona perianal (Figura 16), en cambio los conejos sanos no presentaron rastros de diarrea en la zona perianal (Figura 17). En la necropsia, el aspecto del tracto gastrointestinal los conejos positivos a EEC presentaron distensión por gas y líquido en el colon proximal, y se observó un cambio en la coloración del ciego (Figura 18). En cambio, los conejos sanos no presentaron ningún cambio en el aspecto del tracto gastro intestinal (Figura 19).



Figura 16. Inspección externa de conejo sospechoso a EEC. Se observa la presencia de diarrea en la zona perianal. Foto: Xiao-Haitzi Daniel Puón Peláez



Figura 17. Inspección externa de conejo sano. No presenta rastros de diarrea en la zona perianal. Foto: Xiao-Haitzi Daniel Puón Peláez



Figura 18. Exposición de intestino de conejo positivo a EEC. Colon proximal distendido, presencia de gas y líquido, ciego impactado. Foto: Xiao-Haitzi Daniel Puón Peláez



Figura 19. Exposición de intestino de conejo sano. Los órganos del tracto gastrointestinal presentan un tamaño y color normal. Foto: Xiao-Haitzi Daniel Puón Peláez

6.1.2 Análisis metataxonómico

Del contenido cecal de los conejos positivos a EEC se obtuvieron 115,534 secuencias, se identificaron 317 unidades taxonómicas operacionales (OTU) y 76 géneros bacterianos. De las muestras obtenidas de conejos sanos se reportaron 99,863 secuencias. Los OTU reportados fueron 279 y la asignación taxonómica fue de 81 géneros bacterianos (Cuadro 20). La curva de rarefacción presentó meseta en todas las muestras analizadas (Figura A2, Anexo).

Mayor diversidad y riqueza de la microbiota fue observada en los conejos sanos en comparación con los conejos positivos a EEC (Cuadro 20). Sin embargo, la mayor abundancia de secuencias identificadas se observa en las muestras de conejos positivos a EEC (Figura 20). Los phyla más abundantes en los conejos positivos a EEC fueron: Firmicutes, Bacteroides y Verrucomicrobia. Los phyla menos abundantes fueron: Tenericutes, Cyanobacteria y Euryarchaeota. No obstante, el phylum Synergistetes se observó solo en el grupo de conejos positivos a EEC. En cambio, los conejos sanos obtuvieron mayor abundancia en los phyla Firmicutes, Verrucomicrobia y Bacteroides; los phyla menos abundantes fueron Saccharibacteria, Cyanobacteria y Tenericutes. En

ambos grupos se obtuvieron secuencias no identificadas fueron 3505 para el grupo positivo a EEC y 2366 para el grupo de conejos sanos (Cuadro 21 y Figura 21).

Cuadro 20. Resumen de secuencias identificadas y comparación de índices de diversidad microbiana en las muestras de contenido cecal.

	EEC+	EEC-	Valor de P interacción
Número de secuencias	115,534	99,863	
Número de unidades taxonómicas funcionales (OTU)	317	279	
Número de géneros identificados	76	81	
Índice de Shannon	6.24 (0.18)	6.54 (0.04)	0.001
Índice de Simpson	0.95 (0.04)	0.97 (0.01)	0.001
Índice Inv de Simpson	30.12 (0.09)	43.54 (0.06)	0.001
Índice de Fisher	66.20 (2.19)	81.40 (0.80)	0.001
Índice de Chao1	304.98 (6.70)	275.86 (2.50)	0.002

EEC+: Conejos positivos a enteropatía epizoótica. EEC-: Conejos sanos.

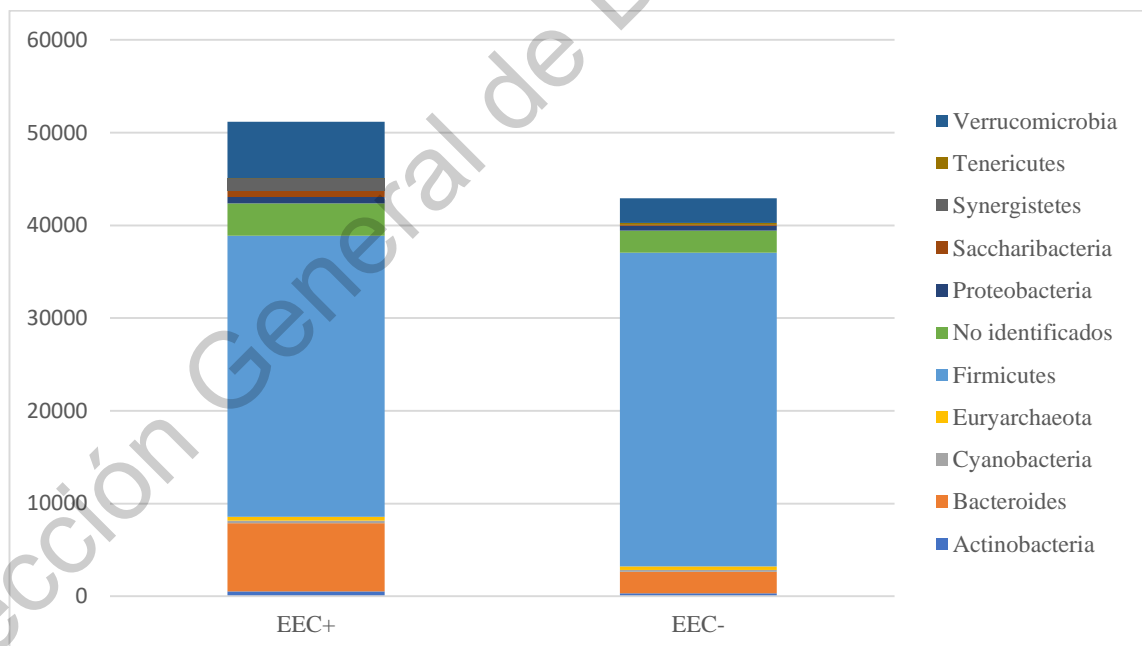


Figura 20. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales por grupos. Se muestran los phyla más abundantes conejos positivos a EEC vs conejos sanos. EEC+: Conejos positivos a enteropatía epizoótica. EEC-: Conejos sanos.

Cuadro 21. Abundancia promedio con error estándar y porcentaje de los phyla de muestras cecales de conejos sanos y con EEC, basado en análisis metagenómico.

	EEC+	%	EEC-	%	Valor de P
Actinobacteria	538.74 ± 108.48	1.05	312.28 ± 217.91	0.73	NS
Bacteroides	7327.02 ± 2934.82	14.32	2300.43 ± 1020.38	5.36	NS
Cyanobacteria	286.81 ± 88.25	0.56	214.31 ± 58.05	0.50	NS
Euryarchaeota	400.74 ± 97.32	0.78	387.11 ± 194.24	0.90	NS
Firmicutes	30320.63 ± 4856.29	59.26	33848.77 ± 2811.83	78.88	NS
No identificados	3504.72 ± 1402.10	6.85	2366.13 ± 260.89	5.51	NS
Proteobacteria	697.57 ± 225.77	1.36	521.65 ± 58.52	1.22	NS
Saccharibacteria	683.90 ± 224.30	1.34	121.77 ± 95.26	0.28	0.044
Synergistetes	1287.80 ± 680.60	2.52	0	0.00	NS
Tenericutes	39.80 ± 18.29	0.08	196.14 ± 47.31	0.46	0.012
Verrucomicrobia	6075.61 ± 1334.57	11.87	2642.89 ± 1012.75	6.16	NS

EEC+: Conejos positivos a enteropatía epizoótica. EEC-: Conejos sanos.

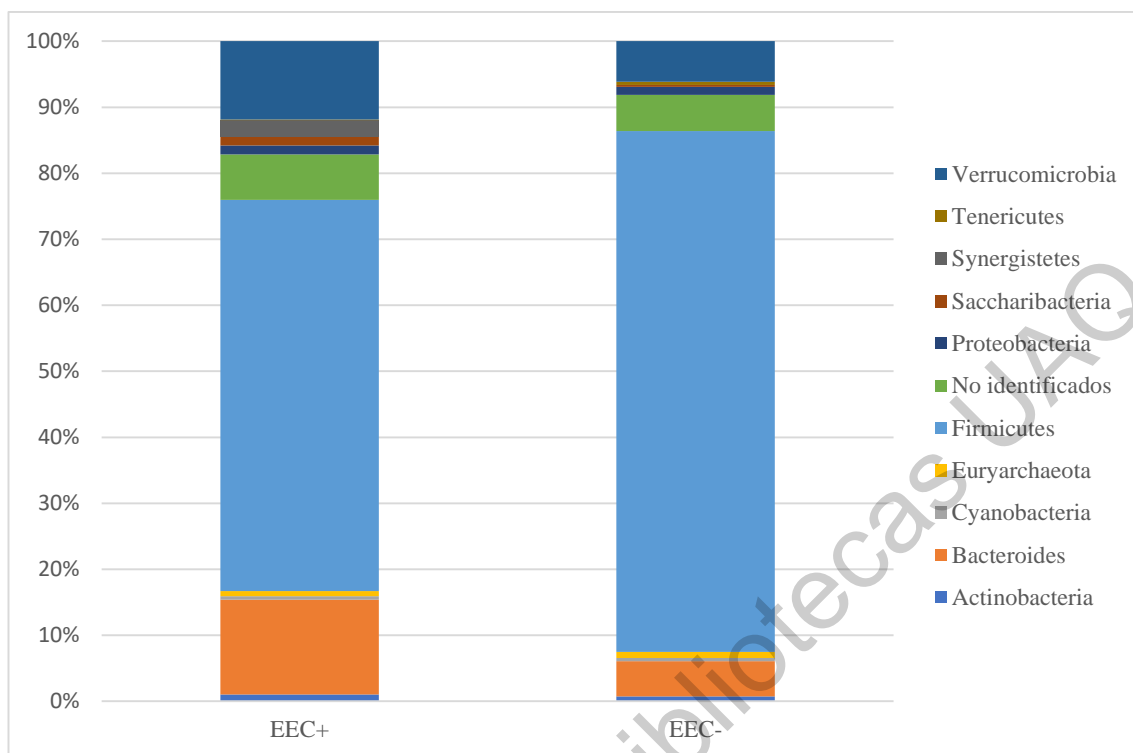


Figura 21. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales de conejos positivos a EEC y conejos sanos. EEC+: Conejos positivos a enteropatía epizoótica. EEC-: Conejos sanos.

Respecto a las abundancias relativas, los conejos con enteropatía presentaron un aumento en la abundancia relativa de los microorganismos identificados en comparación con los animales sanos. Los géneros bacterianos que aumentaron fueron: *Akkermansia* (15.22% vs 5.62%), *Clostridium* (3.56% vs 0.61%), *Bacteroides* (2.67% vs 0.92%), *Cloacibacillus* (1.72% vs 0%), *Saccharimonas* (1.27% vs 0.22%), *Synergistes* (0.71% vs 0%) y *Erysipelatoclostridium* (0.49% vs 0.03%). En Archeas, solamente aumentó *Methanosphaera* (0.58% vs 0.09%). No obstante, la enfermedad afectó negativamente la abundancia relativa de los géneros: *Subdoligranulum* (3.64% vs 7.49%) y *Eisenbergiella* (0.03% vs 1.27%). Este efecto se observó en las familias: *Ruminococcaceae* (26.34% vs 34.12%) y *Lachnospiraceae* (8.14% vs 23.49%) (Figura 22).

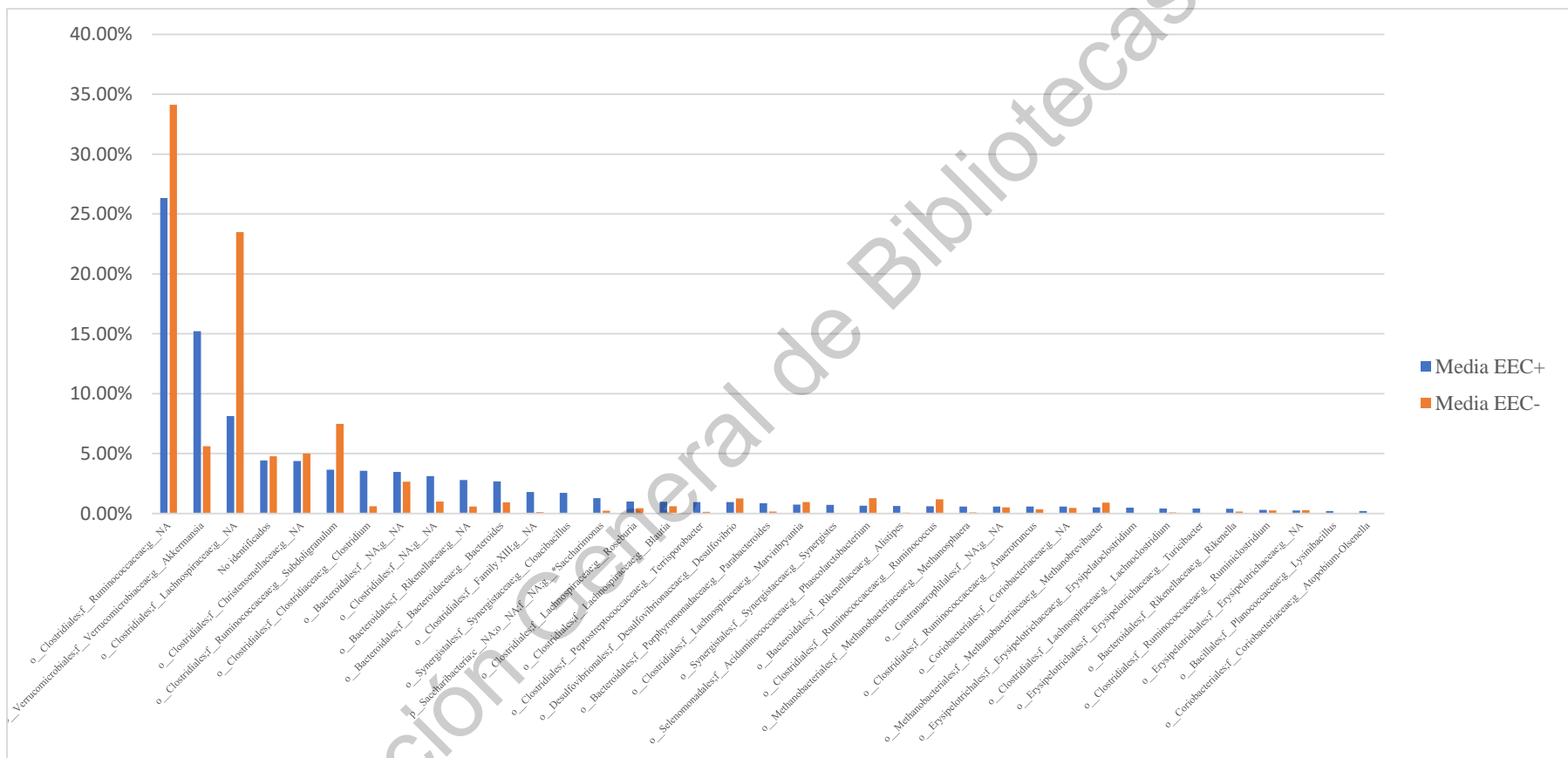


Figura 22. Comparación de la abundancia relativa del perfil microbiano (Orden, Familia y género) Top 30. EEC+: Conejos positivos a enteropatía epizoótica. EEC-: Conejos sanos. (f): familia, (o): orden, (g): género.

6.1.3 Biomarcadores identificados

La prueba LEfSe reportó 11 biomarcadores (Figura 23). en el grupo de conejos positivos a EEC. En el caso del grupo de conejos sanos se reportan 6 biomarcadores (Figura 24) siguiendo el umbral usado por Jin et al. (2018).

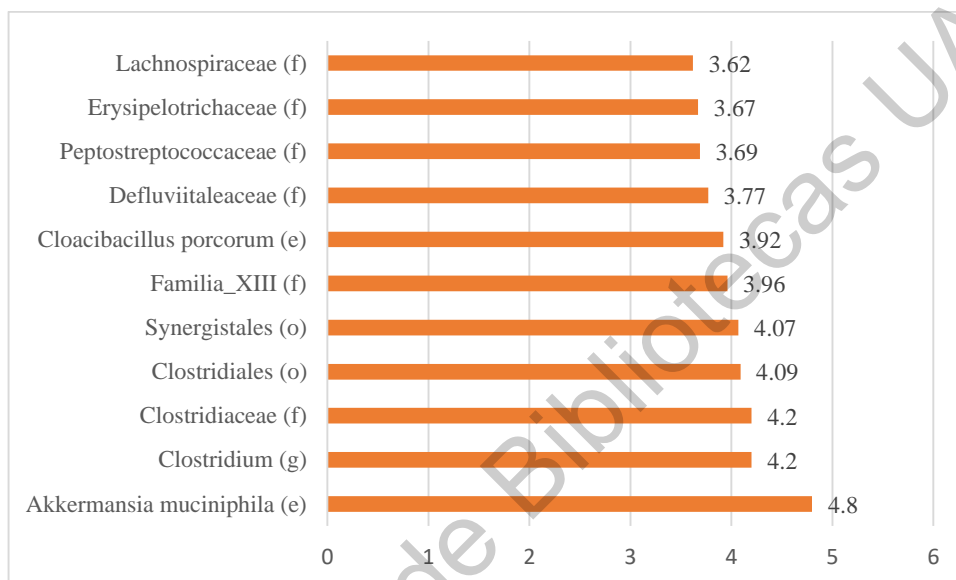


Figura 23. Biomarcadores reportados por la prueba LEfSe en muestras positivas a EEC. (f): familia, (e): especie, (o): orden, (g): género.

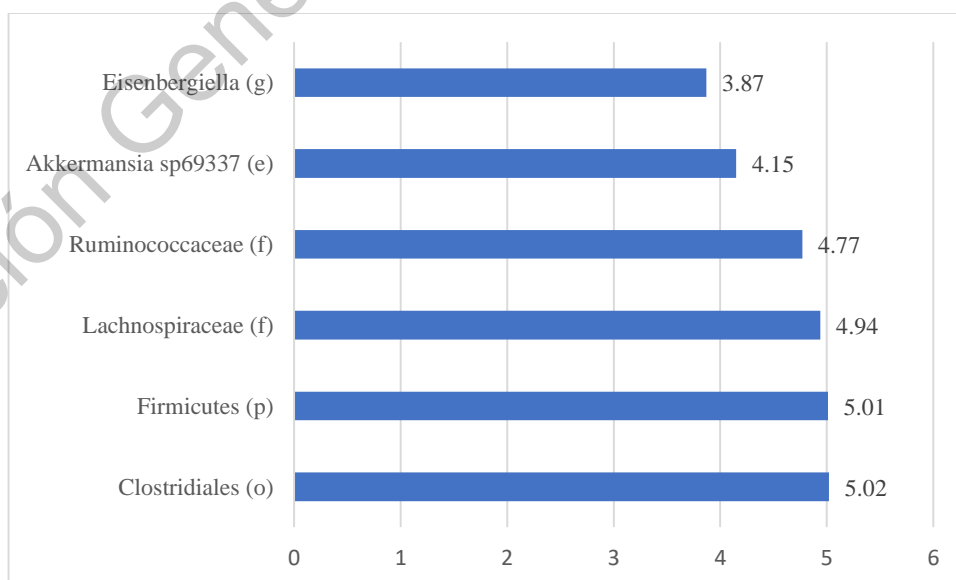


Figura 24. Biomarcadores reportados por la prueba LEfSe en muestras negativas a EEC. (f): familia, (e): especie, (o): orden, (g): género, (p): phylum.

6.2. Influencia de fibra detergente neutro en la salud y la microbiota de conejos con Enteropatía Epizoótica.

6.2.1 Parámetros productivos

El peso de los conejos con EEC fue significativamente menor ($P < 0.05$) con respecto al peso de los que estaban sanos (Cuadro 22), esto continuó durante el resto de periodo experimental hasta el pesaje final (Figura 25). Los conejos que tenían EEC fueron significativamente más ligeros que aquellos que estaban sanos ($P < 0.05$). La ganancia diaria de peso fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en animales sanos, pero solo en aquellos alimentados con una dieta de 36% de FDN (Figura 26). Los conejos en los grupos EEC+31% y EEC+36% presentaron diarrea leve (severidad = 1) a moderada (severidad = 2) el primer día del ensayo y durante los siguientes 3 días. La diarrea y el moco en las heces, en los grupos positivos a EEC, disminuyeron desde el cuarto día de experimento y desaparecieron al noveno día. Los grupos negativos a EEC (EEC-31% y EEC-36%) no presentaron diarrea o signos asociados con EEC durante la duración del experimento.

Cuadro 22. Pesos promedios y error estándar de conejos en diferentes etapas del experimento.

Pesos	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	Valor de P Dieta	Valor de P Enfermedad
Inicial promedio (g)	635 ± 49.5	621 ± 52.9	427 ± 53.9	474 ± 44.1	NS	0.000
Promedio semana 1 (g)	834 ± 44.7	843 ± 28.9	584 ± 48.9	645 ± 34.8	NS	0.000
Promedio semana 2 (g)	1032 ± 35.8	1039 ± 25.5	771 ± 38.5	825 ± 30.1	NS	0.000
Promedio semana 3 (g)	1247 ± 34.8	1265 ± 34.1	954 ± 42.8	1015 ± 13.1	0.035	0.000
Promedio semana 4 (g)	1556 ± 46.2	1580 ± 23.3	1320 ± 54.7	1348 ± 49.7	NS	0.000
Promedio final (g)	2095 ± 33.6	2193 ± 35.7	1843 ± 50.3	1927 ± 39.1	0.001	0.000
Ganancia diaria de peso (g)	36.5 ± 1.9	39.3 ± 1.08	35.4 ± 1.9	36.3 ± 0.7	0.032	0.023
Consumo diario de alimento (g/día/jaula)	523.45 ± 2.67	525.70 ± 3.3	427.56 ± 2.7	435.06 ± 2.74	-	-

EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

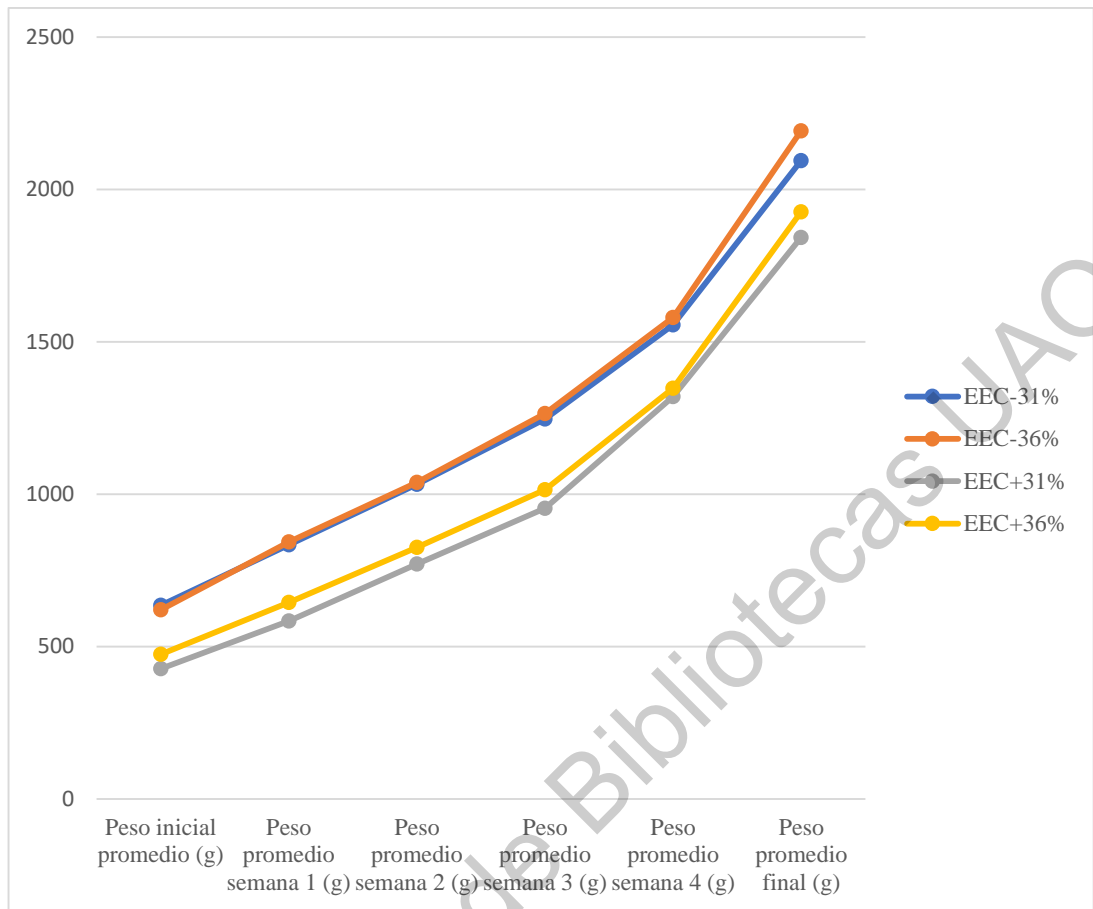


Figura 24. Evolución del peso promedio de conejos por grupo. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN

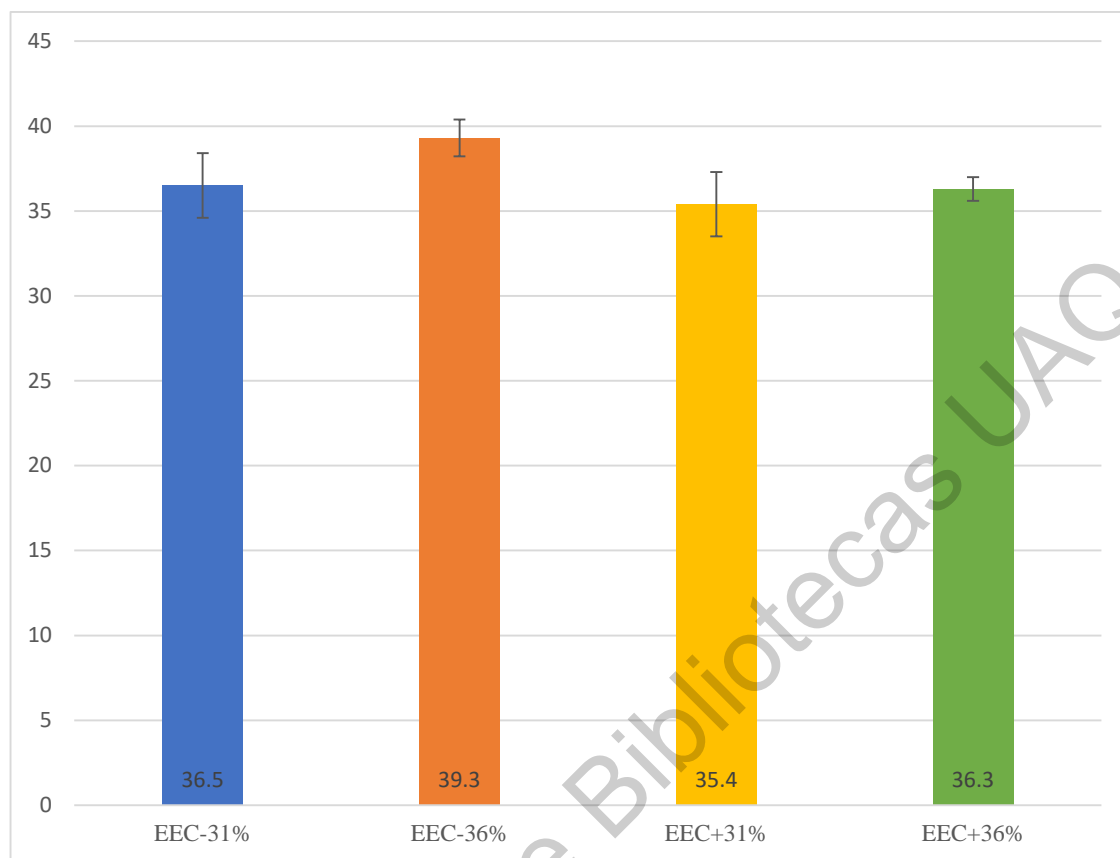


Figura 26. Ganancia diaria de peso por grupo. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

6.2.2 Metabolismo cecal

Los resultados de los parámetros de fermentación se muestran en el Cuadro 23. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos para los valores de pH. En el caso del porcentaje de amoníaco, el mayor valor se observó en el grupo EEC+31%, aunque este valor no fue significativamente diferente ($P > 0.05$). Sin embargo, hubo una diferencia significativa ($P < 0.001$) en la producción de los ácidos grasos volátiles (AGV) analizados, así como, en el total de AGV producidos por grupo con los grupos, registrando el grupo EEC+31% la concentración más alta, seguido por el grupo EEC-36% (Figura 27). En cuanto a las interacciones, hubo diferencias dependientes de la enfermedad y la dieta ($P < 0.001$), así como una diferencia en la interacción de las variables ($P < 0.001$). La proporción de producción de los AGV no cambió en los grupos EEC-31%, EEC+31% y EEC+36%, conservando al ácido acético como el más abundante, seguido por el ácido

propiónico y el ácido butírico respectivamente, en el caso del grupo EEC-36% el ácido butírico fue más abundante que el propiónico, no obstante, esto no fue estadísticamente diferente. La concentración de otros AGV más alta se presentó en el grupo EEC+31% ($P<0.001$) (Figura 27). Los ácidos grasos ramificados (ácido valérico, isobutírico e isovalérico) tuvieron la mayor concentración en el grupo EEC+31% positivo a EEC con dieta baja en fibra detergente neutro ($P<0.001$), así como en la concentración de otros AGV ($P<0.001$).

Cuadro 23. Valores de ácidos grasos volátiles, amoníaco y pH para muestras de cecotrofos recolectados.

Metabolito/Parámetro	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	Valor de P Dieta	Valor de P Enfermedad	Valor de P interacción
AGV Totales $\mu\text{mol/g}$	9.75 \pm 0.14	13.35 \pm 0.16	14.36 \pm 0.19	10.08 \pm 0.16	0.034	0.001	<0.001
Ácido acético $\mu\text{mol/g}$	3.65 \pm 0.10	4.35 \pm 0.01	4.95 \pm 0.09	3.82 \pm 0.10	0.028	0.001	<0.001
Ácido propiónico $\mu\text{mol/g}$	1.71 \pm 0.09	2.68 \pm 0.03	2.00 \pm 0.10	1.85 \pm 0.08	0.007	<0.001	<0.001
Ácido butírico $\mu\text{mol/g}$	1.24 \pm 0.03	2.76 \pm 0.02	1.25 \pm 0.02	1.24 \pm 0.02	<0.001	<0.001	<0.001
Isobutirato $\mu\text{mol/g}$	0.43 \pm 0.02	0.41 \pm 0.01	0.97 \pm 0.02	0.43 \pm 0.02	<0.001	<0.001	<0.001
Ácido valérico $\mu\text{mol/g}$	1.02 \pm 0.01	1.32 \pm 0.01	2.00 \pm 0.04	1.03 \pm 0.02	<0.001	<0.001	<0.001
Isovalerato $\mu\text{mol/g}$	0.90 \pm 0.01	0.82 \pm 0.01	1.27 \pm 0.02	0.97 \pm 0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Otros AGV $\mu\text{mol/g}$	0.80 \pm 0.004	1.02 \pm 0.028	1.94 \pm 0.017	0.81 \pm 0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Amonio %	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.16 \pm 0.07	0.07 \pm 0.01	NS	NS	NS
pH	6.58 \pm 0.17	6.46 \pm 0.07	6.43 \pm 0.06	6.43 \pm 0.13	NS	NS	NS

AGV = Ácidos grasos volátiles. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN. NS denota que los valores no fueron significativamente diferentes a $P < 0.05$.

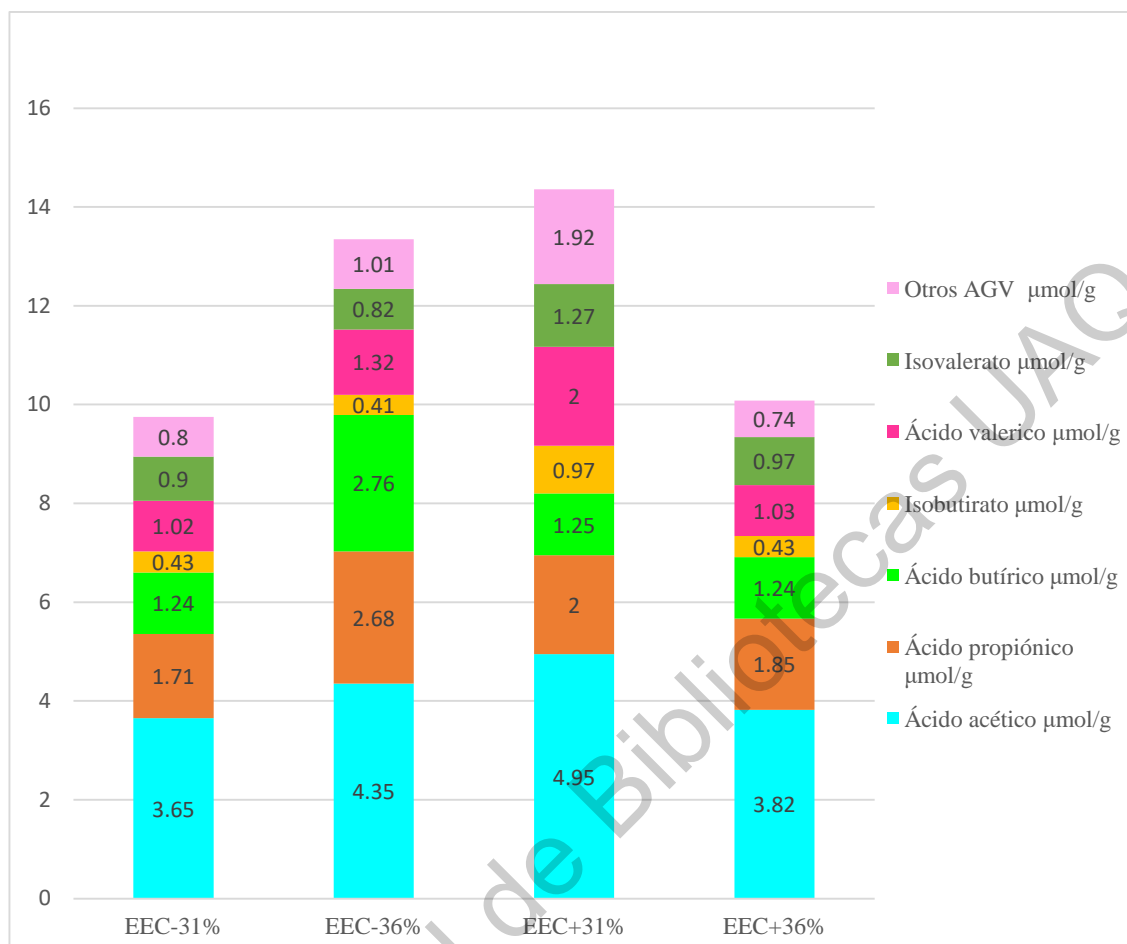


Figura 27. Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) por grupo en $\mu\text{mol/g}$. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

6.2.3 Análisis metataxonómico

Los cecotrofos obtuvieron un total de 846.594 secuencias de ADN, que comprenden 80 géneros bacterianos (Cuadro 24). La curva de rarefacción presentó meseta en todas las muestras analizadas (Figura A3, Anexo). Los índices de riqueza y diversidad de cada muestra cecal de cada grupo se muestran en la Figura 27.28 Al analizar los índices de diversidad, se detectaron diferencias. Dependiendo del índice estudiado, se observaron niveles significativamente más altos de diversidad en los animales con EEC en la dieta baja en fibra que las otras muestras cecales. Los índices de riqueza ACE y Chao1 mostraron valores significativamente más altos para el grupo EEC+31% seguidos por el grupo EEC+36%, en cuanto a los índices de diversidad (Shannon, Simpson e Inv de Simpson) no se observó tal diferencia, no obstante, en el índice de Fisher presenta un

valor significativamente más elevado para el grupo EEC+31%. El aumento de la riqueza se observó para las diferencias entre las dietas (bajas y altas en fibra), el estado de salud (saludable versus infectado con EEC) y para las interacciones dieta * salud en todos los casos. Todos los índices analizados en las muestras cecales fueron más altos en aquellos recolectados de animales con EEC y dietas bajas en fibra (grupos EEC+31%), aunque en el caso de los índices de diversidad (Shannon, Simpson e Inv de Simpson) estos no fueron significativos.

Cuadro 24. Resumen de secuencias identificadas y comparación de índices de diversidad microbiana en muestras cecales.

	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	Valor de P Dieta	Valor de P Enfermedad	Valor de P interacción
Numero de secuencias	164,382	259,136	272,098	150,978			
Número de unidades taxonómicas funcionales (OTU)	467	462	767	471			
Numero de géneros identificados	33	35	72	35			
Índice de Shannon	4.01 (0.25)	4.02 (0.28)	4.33 (0.28)	4.07 (0.21)	NS	NS	NS
Índice de Simpson	0.96 (0.01)	0.96 (0.02)	0.96 (0.02)	0.97 (0.01)	NS	NS	NS
Índice Inv de Simpson	29.84 (8.02)	30.61 (10.08)	31.44 (12.83)	30.82 (4.47)	NS	NS	NS
Índice de Fisher	22.46 (4.64)	21.72 (3.92)	70.67 (33.25)	24.58 (7.51)	0.019	0.012	0.022
Estimador de abundancia basado en la cobertura (ACE)	165.12 (34.8)	160.07 (29.3)	466.47 (206.4)	179.04 (55.7)	0.020	0.013	0.024
Índice de Chao1	164.63 (34.5)	159.45 (29.3)	465.37 (206.3)	178.16 (55.1)	0.020	0.013	0.024

EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

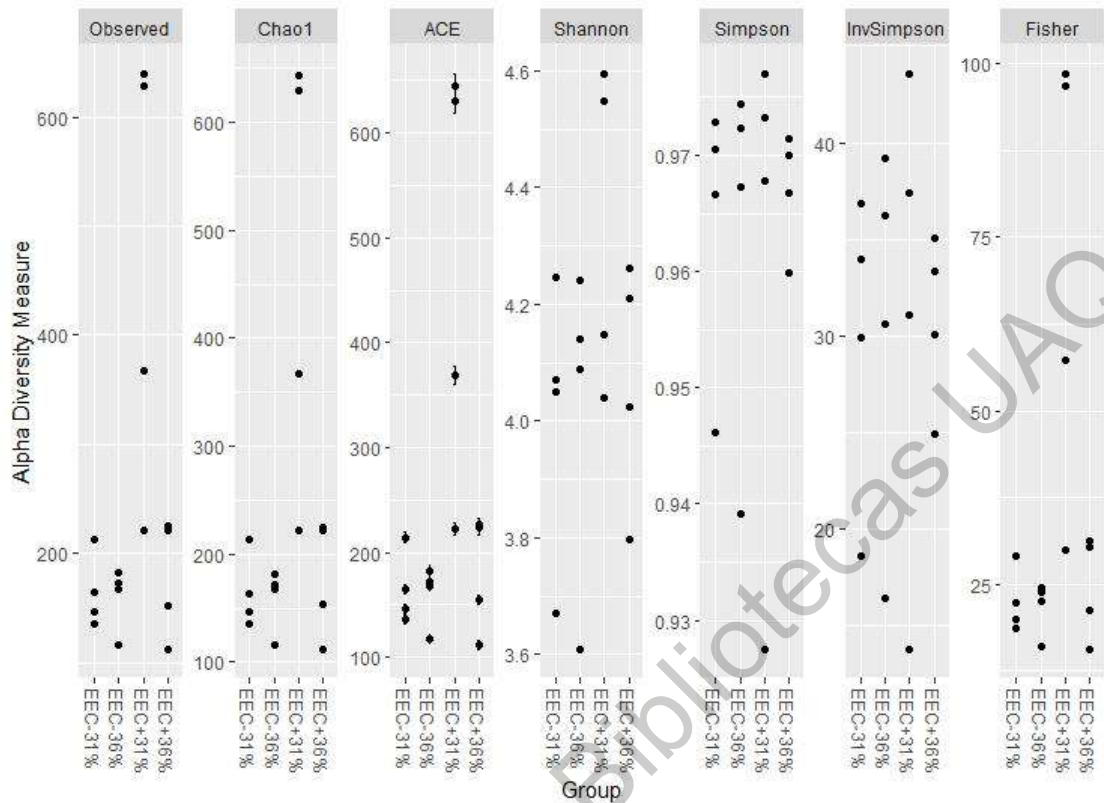


Figura 28. Índices de riqueza y diversidad de cada muestra cecal por grupo. EEC- 31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC- 36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+ 31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+ 36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

Las heces obtuvieron un total de 1,152,002 secuencias de ADN, que comprenden 90 géneros bacterianos (Cuadro 25). La curva de rarefacción presentó meseta en todas las muestras analizadas (Figura A3, Anexo). Los índices de riqueza y diversidad de cada muestra fecal de cada grupo se muestran en la Figura 29. Dependiendo del índice estudiado, se observaron diferencias significativamente diferentes en las muestras fecales. Los índices de Shannon no mostraron diferencias significativas para las comparaciones entre dietas, estado de salud o interacciones dieta * salud. Los valores de diversidad de Simpson fueron más altos en animales sanos en relación con animales infectados con EEC, así como en animales con dietas altas en fibra que, en dietas bajas en fibra, pero no se pudieron detectar diferencias en las interacciones dieta * salud. No se detectaron diferencias significativas para los valores de ACE para las diferencias en la dieta, o las diferencias en el estado de salud, aunque se detectaron diferencias para las interacciones

dieta * salud, con animales sanos con una dieta alta en fibra que muestra un valor de índice significativamente más alto que los otros 3 grupos de tratamiento. Finalmente, el índice Chao1 fue significativamente más alto para los animales con dietas altas en fibra, pero no hubo diferencias significativas en función del estado de salud o las interacciones dieta * salud. En el caso de las muestras fecales, todos los índices fueron más altos para aquellos de animales sanos con dietas altas en fibra, aunque esto fue solo significativamente para los valores de ACE.

Cuadro 25. Resumen de secuencias identificadas y comparación de índices de diversidad microbiana en muestras fecales.

	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	Valor de P Dieta	Valor de P Enfermedad	Valor de P interacción
Numero de secuencias	256,412	268,214	384,230	243,146	-	-	-
Número de unidades taxonómicas funcionales (OTU)	818	1018	842	858	-	-	
Numero de géneros identificados	63	64	66	58	-	-	-
Índice de Shannon	4.02 (0.25)	4.58 (0.19)	2.82 (0.87)	3.92 (0.16)	0.004	0.002	NS
Índice de Simpson	0.94 (0.02)	0.97 (0.01)	0.71 (0.18)	0.94 (0.01)	0.023	0.017	NS
Índice Inv de Simpson	19.94 (8.05)	30.35 (6.31)	5.29 (5.30)	15.98 (2.31)	0.003	0.001	NS
Índice de Fisher	56.60 (16.39)	88.52 (16.89)	54.75 (5.33)	60.16 (12.44)	0.018	0.046	0.075
Estimador de abundancia basado en la cobertura (ACE)	376.5 (105.51)	578.1 (103.33)	400.8 (37.94)	416.3 (94.26)	0.032	NS	0.060
Índice de Chao1	375.58 (105.5)	576.96 (103.2)	399.79 (38.0)	41535 (93.9)	0.032	NS	0.066

EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

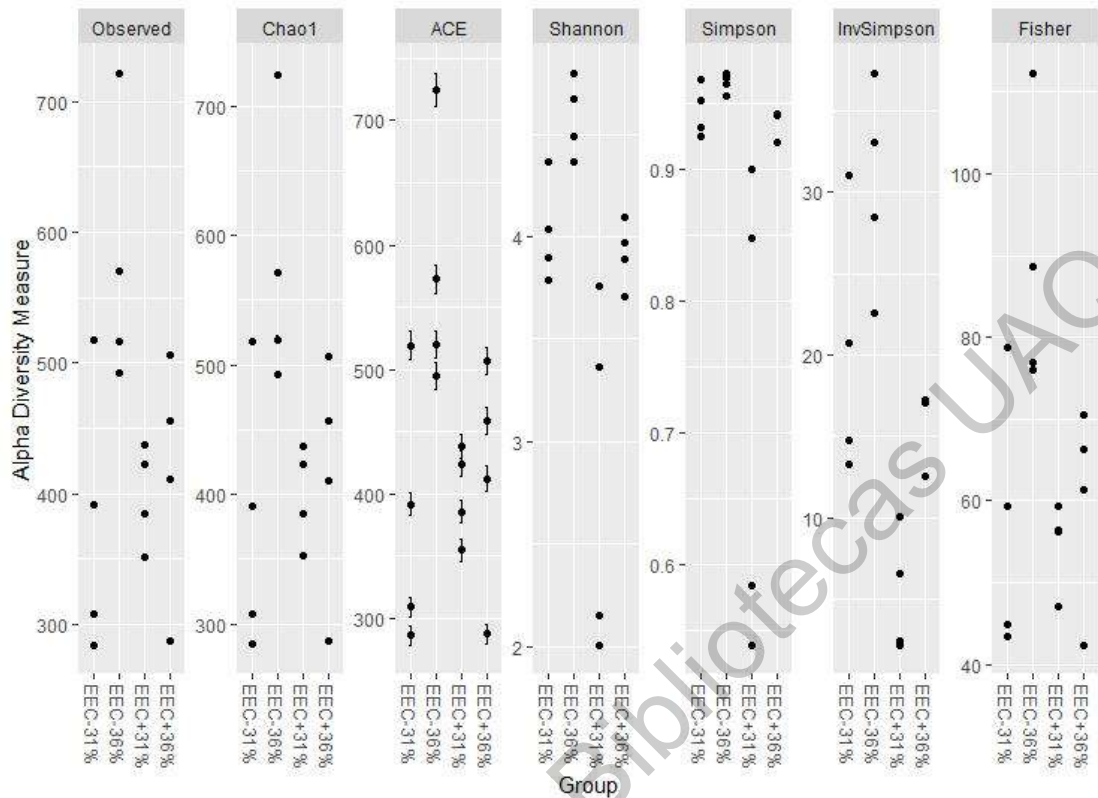


Figura 29. Índices de riqueza y diversidad de cada muestra fecal por grupo. EEC- 31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC- 36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+ 31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+ 36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

Los phyla más abundantes en todos los grupos de tratamiento cecal fueron los Firmicutes y Bacteroidetes (Cuadro 26 y Figura 30). Las comparaciones dietéticas individuales y las interacciones dieta * salud se presentan en el Cuadro 26. El phylum Bacteroidetes y Cyanobacteria presentan una diferencia con respecto a la dieta y al estado de salud, pero no presentaron diferencias en la interacción del tratamiento y la enfermedad. El único phylum que presentó una diferencia en las tres comparaciones fue Epsilonbacteraeota.

En la Figura 30 se presentan las familias más abundantes, las cuales fueron *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Clostridiales_vadinBB60_group*, *Chistensenellaceae*, *Rikenellaceae* y *Barnesiellaceae*.

Cuadro 26. Abundancia promedio con error estándar de los phyla de las muestras cecales basado en análisis metagenómico

	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	Valor de P Dieta	Valor de P Enfermedad	Valor de P interacción
Actinobacteria	0	0	25.75 ± 9.71	0	NS	NS	NS
Bacteroidetes	6881.5 ± 601.63	5120.25 ± 481.78	14404 ± 2134.06	7160.5 ± 603.50	0.019	0.014	NS
Cyanobacteria	43.25 ± 12.97	23 ± 9.40	257.5 ± 69.90	108.5 ± 35.10	NS	0.021	NS
Epsilonbacterao ta	0	0	77 ± 18.50	0	0.012	0.012	0.012
Firmicutes	26127.25 ± 1999.15	27366.75 ± 2459.60	36432.75 ± 3615.94	25171 ± 3891.50	NS	NS	NS
Lentisphaerae	3.25 ± 2.30	0	1.5 ± 1.06	0	NS	NS	NS
No identificados	237.25 ± 77.51	168.75 ± 50.89	195.75 ± 117.48	425.5 ± 91.77	NS	NS	NS
Patescibacteria	0	0	4.75 ± 2.51	0	NS	NS	NS
Proteobacteria	331.75 ± 86.84	308.25 ± 61.89	611.75 ± 92.59	573.25 ± 153.13	NS	NS	NS
Synergistetes	0	0	9.75 ± 6.89	71.25 ± 50.35	NS	NS	NS
Tenericutes	186.5 ± 66.27	241.75 ± 61.12	631.75 ± 241.83	218.75 ± 66.09	NS	NS	NS
Verrucomicrobia	234.5 ± 93.18	144 ± 40.55	420.75 ± 125.90	92.5 ± 42.31	NS	NS	NS

EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

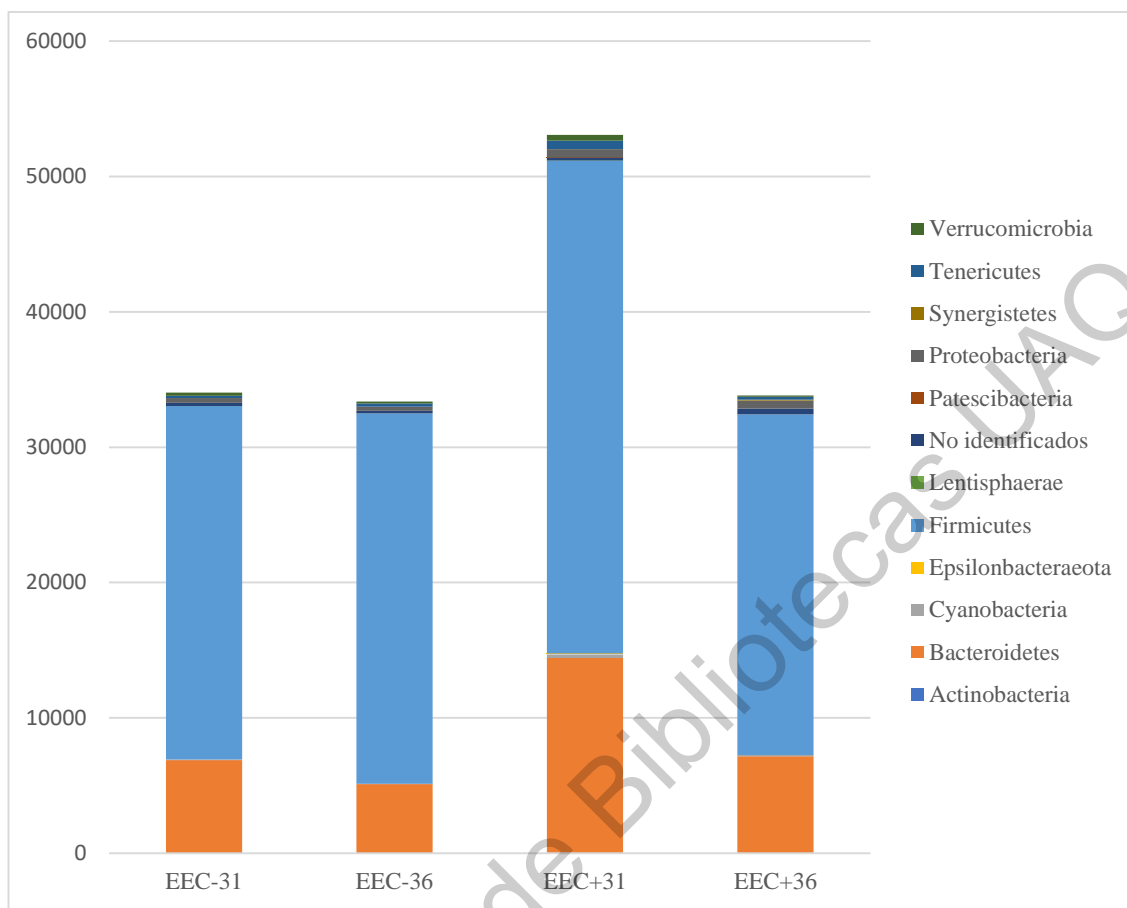


Figura 30. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales por grupos. Se muestran los phyla más abundantes en cada grupo experimental. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

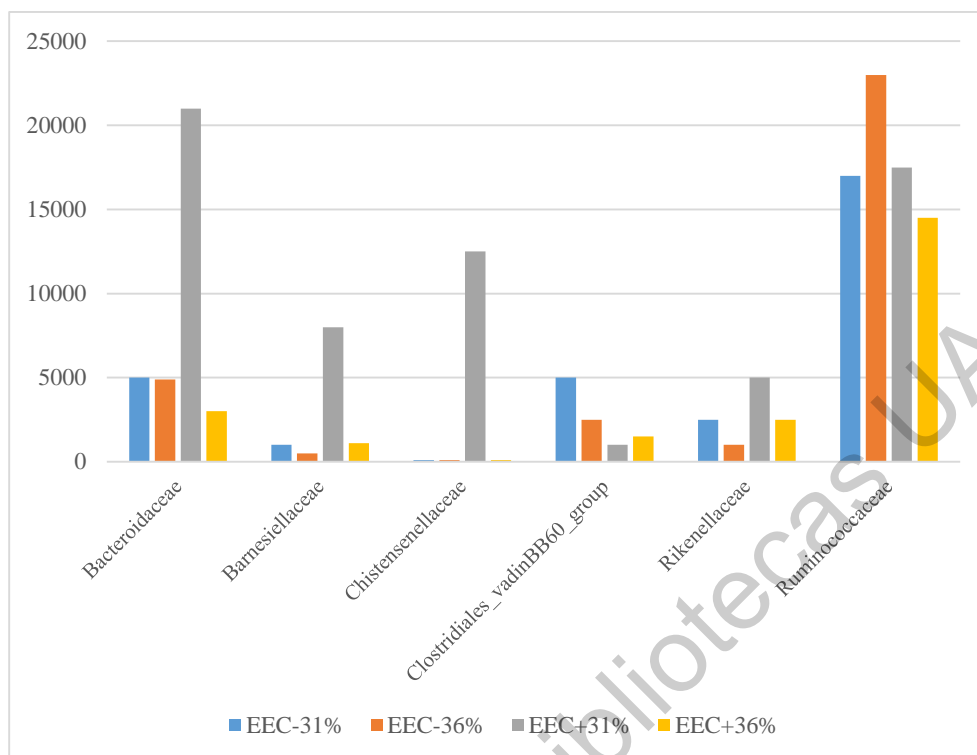


Figura 31. Familias más abundantes en muestras cecales por grupo y dieta administrada. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

Los phyla más abundantes en los grupos fecales fueron el Firmicutes y Verrucomicrobia (Cuadro 27 y Figura 32). En la Figura 33 se observan las familias más abundantes que fueron: *Ruminococcaceae*, *Akkermansiaceae* y *Lachnospiraceae*. Sin embargo, hubo variación dentro de los grupos con respecto a la abundancia de familias (Figura 32) y hubo diferencias al comparar los sanos con los afectados por EEC ($P = 0.03$). En el caso de la comparación entre dietas los phyla no identificados y Proteobacteria presentaron diferencias, en la comparación entre estados de salud solo el phylum no identificados presentó una diferencia significativa, en el caso del phylum Verrucomicrobia fue el único que presentó una diferencia en todas las comparaciones (Cuadro 27). En la prueba PERMANOVA, se encontraron diferencias en todas las comparaciones: entre grupos ($P = 0.03$); por dieta ($P = 0.01$) y entre grupo de animales sanos y positivos a EEC ($P = 0.03$).

Cuadro 27. Abundancia promedio con error estándar de los principales phyla de las muestras fecales basado en el análisis metagenómico.

	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	Valor de P Dieta	Valor de P Enfermedad	Valor de P interacción
Actinobacteria	24 ± 8.63	42 ± 10.24	46.75 ± 13.78	31 ± 12.27	NS	NS	NS
Bacteroidetes	3220.5 ± 400.56	6069 ± 339.39	4458.25 ± 1568.08	3571.75 ± 820.27	NS	NS	NS
Cyanobacteria	236 ± 101.70	400.25 ± 48.55	97.25 ± 15.14	318 ± 79.47	NS	NS	NS
Epsilonbacteraeota	25 ± 10.11	42.75 ± 5.51	22 ± 2.25	39.25 ± 6.30	NS	NS	NS
Euryarchaeota	0	0.5 ± 0.35	0	0.5 ± 0.35	NS	NS	NS
Firmicutes	35109.5 ± 3393.76	49264.5 ± 2632.36	32689.25 ± 2816.37	42204.2 ± 6480.08	NS	NS	NS
No identificados	10.75 ± 5.14	24.75 ± 5.27	4.25 ± 0.60	78.5 ± 9.93	0.001	0.019	0.005
Patescibacteria	5 ± 2.87	2 ± 1.41	6.25 ± 4.18	3.12 ± 2.98	NS	NS	NS
Proteobacteria	400.5 ± 78.70	796.75 ± 71	297.25 ± 153.60	778.25 ± 108.58	0.014	NS	NS
Synergistetes	3.75 ± 2.65	7 ± 1.44	1.25 ± 0.53	3.5 ± 1.43	NS	NS	NS
Tenericutes	319 ± 37.24	1234.5 ± 78.39	897 ± 225.76	705 ± 146.47	NS	NS	0.017
Verrucomicrobia	3755 ± 944.63	1043 ± 80.93	44792 ± 7784.99	12937.25 ± 1870.38	0.01	0.001	0.025

EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

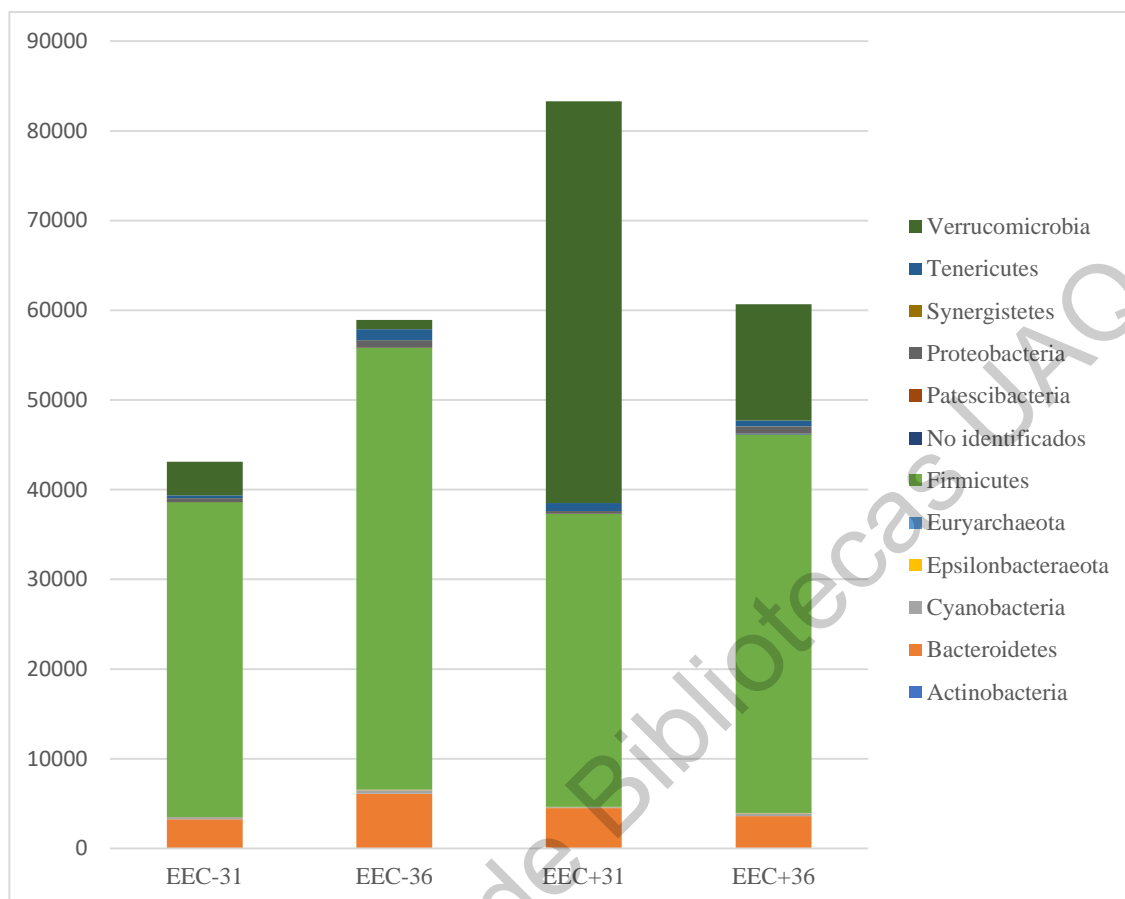


Figura 32. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras fecales por grupos. Los phyla más abundantes se muestran en cada grupo experimental. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

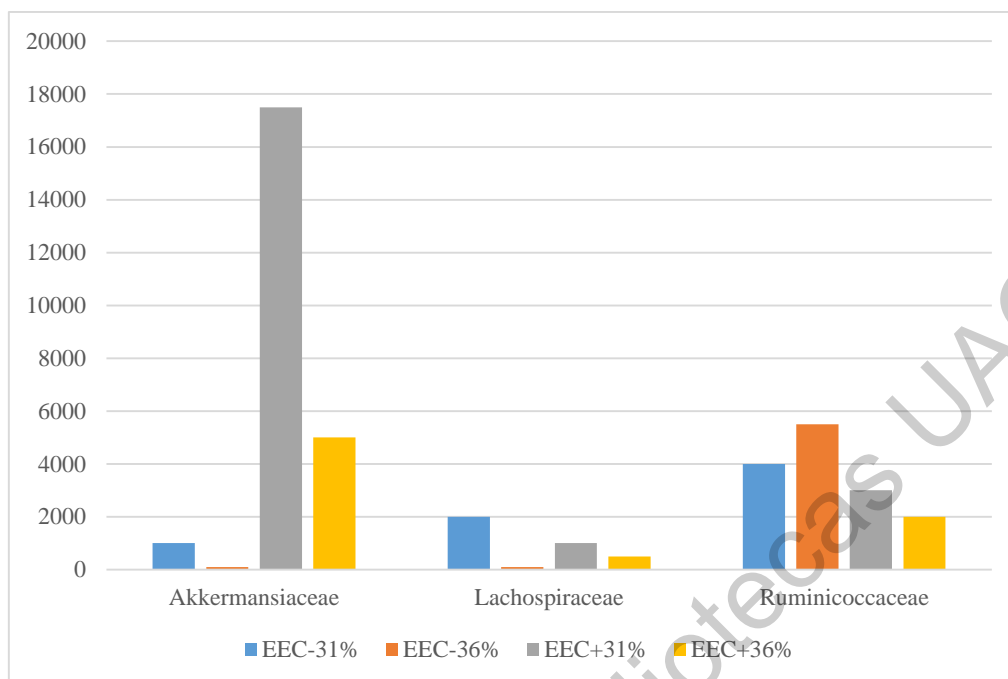


Figura 33. Familias más abundantes en muestras fecales por grupo y dieta administrada. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

En el Cuadro 28 se muestra la proporción de las abundancias de phyla de las muestras cecales y fecales por cada grupo experimental, el phylum Firmicutes es el más abundante en las muestras cecales en todos los grupos, en el caso de las muestras fecales es el más abundante en los grupos EEC-31%, EEC-36% y EEC+36%, en el caso del grupo EEC+31% el phylum más abundante fue Verrucomicrobia. El segundo phylum más abundante fue Bacteroidetes en todos los grupos para las muestras cecales y los grupos EEC-31%, EEC-36% y EEC+36% de las muestras fecales, en el caso del grupo EEC+31% el segundo phylum más abundante fue Firmicutes (Figura 34 y 35).

Cuadro 28. Abundancias (%) de los principales phyla de las muestras cecales y fecales basado en el análisis metagenómico.

Phylum/Grupo	Muestra cecal				Muestra fecal			
	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%	EEC-31%	EEC-36%	EEC+31%	EEC+36%
Actinobacteria	0.00	0.00	0.05	0.00	0.056	0.071	0.056	0.051
Bacteroidetes	20.21	15.34	27.14	21.17	7.471	10.299	5.351	5.887
Cyanobacteria	0.13	0.07	0.49	0.32	0.547	0.679	0.117	0.524
Epsilonbacterao ta	0.00	0.00	0.15	0.00	0.058	0.073	0.026	0.065
Euryarchaeota	-	-	-	-	0.000	0.001	0.000	0.001
Firmicutes	76.74	82.00	68.65	74.42	81.444	83.603	39.237	69.567
Lentisphaerae	0.01	0.00	0.00	0.00	-	-	-	-
No identificados	0.70	0.51	0.37	1.26	0.025	0.042	0.005	0.129
Patescibacteria	0.00	0.00	0.01	0.00	0.012	0.003	0.008	0.000
Proteobacteria	0.97	0.92	1.15	1.69	0.929	1.352	0.357	1.283
Synergistetes	0.00	0.00	0.02	0.21	0.009	0.012	0.002	0.006
Tenericutes	0.55	0.72	1.19	0.65	0.740	2.095	1.077	1.162
Verrucomicrobia	0.69	0.43	0.79	0.27	8.710	1.770	53.764	21.325

EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

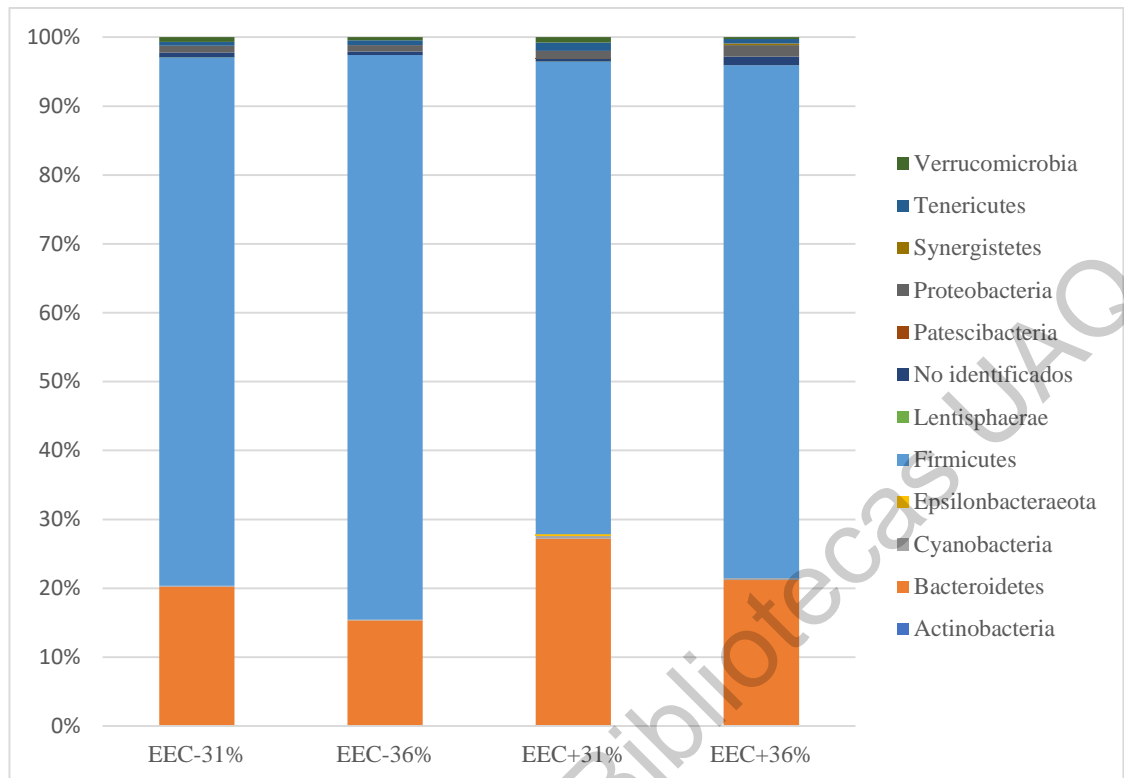


Figura 34. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras cecales por grupos. Se muestran los phyla más abundantes (%) en cada grupo experimental. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

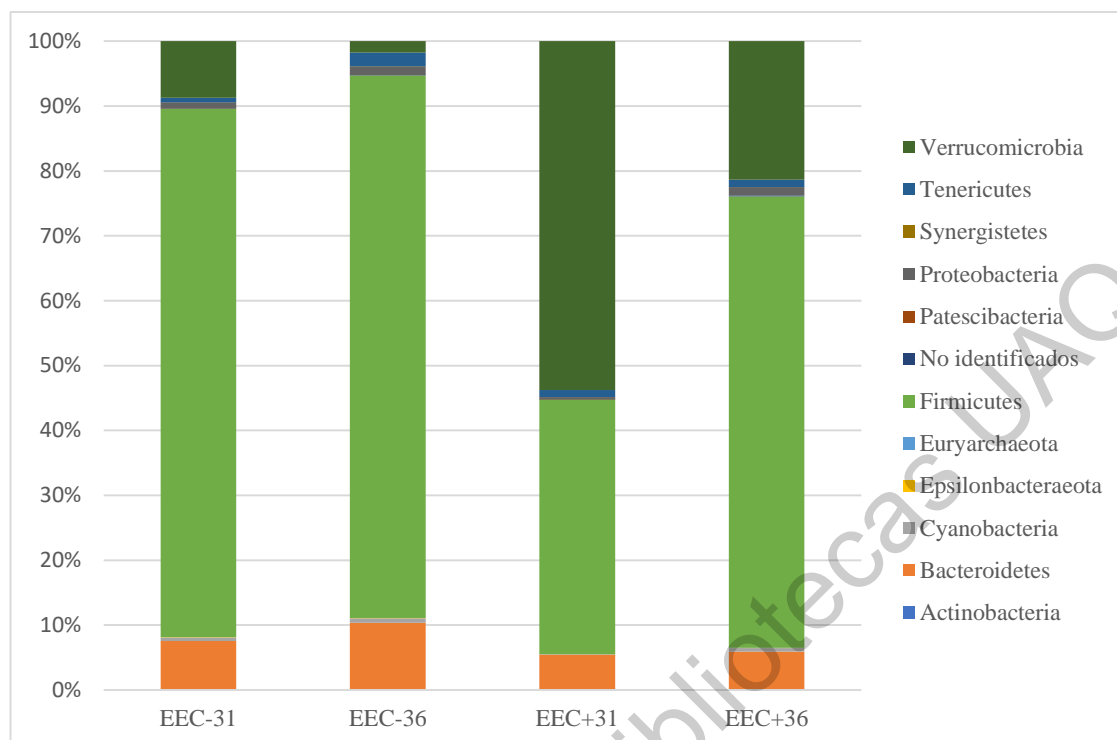


Figura 35. Perfil microbiano de las abundancias de las muestras fecales por grupos. Se muestran los phyla más abundantes (%) en cada grupo experimental. EEC-31% = animales sanos con dieta de 31% de FDN; EEC-36% = animales sanos con dieta de 36% de FDN; EEC+31% = animales sospechosos a EEC en una dieta con 31% de FDN; y EEC+36% = animales sospechosos a EEC con dieta de 36% de FDN.

6.3. Discusión

La enteropatía epizootica del conejo es una disbiosis poco estudiada en México (Rodríguez De Lara et al., 2008). No obstante, a nivel mundial los estudios sobre este síndrome se han centrado en el descubrimiento de la etiología (De Blas et al., 2007; Bäuerl et al., 2014), utilizando diferentes técnicas, y aún con el uso de la segunda generación de secuenciación no se ha podido dilucidar por completo la etiología (Jin et al., 2018). Los factores que se han asociado con más frecuencia a este síndrome son la alimentación, en especial la cantidad y calidad de la fibra (Pérez de Rozas et al., 2005; Le Bouquin et al., 2009; Jin et al., 2018). El otro factor se asocia con un desequilibrio en el microbioma gastrointestinal del conejo (Licois et al., 2006; Dewrée et al., 2007).

En México la producción cunícola se lleva a cabo en un sistema semi-intensivo casi en su 80% (Martínez et al., 2004), el cual se caracteriza por alimentación comercial no especializada y lactancia de 30 a 35 días (Roca, 1993). La alimentación no especializada

en la producción cunícola de México aumenta el riesgo del desarrollo de la EEC. Aunado a esto, el perfil microbiano de la coneja determina el perfil de los gazapos (Abecia et al., 2007b), si la hembra tiene una disbiosis en su perfil microbiano toda la camada se verá afectada. Adicionalmente, la deficiencia de fibra detergente neutro en los días posteriores al destete probablemente ocasione un efecto desencadenante de este síndrome (Álvarez et al., 2007; Jin et al., 2018).

En el primer experimento del presente trabajo el perfil microbiano de conejos EEC+ muestra un desequilibrio en la abundancia de la microbiota cecal, afectando a los miembros de los phyla Firmicutes, Bacteroides, Saccharibacteria, Tenericutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia. Este mismo efecto se reportó en estudios anteriores en los que los integrantes del phylum Firmicutes disminuyen y es remplazado por el aumento de los integrantes del phylum Bacteroides (Bäuler et al., 2014; Abecia et al., 2017; Jin et al., 2018).

La diversidad fue diferente en el perfil del presente trabajo reportando la presencia de miembros del phylum Synergistetes solo en conejos EEC+, dicho phylum se ha mencionado recientemente en estudios relacionados con la EEC (Abecia et al., 2017; Jin et al., 2018). Aunado a esto se registran *Butyricimonas* y *Anaerotruncus*, dos géneros asociados solo con muestras positivas a EEC, similar a lo reportado por Abecia et al., (2017).

No obstante, en el presente estudio no se registró presencia de *Escherichia-Shigella* ni un cambio significativo en la abundancia de los miembros del phylum Proteobacteria. Lo anterior se relaciona con el uso de la secuenciación libre de PCR previo, el cual puede tener un efecto sobre el perfil microbiano en cada estudio (Aird et al., 2011; Kobschull y Zador, 2015; Tilak et al., 2018).

El incremento en la abundancia y la disminución en los índices de diversidad observados en este estudio coinciden con lo reportado en estudios anteriores (Bäuler et al., 2014; Abecia et al., 2017). Sin embargo el índice de Simpson obtenido en este trabajo fue mas alto, lo que difiere de lo reportado por Jin et al. (2018) que no reportaron diferencia. Esto se relaciona con el tipo de algoritmo y la exactitud de este índice de diversidad, debido que no discrimina entre especies con una baja población (grupos formados por 1, 2 o 3 individuos).

Los integrantes de los phyla Firmicutes, Verrucomicrobia y Synergistetes se asociaron a la presencia de EEC por el análisis LEfSe y se reportaron tres géneros de importancia: *Akkermancia muciniphila*, *Clostridium spp* y *Cloacibacillus porcorum*. Los mencionados géneros se han relacionado con la EEC en estudios anteriores:

Los miembros del phylum Firmicutes son los más abundante en la microbiota cecal de los conejos sanos representando entre 65 al 75% de la abundancia (Abecia et al., 2005; Mattioli et al., 2019; Yuan et al., 2019). En el presente estudio los conejos que padecen de EEC presentaron una disminución en la abundancia de los integrantes del phylum Firmicutes en comparación con los animales sanos (78.88% vs 59.26%), lo que es similar con lo reportado en estudios anteriores 78.06% a 54.07% (Bäuerl et al., 2014), 81% a 60% (Abecia et al., 2017) y 72.12% a 47.72% (Jin et al., 2018). Lo anterior se asocia a la condición disbiótica de la EEC. Aunque la cantidad de miembros del phylum Firmicutes disminuye, este no pierde la categoría del más abundante en ninguno de los casos.

Las familias más abundantes registradas por el análisis LefSe en conejos con EEC coinciden con las familias reportadas por Jin et al. (2018). No obstante, la familia *Lachnospiraceae* se identificó tanto en el grupo positivo a EEC como en el negativo. Lo anterior coincide con estudios anteriores (Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017) donde se identificó en los grupos sanos, enfermos y con tratamiento. En el caso de lo reportado por Jin et al. (2018). la familia *Lachnospiraceae* se identifica como biomarcador cecal de conejos sanos.

El género *Clostridium* se ha relacionado con la EEC en estudios anteriores (De Blas et al., 2007; Chamarro et al., 2010 Pérez, 2013; Djukovic et al., 2018); principalmente las especies *C. perfringens* y *C. cuniculli*. No obstante, no se ha logrado reproducir la enfermedad por medio de la inoculación de dichas cepas. Djukovic et al. (2018) identificaron la especie *C. cuniculli* y se asociaron otras especies de *Clostridium* en el desarrollo del síndrome. Sin embargo, al tratar de reproducir la enteropatía con esta nueva especie no se tuvo éxito. La elevada abundancia de este género en el presente estudio y en los anteriores se relaciona la estasis cecal y la acumulación del alimento en el ciego. El papel etiológico de este microorganismo se asocia en el cambio de dieta, cuando se aumenta la cantidad de carbohidratos y se disminuye la ingesta de fibra (Zhu et al., 2013). Aunque, Jin et al., (2018) usaron este método para provocar el síndrome logrando solo un

10% de éxito, lo que pone en duda el protagonismo principal de *Clostridium*. No obstante, en todos los estudios que analizaron la etiología de EEC mencionados en el presente trabajo, se asocia *Clostridium* con la presentación del síndrome.

El aumento en la abundancia de los integrantes del phylum Verrucomicrobia se ha asociado con la presencia de EEC en estudios anteriores (Bäuerl et al., 2014; Jin et al., 2018), lo que coincide con lo reportado en el presente estudio. Sin embargo, los integrantes de este mismo phylum se han identificado en estudios de la microbiota cecal de conejos sanos (Mattioli et al., 2019; Yuan et al., 2019) y en muestras control negativo en estudios sobre EEC.

En el presente estudio se identificaron 2 géneros como biomarcadores: *A muciniphila* en conejos positivos a EEC y *A. sp69337* para conejos sanos. El aumento de *A. muciniphila* en el ciego del conejo si se ha asociado con la EEC (Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017; Jin et al., 2018). *A. muciniphila* es una bacteria Gram negativa, degrada mucinas y estimula su producción en el tracto gastrointestinal (Macchione et al., 2019; Earley et al., 2019).

En estudios sobre disbiosis humana (López-Siles et al., 2018; Earley et al., 2019) se ha reportado que disminuye *A. muciniphila* cuando hay presentación de colitis ulcerativa, síndrome de colon irritable y obesidad. De hecho, en estudios recientes se ha comprobado la bacteria desempeña a conservación de la barrera física del intestino al estimular la producción de mucinas (Derrien et al., 2017; Plovier et al., 2017; Bian et al., 2019).

Los integrantes del phylum Synergistetes son habitantes comunes en el suelo, así como en sistemas anaeróbicos como el tracto gastro intestinal de cerdos (Park et al., 2014; Vo et al., 2017). El cual se ha asociado como patógeno oportunista en el cerdo (Park et al., 2014) y en los bovinos como agente asociado con disbiosis orales (Borsanelli et al., 2018).

Los miembros del phylum Synergistetes se caracterizan por ser bacilos gran negativos, inmóviles, que no presentan esporas de respiración anaerobia obligada. No producen ácido acético, propiónico, isobutírico o succinato. Se caracterizan por degradar mucina y presentan resistencia a la vancomicina (Hiranmayi et al., 2017). Los integrantes del género *Cloacibacillus porcorum* pertenecen al phylum antes mencionado, fermentan aminoácidos y usan el moco como fuente de carbón (Looft et al., 2013).

En el presente estudio se identificó a *C. porcorum* en las muestras de conejos positivos a EEC (1.72%) y estuvo ausente en muestras de conejos sanos. De la misma manera (Jin et al. (2018). la identificaron en conejos EEC. Sin embargo, otros autores (Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017) no reportaron dicho género ni el phylum al que pertenece. De igual manera en estudios realizados con herramientas de secuenciación masiva de segunda generación en conejos sanos, no se reporta la identificación de este phylum (Mattioli et al., 2019; Yuan et al., 2019). Sin embargo, Eshar y Weese (2014) reportaron la presencia de Synergistetes en conejos sanos con secuenciación masiva de segunda generación. El aumento de este phylum puede estar asociado al aumento de la producción de moco como es el caso del phylum Verrucomicrobia y el género *A. muciniphila*.

La parálisis del ciego puede estar relacionada a la al incremento en la abundancia de los miembros del género *Clostridium spp.* (Romero et al., 2011), limitando el paso del alimento y los cecotrofos hacia el intestino grueso (Licois et al., 2005), en donde se realiza el recubrimiento de los cecotrofos con moco (Brewer, 2006). El moco es utilizado por *A. muciniphila* como nutriente para su crecimiento (Macchione et al., 2019), la ausencia de contenido cecal en el intestino grueso puede facilitar el crecimiento de *A. muciniphila*, la cual a su vez estimula la producción de moco en el intestino grueso (Earley et al., 2019).

En el segundo experimento se observó que los parámetros productivos se vieron afectados por la presencia o ausencia de EEC en animales. Esto está de acuerdo con un estudio previo sobre EEC (Combes et al., 2013), donde se informó que, los conejos que sobreviven al EEC, muestran pesos más bajos en comparación con conejos sanos en el mismo sistema. En el caso del consumo aparente de alimento, los grupos con signos de EEC tuvieron un consumo menor. Aquellos grupos que estaban sanos, EEC-31% y EEC-36%, tenían valores acordes con los reportados previamente para animales alimentados con dietas bajas en FDN ($\leq 30\%$) (Kovitvadhi et al., 2015), lo que está asociado con un menor tiempo de retención en el ciego y un aumento en la ingesta de alimentos (Álvarez et al., 2007). El grupo sano con una dieta alta en FDN presentó el mayor peso de finalización, así como la mayor ganancia de peso, con una interacción significativa con la dieta, esto se asocia a dos factores: el efecto sobre la ganancia de peso que se ha reportado al suplementar conejos con butirato (Carraro et al., 2005), debido a que este mismo grupo presentó una mayor concentración de ácido butírico en los cecotrofos analizados, lo cual está relacionado al aumento de la abundancia en el phyla Firmicutes,

en específico con la especie *Ruminococcus*, la cual se ha observado en estudios sobre la salud intestinal humana (Takahashi et al., 2016, Zeng et al., 2019), lo cual a su vez está relacionado al incremento de fibra dietaria en la dieta ofrecida (Ríos-Covián et al., 2016).

El efecto que las dietas tuvieron sobre la diarrea y la presencia de moco en heces es consistente con lo descrito por Combes et al. (2017), quienes observaron que una reducción del FDN del 30% al 25% aumenta la diversidad de la microbiota en el íleon, pero reduce la diversidad en el ciego. En cambio, Zhu et al., (2014).) reportaron una disminución en la presencia de diarrea en el día 20 en conejos con EEC suplementado con 33.6% de FDN, lo cual lo asociaron con un cambio en el ecosistema cecal, lo que condujo a una mayor producción de ácidos grasos volátiles y se relacionó a un cambio en el perfil microbiano del ciego, no obstante, no se realizó ningún estudio metagenómico para confirmar esta posibilidad.

Respecto al segundo experimento de este trabajo, la inclusión de la fibra tuvo un efecto importante sobre el perfil microbiano del tracto gastrointestinal de los conejos enfermos, ya que el incremento de la FDN en el grupo enfermo (EEC+36%) cambió el perfil microbiano de este grupo asemejándolo al perfil del grupo sano control (EEC-31%), lo cual tiene como consecuencia un cambio en el metabolismo cecal y la estabilidad de la microbiota.

Aunado a lo anterior se reporta una disminución en la diversidad de la microbiota presente en el ciego, disminución de la diarrea y cambio en el perfil de ácidos grasos volátiles al aumentar 5% de FDN en la dieta, lo cual coincide con lo mencionado anteriormente. El análisis metagenómico mostró una disminución en la abundancia en el grupo positivo a EEC tratado con el aumento de FDN en comparación al grupo positivo no tratado.

Los miembros de los phyla Bacteroidetes y Epsilonbacteraeota tuvieron una menor abundancia, siendo los integrantes de las familias *Bacteroidaceae* y *Christensenellaceae* los más afectados por reducción de abundancia, esto puede ser un efecto antimicrobiano del butirato (Zeng et al., 2019) y al aumento de la abundancia asociada al incremento de FDN en la dieta (Louis y Flint, 2009).

Las concentraciones de amonio observadas en los grupos EEC-31% y EEC-36% son similares a las obtenidas previamente para conejos clínicamente sanos (Forsythe y Parker,

1985). Estos valores están asociados con una alta absorción de amoníaco de la mucosa intestinal del conejo (Marty y Vernay et al., 1984). En cambio, los grupos con EEC (EEC+31% y EEC+36%) mostraron una mayor concentración de amonio en comparación a lo reportado en conejos clínicamente sanos. Por lo que se podría esperar diferencias en estas circunstancias, ya que esto podría estar asociado con dos factores diferentes desencadenados por el EEC. En primer lugar, podría haber daños en la mucosa intestinal, donde se ha observado apoptosis de las células epiteliales, junto con atrofia, fusión y destrucción de las vellosidades intestinales, y una infiltración reducida de las células inflamatorias (Licois et al., 2005). Dando lugar a una mala absorción de los alimentos en el torrente sanguíneo. En segundo lugar, los cambios en la microbiota intestinal también pueden tener un impacto (Abecia et al., 2017; Bäuerl et al., 2014) con un aumento en la abundancia de bacterias del género *Clostridium*, los cuales causan lesiones en la mucosa intestinal debido a las toxinas generadas (Romero et al., 2011), así como un aumento en la actividad ureolítica (Licois et al., 2005; Haligur et al., 2009).

El aumento en los AGV totales (Cuadro 21, Figura 21) está asociado con una mayor abundancia microbiana (Figura 25 y 27). Lo que supone un incremento en la actividad metabólica de las comunidades bacterianas. El grupo positivo a EEC con una dieta baja en fibra detergente neutro presentó una mayor concentración de ácido grasos volátiles ramificados (valérico, isovalérico e isobutírico), esto se ha reportado en la disbiosis asociada al cáncer de colon en seres humanos (Le Gall et al., 2018), también se asocia al metabolismo bacteriano de proteínas (Milton 1978, Macfarlane et al., 1992). El aumento de butirato en el grupo con una dieta más elevada en fibra detergente neutro se ha observado en otros estudios relacionados a la salud intestinal en seres humanos (Andoh et al., 2003, Zeng et al., 2019) y en bovinos (Plaizer et al., 2018). Los valores observados coinciden con los cambios en la concentración de FDN en otros estudios con conejos clínicamente sanos (Rodríguez-De Lara et al., 2008). En cuanto a los cambios en la riqueza de la microbiota, estos concuerdan con los reportados en estudios previos (Abecia et al., 2017; Bäuerl et al., 2014; Xiccato et al., 2008) para el grupo EEC que recibió la dieta con 36% de FDN. Sin embargo, los géneros afectados en el experimento 2 del presente estudio difieren de los reportados por Abecia et al. (2017) y Bäuerl et al. (2014). Cabe señalar que con 36% de FDN, es posible manipular la microbiota cecal de conejos con EEC clínica, al estimular la producción de butirato por parte de la microbiota cecal

con el incremento de FDN (Louis y Flint, 2009), lo que se refleja en un aumento en la abundancia de comunidades hemicelulolíticas principalmente en conejos positivos a EEC expuestos al tratamiento de FDN.

Las familias más abundantes en el grupo EEC+ 31% de FDN fueron: *Bacteroidaceae*, *Christensenellaceae* y *Barnesiellaceae*. Al aplicar el incremento de FDN cambió la abundancia de las familias, siendo las más abundantes: *Ruminococcaceae*, *Clostridiales_vadinBB60_group*, *Bacteroidaceae*, lo cual se asemeja a lo observado en el grupo EEC- 31%: *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Clostridiales_vadinBB60_group* como las familias más abundantes. El cambio se relaciona al tratamiento ofrecido.

En cuanto al incremento de la Familia Christensenellaceae se ha relacionado en humano y en ratones con una baja ganancia de peso (Fischbach y Segre 2016), lo que podría estar relacionado con la baja ganancia de peso del grupo EEC+31%, sin embargo, al aumentar la fibra en la dieta decrece su abundancia (Jenkins et al., 2015), como se observa en los grupos sanos (EEC-31% y EEC-36%) y el grupo tratado EEC+36%.

Sin embargo, lo que está claro es que las diferencias detectadas en los datos de secuencia de las muestras cecales no se traducen en información equivalente en las muestras fecales (Cuadro 24 y 25), esto debido al origen fisiológico de cada muestra, por lo que el cecotrofo tiene una composición distinta de nutrientes disponibles para las comunidades microbianas (Cuadro 13, Gecele, 1986).

Respecto a los índices de diversidad, el grupo positivo a EEC con dieta control (31% de FDN) tiene valores de los índices Chao1 y ACE mayores, en comparación con lo publicado en los estudios antes mencionados por Abecia et al. (2017) 245.0 y por Jin et al. (2018) 215.2 en el índice de Chao1 y 204.3 en el caso de ACE reportado por Jin et al., (2018). Pero los valores de los índices reportados en los otros grupos experimentales (EEC-31%, EEC-36% y EEC+36%) fue diferente a lo publicado en los estudios antes mencionados. Los valores anteriores se relacionan al aumento en la producción de ácido butírico promovido por el aumento de FDN en la dieta. El grupo negativo a la enteropatía con el aumento de FDN en la dieta fue el que menor abundancia presentó. No obstante, Jin et al, (2018), correlacionaron negativamente a este metabolito con el aumento en la abundancia de: *Bacteroides* spp, *Akkermansia* spp y *Clostridium* spp al provocar la EEC con una disminución de 9% de FDN en la dieta.

En ambos experimentos de este estudio, se registró un peso menor de todos los conejos positivos a la EEC. Esto coincide con lo reportado en estudios anteriores sobre la caracterización de este síndrome (Licois et al., 2005; Dewrée et al., 2007; Haligur et al., 2009). Adicionalmente, la etiología de este síndrome se ha asociado principalmente con una deficiencia de fibra en la alimentación del conejo (Gómez-Conde et al., 2007; Jacquier et al., 2014; Jin et al., 2018). En el experimento de inclusión de fibra se observó la disminución de signos como diarrea y moco (datos no mostrados) en heces en los registros tomados diariamente, sin embargo la diarrea cesó al día 9 del experimento impidiendo un análisis estadístico. En lo referente al perfil microbiano se observó una disminución en la abundancia de los conejos tratados en comparación con los conejos no tratados (Índice de Chao 1 y ACE, Cuadro 24). Esto puede estar relacionado con el incremento en la cantidad y la calidad de la fibra ofrecida en la dieta de conejos en crecimiento, beneficiando así el estado de salud, debido a que aumenta la barrera física en el tracto gastrointestinal, regula los patrones de fermentación y propicia el crecimiento de comunidades benéficas en el conejo como el género *Ruminococcus* spp (Álvarez et al., 2007; Zhu et al., 2013; Liangzhan et al., 2016).

Los metabolitos producidos en la fermentación también han sido asociados a la salud gastrointestinal (Gasmi et al., 2013; Oso et al., 2013). El aumento del ácido butírico se ha asociado con la reducción de bacterias del phylum Bacteroides (Takahashi et al., 2016) y la reducción de este metabolito se ha correlacionado con el aumento de poblaciones microbianas oportunistas (Zeng et al., 2019). También se ha asociado con la presentación de la EEC como un cambio secundario a la disbiosis cecal (Jin et al., 2018). En el experimento 2 del presente trabajo se observó una disminución en la concentración de AGV's en el grupo positivo tratado (EEC+ 36%) en comparación al grupo positivo no tratado (EEC+ 31%), no obstante, también se registró un aumento en la concentración de ácido butírico en el grupo negativo expuesto al tratamiento (EEC- 36%). Esto sugiere que el aumento en FDN promueve la producción de ácido butírico en conejos sanos (Louis y Flint, 2009) y que el efecto antimicrobiano (Pattayil et al., 2019) de este metabolito se observa en el cambio de la abundancia entre los grupos EEC+31% y EEC+ 36%.

La etiología de la EEC ha sido estudiada por diferentes autores (Licois et al., 2005; Marlier et al., 2006; Huybens et al., 2013; Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017; Jin et al., 2018) con el fin de conocer los agentes relacionados y así proponer un tratamiento

eficaz. Ya sea usando antibióticos (Xiccato et al., 2008; Dip et al., 2015) o elementos alternativos como la modulación de la microbiota por medio de la fibra (Combes et al., 2013; Simpson et al., 2015; Wong et al., 2016).

En el presente estudio se abordó la enteropatía epizoótica del conejo (EEC) tomando en cuenta lo publicado por los autores anteriormente mencionados. Sin embargo, se realizaron cambios en la metodología y el análisis de datos proveyendo más información para poder entender y prevenir este síndrome. Dichas modificaciones se aplicaron en la metodología de ambos experimentos que componen el presente estudio. En donde, se usó la plataforma de secuenciación masiva de segunda generación Illumina MiSeq, identificando la región V3-V4 del gen 16s ribosomal. En estudios anteriores se analizaron la región V3 con la plataforma 454 Roche (Bäuerl et al., 2014), la región V3-V5 con la plataforma 454 Roche (Abecia et al., 2017) y la región V4 con la plataforma Illumina MiSeq (Jin et al., 2018). No obstante, en el presente estudio no se realizó una amplificación por PCR previa a la construcción de la librería. La modificación anterior se realizó debido a que la amplificación previa a la secuenciación ha presentado diferencias en el análisis de abundancias microbianas (Aird et al., 2011; Kobschull y Zador, 2015). Adicionalmente, se aplicó el uso del método de asignación previa (Siegwald et al., 2017) y la aplicación del algoritmo DADA2, el cual disminuye al mínimo el error bioinformático (Callahan et al., 2016). En estudios anteriores (Bäuerl et al., 2014; Abecia et al., 2017) el análisis bioinformático se llevo a cabo con el método de clustering o agrupamiento previo, pero no se usó el algoritmo DADA2 para minimizar errores en las secuencias.

El aumento en la abundancia que se registró en el grupo EEC+ del experimento 1 (Cuadro 20) fue mayor con el índice de Chao 1 reportado por Abecia et al., (2017) fue 180.01 y Jin et al., (2018) fue 191.4. No obstante, el valor de abundancia de conejos sanos del primer experimento del presente trabajo fue similar a los valores publicados en los dichos autores. La diferencia en los valores obtenidos en este estudio se asocia al origen de los conejos y el tipo de alimentación ofrecida. En el experimento 1 del presente estudio los conejos se obtuvieron de granjas de producción y no se ofreció ningún tipo de antibiótico en la dieta. (Abecia et al., 2017) obtuvieron los conejos de una granja comercial, pero ofrecieron antibióticos en la dieta. La inclusión de antibióticos afecta el perfil microbiano de conejos sanos y positivos a EEC (Boisot et al., 2004; Abecia et al., 2007a). En cambio,

en el estudio de Jin et al. (2018), no se ofrecieron antibióticos, pero los conejos estaban libres de patógenos específicos y se desarrollaron en condiciones de laboratorio lo que afecta la colonización común de microorganismos y afecta la diversidad y la abundancia de la microbiota del tracto gastrointestinal (Abecia et al., 2007b; Combes et al., 2014; Combes et al., 2017).

7. Conclusión

El presente trabajo asocia la presentación de la enteropatía epizoótica del conejo con un aumento en la abundancia de organismos de los phyla Synergistetes, Verrucomicrobia, Bacteroides y Firmicutes, identificando a los géneros *A. muciniphila*, *Clostridium spp.* y *Cloacibacillus porcorum* como altamente asociados a la EEC. Así como una disminución en los índices de diversidad.

La manipulación de la microbiota cecal del conejo por medio del suplemento de carbohidratos estructurales de origen vegetal tiene un efecto positivo al promover la producción deAVG Ya que se logró restituir el perfil microbiano al reestablecer las abundancias de las familias *Ruminococcaceae* y *Clostridiales* como las mas abundantes y reduciendo las familias *Bacteroidaceae*, *Christensenellaceae* y *Barnesiellaceae* como se muestra en el perfil de conejos sanos. Lo que a su vez reduce los signos de la EEC como la diarrea, la distención cecal y la alta mortalidad en conejos jóvenes.

El uso de diversas herramientas de análisis como el estudio metagenómico y metabolómico ofrecen datos valiosos en el diseño y prueba de tratamientos alternativos para este síndrome. Cabe mencionar que el presente estudio hace uso de la segunda generación de secuenciación masiva por medio de la plataforma más popular en análisis metagenómicos. Aunado a esto, la aplicación del algoritmo DADA2 y el análisis LefSe permitió proponer agentes microbianos como biomarcadores con un índice de error menor a otras metodologías anteriormente utilizadas.

8. Referencias

- Abecia L., Fondevila M., Balcells J., Edwards E., Newbold C., McEwan N. 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiol Lett.* 244 (1): 111–115. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.01.028
- Abecia L., Fondevila M., Balcells J., McEwan N. 2007b. The effect of lactating rabbit does on the development of the caecal microbial community in the pups they nurture. *Journal of Applied Microbiology.* 103 (3): 557-564. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03277.x
- Abecia L., Fondevila M., Balcells., Edwards J., Newbold C., McEwan N. 2007a. Effect of antibiotics on the bacterial population of rabbit caecum. *FEMS Microbiol Lett.* 272 (2): 144-153. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00746.x
- Abecia L., Rodríguez-Romero N., Martínez-Fernández G., Martínez-Vallespín B., Fondevila M. 2017. Pyrosequencing study of cecal bacterial community of rabbit does and kits from a farm affected by epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Sci.* 25 (3):261-272. DOI: 10.4995/wrs.2017.5230
- Acevedo D., Montero P., Jaimes J. 2015. Determinación de Antibióticos y Calidad Microbiológica de la Carne de Pollo Comercializada en Cartagena (Colombia). *Inf tecnol.* 26 (1): 71–76. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000100008>
- Adjiri D., Bouillier-Oudot M., Lebas F., Candau M. 1992. In Vitro Simulation of Rabbit Cecal Fermentation in a Semi- Continuous Flow Fermentor. Role of Food Substrate Pretreatment. *Reprod Nutr Dev.* 32 (4): 351–360. PMID:1418397
- Aguilera P., Ruiz M., Rocha M., Pineda., Chávez M. 2014. PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Compiladoras: Cornejo A., Serrato A., Aguilar B., Rocha M. INECC-SEMARNAT. 175-201. ISBN: 978-607-8246-72-4
- Aird D., Ross M., Chen W., Danielsson M., Fennell T., Russ C., Jaffe D., Nusbaum., Gnirke A. 2011. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 12 (2): 18. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-r18
- Alcázar-Alay S., Almeida M. 2015. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Sci. Tecnol, Campinas.* 35 (2): 215-236. DOI: 10.1590/1678-457X.6749
- Alcolado P. 1998. Conceptos e índices relacionados con la diversidad. *Avicennia.* 8 (9): 7-21. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Pedro_Alcolado/publication/265963780_Conceptos_e_indices_relacionados_con_la_diversidad/links/54662c150cf25b85d17f5abd/Conceptos-e-indices-relacionados-con-la-diversidad.pdf
- Allali I., Arnold J., Roach J., Cadenas M., Butz N., Hassan H., Koci M., Ballou A., Mendoza M., Ali R., Azcarate-Peril M. 2017. A comparison of sequencing platforms and

bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiology* 17 (194) DOI: 10.1186/s12866-017-1101-8

Allen A., Bryant U. 2009. What's Up Doc? *Canadian Veterinary Journal*. 50 (12): 1297-1299. PMID: 20190983

Álvarez J., Marguenda I., García-Rebollar P., Carabaño R., De Blas C., Corujo A., García-Ruiz A. 2007. Effects of type and level of fiber on digestive physiology and performance in reproducing and growing rabbits. *World Rabbit Sci.* 15 (1) :9–17. DOI: 10.4995/wrs.2007.610

Ambardar S., Gupta R., Trakroo D., Lal R., Vakhlu J. 2016. High throughput sequencing: An overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol.* 56 (4): 394-404. DOI 10.1007/s12088-016-0606-4

Andoh A., Tsujikawa T., Fujiyama Y. 2003. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (4): 347-358. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612033391973>

AOAC. Official Methods of Analysis. 2010. 15th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemist USA; 941.04, 942.05, 954.01, 978.10, 2001.12, 2002.04,

Arm H., Floyd T., Faber J., Hayes J. 1965. Use of ligated segments of rabbit small intestine in experimental shigellosis. *Journal of bacteriology*. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology. 89 (3): 803-809. Disponible: <https://jb.asm.org/content/jb/89/3/803.full.pdf>

Basu S., Bose C., Ojha N., Das N., Das J., Pal M., Khurana S. 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. 11 (4): 182-184. DOI: 10.6026/97320630011182

Bäuerl, C.; Collado, M. C.; Zúñiga, M.; Blas, E.; Pérez Martínez, G. 2014. Changes in Cecal Microbiota and Mucosal Gene Expression Revealed New Aspects of Epizootic Rabbit Enteropathy. *PLoS One*. 9 (8): e105707. DOI: 10.1371/journal.pone.0105707

Bellier R., Gidenne T., Vernay M., Colin M. 1995. In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *J. Anim. Sci.* 73 (1): 128-135. DOI: 10.2527/1995.731128x

Bengtsson-Palme J., Hartmann M., Eriklsson K., Pal C., Thorell K., Larsson D., Nilsson R. 2015. METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*. 15: 1403-1414. DOI: 10.1111/1755-0998.12399

Bergdall V., Dysko R. 1994. Mucoid enteropathy. Chapter 15. Metabolic, Traumatic, Mycotic, and Miscellaneous Diseases of Rabbits. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2st Ed. Academic College of Laboratory Animal Medicine. 335-353. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-469235-0.50021-X>

Bian X., Wu W., Yang L., Lv L., Wang Q., Li Y., Ye J., Fang D., Wu J., Jiang X., Shi D., Li L. 2019. Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Front Microbiol.* 10: 2259. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02259

Boisot P., Duperray J., Guyonvarch A., Richard A., Licois D., Coudert P. 2004. Evaluation of the effectiveness of soluble bacitracin (Bacivet s®) in drinking water compared to bacitracin in the feed (Albac®), during an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy syndrome. México. In Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, México. 457-462. Disponible: <http://www.world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2004-Puebla/Papers/Pathology/P-Boisot.pdf>

Bolger A., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15): 2114-2120 DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170

Bolyen E., Rideout J., Dillon M., Bokulich N., Abnet C., Al-Ghalith G., Alexander H., Alm E., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C., Brown C., Callahan B., Caraballo-Rodríguez A., Chase J., Cope E., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P., Douglas G., Durall D., Duvallet C., Edwardson C., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J., Gibbons S., Gibson D., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G., Janssen S., Jarmusch A., Jiang L., Kaehler B., Kang K., Keefe C., Keim P., Kelley S., Knights D., Koester I., Kosciulek T., Kreps J., Langille M., Lee J., Ley R., Liu Y., Lofffield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B., McDonald D., McIver L., Melnik A., Metcalf J., Morgan S., Morton J., Naimey A., Navas-Molina J., Nothias L., Orchanian S., Pearson T., Peoples S., Petras D., Preuss M., Pruesse E., Rasmussen L., Rivers A., Robeson M., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S., Spear J., Swafford A., Thompson L., Torres P., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P., Ul-Hasan S., van der Hoof J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K., Williamson C., Willis A., Xu Z., Zaneveld J., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., and Caporaso J. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Borsanelli A., Lappin D., Viora L., Bennett D., Dutra I., Brandt B., Riggio M. 2018. Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health. *Veterinary Microbiology*. 218: 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.016>

Bottagisio M., Coman C., Lovati A. 2019. Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *Journal of Medical Microbiology*. 68 (4): 506-537. DOI 10.1099/jmm.0.000952.

Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J., Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29 (8): 601-608. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.012

Boucher S. 1998. El síndrome enteropatía mucoide. *Lagomorpha. Asociación Española de Cunicultura.* 95, 21 (1): 14–20. ISSN: 1137-8581. Disponible:

https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_CUNI/CUNI_1998_095_completa.pdf

Brewer N. 2006. Biology of the rabbit. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 45, (1): 8-24. Disponible: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2006/00000045/00000001/art00001?crawler=true>

Brown K., DeCoffe D., Molcan E., Gibson D. 2012. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*. 4 (8): 1095-1119. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu4081095>

Bywater R., McConville M., Phillips I., Shryock T. 2005. The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 56 (3): 538-43. DOI: [10.1093/jac/dki273](https://doi.org/10.1093/jac/dki273)

Caja G., González E., Flores C., Carro M., Albanell E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: Probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. *Producción Animal*. 193: 2-8. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Elena_Albanell/publication/234116126_Alternativas_a_los_antibioticos_de_uso_alimentario_en_rumiantes_probioticos_enzimas_y_acidos_orgánicos_II/links/02e7e515ac51fb4f43000000/Alternativas-a-los-antibioticos-de-uso-alimentario-en-rumiantes-probioticos-enzimas-y-acidos-organicos-II.pdf?origin=publication_detail

Callahan B., McMurdie P., Rosen M., Han A., Johnson A., Holmes S. 2016. DADA2: High-resolution simple inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. Advance Online Publication. Brief Communications. 13: 581-583. DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)

Callaway T., Edrington T., Anderson R., Harvey R., Genovese K., Kennedy C., Venn D., Nisbet D. 2008. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Symposium on Antimicrobial Resistance in Bacteria from Animals*. *Anim Heal Res Rev*. 9 (2): 217-225. DOI: [10.1017/S1466252308001540](https://doi.org/10.1017/S1466252308001540)

Caña-Rodríguez A., Williams H. 1966. The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. *Biochem. J*. 100, (1): 79-82. DOI: [10.1042/bj1000079](https://doi.org/10.1042/bj1000079)

Cancho B., García M., Simal J. 2000. El uso de antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc y Tecnol Aliment*. 3 (1): 39-47. DOI: [10.1080/11358120009487647](https://doi.org/10.1080/11358120009487647)

Caporaso J., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F., Costello E., Fierer N., González A., Goodrich J., Gordon J., Huttley G., Kelley S., Knights D., Koenig J., Ley R., Lozupone C., McDonald D., Muegge B., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J., Turnbaugh P., Walters W., Widmann J., Yatsunencko T., Zaneveld J., Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7: 335-336 DOI: [10.1038/nmeth.f.303](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303)

Carabaño R.; Badiola I.; Chamorro S.; García J.; García-Ruiz A.; García-Rebollar P.; Gómez-Conde M.; Gutiérrez I.; Nicodemus N.; Villamide M.; de Blas J. 2008. Review. New trends in rabbit feeding: influence of nutrition on Intestinal health. Spanish J. Agric. Res. 6, SPEC. ISS: 15–25. ISSN: 1695-971-X

Carraro L., Xiccato G., Trocino A., Radaelli G. 2005. Dietary supplementation of butyrate in growing rabbits. Italian Journal of Animal Science, 4, (2): 538-540. DOI: 10.4081/ijas.2005.2s.538

Catto C., Garuglieri E., Borruso L., Erba D., Casiraghi M., Cappitelli F., Villa F., Zecchin S., Zanchi R. 2019. Impacts of dietary silver nanoparticles and probiotic administration on the microbiota a fan in vitro gut model. Environmental Pollution. 245: 754-763. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.019>

Cerqueda-García D., Falcón L. 2016. La construcción del nicho y el concepto de holobionte, hacia la reestructuración de un paradigma. Revista Mexicana de Biodiversidad. 87: 239-241. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.11.001>

Chamorro S., De Blas C., Grant G., Badiola I., Menoyo D., Carabaño R. 2010. Effect of dietary supplementation of glutamine-arginine on intestinal health in twenty-five-day-old weaned rabbits. J, Anim. Sci. 88: 170-180. DOI: [doi:10.2527/jas.2008-1698](https://doi.org/10.2527/jas.2008-1698)

Chapman J., Flux J. 2008. Introduction to the Lagomorpha. Lagomorpha Biology. Evolution, Ecology and Conservation. Springer-Verlag Berlin Heiderlberg. Editores: Alves P., Ferrand., Hackländer. New York ISBN: 978-3-540-72445-2

Cheeke P. 1995. Capítulo 12. Relaciones entre nutrición y enfermedad. Alimentación y nutrición del conejo. Acibria, S. A. Zaragoza, España: 203-227. Disponible: http://redbiblio.unne.edu.ar/pdf/0603-003633_I.pdf

Chistiakov D., Bobryshev Y., Kozarov E., Sobenin I., Orekhov A. 2015. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. Frontiers in Microbiology. 5 (781): 1-9. DOI: [10.3389/fmicb.2014.00781](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00781).

Clavel T., Lagkouvardos I., Hiergeist A. 2016. Microbiome sequencing: challenge and opportunities for molecular medicine. Journal Expert Review of Molecular Diagnostics. 16 (7): 795-805. DOI: [10.1080/14737159.2016.1184574](https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1184574)

Clemente J., Ursell L., Parfrey L., Knight R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. 148 (6): 1285-1270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>

Collado M., Delgado S., Maldonado A., Rodríguez J. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology. 48 (5): 523-528. DOI: [10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x)

Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L, Gidenne T. 2013. Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. Animal. 7, (9):1429–1439. DOI: [10.1017/S1751731113001079](https://doi.org/10.1017/S1751731113001079)

Combes S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L., Gidenne T. 2012. Controlling the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. Proceedings 10th World Rabbit Congress. World Rabbit Science Association. 475-494. Disponible: <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2012-Egypt/Papers/03-Nutrition/N01-Combes.pdf>

Combes S., Gidenne T., Cauquil L., Bouchez O., Fortun-Lamothe L. 2014. Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status. *J Anim Sci.* 92, (2): 652–665. DOI: 10.2527/jas.2013-6394.

Combes S., Massip K., Martin O., Furbeyre H., Cauquil L., Pascal G., Bouchez O., Le Floc'h N., Zemb O., Oswald I., Gidenne T. 2017. Impact of feed restriction and housing hygiene conditions on specific an inflammatory immune response, the cecal bacterial community and the survival of young rabbits. *Animal.* 11 (5): 854-863. DOI: 10.1017/S1751731116002007

Combes S., Michelland R., Monteils V., Cauquil L., Soulié V., Tran N., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77 (3): 680–689. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x

Comisión ética asesora para la experimentación animal. 2013. Evaluación del dolor en el conejo. Universidad de Zaragoza. Diseños experimentales. Disponible: http://cea.unizar.es/Disenos_experimentales/Anestesia%20y%20analgesia/Evaluacion_dolor/Evaluacion_dolor_en_conejos.pdf

Costa M., Weese J. 2019. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *The veterinary Journal.* 249: 10-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.005>

Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 22 (5): 299-305. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)

Crincoli C., García-Campayo V., Rihner M., Nikiforov A., Liska D., Van de Ligt J. 2016. Evaluation of the gastrointestinal tolerability of corn starch fiber, a novel dietary fiber, in two independent randomized, double-blind, crossover studies in healthy men and women. *Int J Food Sci Nutr.* 67 (7): 1–13. DOI: 10.1080/09637486.2016.1198891

Crowley E., King, J., Wilkinson T., Worgan H., Huson K., Rose M., McEwan N. 2017. Comparison of the microbial population in rabbits and guinea pigs by next generation sequencing. *PLoS ONE.* 12, (2): 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165779>

Cubas F., Rodríguez S., Rodríguez E. 2013. Conejos neozelandeses: efecto de la alimentación con balanceado comercial y artesanal, sobre la ganancia de peso. *Compendio de Ciencias Veterinarias.* 3 (1): 24–27. ISSN: 2226-1761.

Dahm R. 2005. Friederich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology.* 278 (2): 274-288. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>

Dalle Zotte A. 2014. Rabbit farming for meat purpose. *Animal Frontiers*. 4 (4): 62-67. DOI: 10.2527/af.2014-0035

De Blas J., García S., Gómez-Conde R. 2002. Restricciones a la formulación de piensos para minimizar la patología digestiva en conejos. In Proc. XVIII Curso de Especialización FEDNA. 157 (163): 73–93. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Rosa_Carabano/publication/28179837_Restricciones_a_la_formulacion_de_piensos_para_minimizar_la_patologia_digestiva_en_conejos/links/02e7e51c016b2b2356000000.pdf

De Blas, J., Astillero, J., Chamorro, S., Corujo, A., García-Alonso, J., García-Rebollar, P., García-Ruiz, A., Menoyo, D., Nicodemus, N., Romero, C., Carabaño R. 2007. Efectos de la nutrición y el manejo sobre el desarrollo de patologías digestivas de gazapos en un entorno de enteropatía epizootica. In XXIII Curso de Especialización FEDNA: 213–228. Disponible: https://www.federaciongalegadecaza.com/biblioteca/coello/CIENTIFICAS_010.pdf

De la Fuente G., Belanche A., Girwood S., Pinloche E., Wilkinson T., Newbold J. Pros and cons of Ion-Torrent Next Generation Sequencing versus Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community. 2014. *PLoS ONE* 9, 7: e101435. DOI: 10.1371/journal.pone.0101435

Derrien M., Belzer C., M de Vos W. 2017. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*. 106: 171-181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>

Des Besten G., van Eunen., Groen A., Venema K., Reijngoud D., Bakker B. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *JLR Papers in Press*. 54: 2325-2340. DOI: 10.1194/jlr.R036012

Deurenberg R., Bathoorn E., Chlebowicz M., Couto N., Ferdous M., García-Cobos S., Kooistra-Smid A., Raangs E., Rosema S., Veloo A., Zhou K., Friedich A., Rossen J. 2016. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*. 243: 16-24. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022

Dewrée R., Meulemans L., Lassence C., Desmecht D., Ducatelle R., Mast J., Licois D., Vindevogel H., Marlier D. 2007. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Sci*. 15 (2): 91-102. DOI: 10.4995/wrs.2007.602

Dip R., Nemet Z., Schiessl B., Klein U., Strehlau G. 2015. Efficacy and tolerability of early administration of valnemulin hydrochloride premix on epizootic rabbit enteropathy. *The Veterinary Journal*. 204 (3): 309–314. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.12.036

Djukivic A., García-Garcera M., Martínez-Paredes E., Issac S., Artacho A., Martínez J, Ubeda C. 2018. Gut colonization by a novel *Clostridium* species is associated with the onset of epizootic rabbit enteropathy. *Vet Res*. 49 213 DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0617-8>

Domínguez H., Barrios G., Pérez Y. 2008. Fisiología Digestiva y Nutrición en la Especie Cunicola. Consultado 26-08-2019. Disponible en <http://monografias.umcc.cu/monos/2008/Agronomia/m0816.pdf>

Edgar R. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 26 (19): 2460–2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461

Earley H., Lennon G., Balfe A., Coffey J., Winter D., O'Connell P. 2019. The abundance of *Akkermansia muciniphila* and its relationship with sulphated colonic mucins in health and ulcerative colitis. *Scientific Reports Nature Research*. 9: 15683. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51878-3>

El-Katcha M., Ismail E., Soltan M., Karima E. 2011. Effect of dietary probiotics supplementation on growth performance, immune response, some blood parameters and carcass quality of growing rabbits. *J. VET. SCIENCE*. 34, 1: 153-169. ISSN 110-2047

Eshar D., Weese J., 2014. Molecular analysis of the microbiota in hard feces from healthy rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) medicated with long term oral meloxicam. *BMC Veterinary Research* 10: 62. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-62>

Esser D., Lange J., Marinos G., Sieber M., Best L., Prasse D., Bathia., J Rühlemann M., Boersch K., Jaspers C., Sommer F. 2019. Functions of the microbiota for the physiology of animal metaorganism. *J Innate Immun*. 11: 393-404 DOI: 10.1159/000495115

Ezema C., Eze D. 2012. Determination of the effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance and haematological parameters of rabbits. *Comp Clin Pathol* 21:73–76. DOI 10.1007/s00580-010-1066-6

Falcão L., Castro L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J., Mourão J. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: A review. *World Rabbit Sci*. 15, 3: 127–40. DOI: <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.597>

FAO, OMS. 2006. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación FAO. 1a Edición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 85: 2-4. Disponible: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>

FAO. Pak N. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1997. Capítulo 16. Análisis de fibra dietética. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. 1ra ed. FAO. INTA. 1997. Disponible: <http://www.fao.org/3/Ah833s19.htm>

FAOSTAT. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

Fernández M., Le Borgne S. 2014. DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturante. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Compiladoras: Cornejo A., Serrato A., Aguilar B., Rocha M. INECC-SEMARNAT. 175-201. ISBN: 978-607-8246-72-4

Fernández, G. 2006. Enfermedades Infecciosas que cursan con procesos digestivos en conejos. Boletín de Cunicultura Lagomorpha. 144: 23–40. JSSN: 1696-6074. Disponible: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Cuni/Cuni_2006_144_23_40.pdf

Ferrand N., Branco M. The evolutionary history of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): major patterns of population differentiation and geographic expansion inferred from protein polymorphism. 2007. Phylogeography of Southern European Refugia. Edit. Weiss S., Ferrand N. Springer, Dordrecht. DOI: https://doi.org/10.1007/1-4020-4904-8_7

Finzi, A., Macchioni, P., & Negretti, P. 2008. Rabbit health control by management. 2008. Proceedings of 9th World Rabbit Congress. 950-952. ISSN: 2308-1910. Disponible: <https://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2008-Verona/Papers/P-Finzi.pdf>

Fischbach M., Segre J. 2016. Signaling in host-associated microbial communities. Cell. 164 (6): 1288-1300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.037>

Fisher M., Triplett E. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to Freshwater bacterial communities. Applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology. 65 (10): 4630-4636. Disponible: <https://aem.asm.org/content/aem/65/10/4630.full.pdf>

Flint H., Bayer E., Rincon M., Lamed., White B. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. Nature Reviews. Microbiology. 6:121-131. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>

Forsythe S., Parker D. 1985. Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. J Appl Bacteriol 58 (4):363–369. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb01475.x>

Fox R. 1994. Chapter 1. Taxonomy and genetics. The Biology of the Laboratory Rabbit. Manning P., Ringler D., Newcomer C. Academic Press. Second edition. 1-19.

Fraher M., O'Toole P., Quigley E. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 9, 312–322. DOI: [10.1038/nrgastro.2012.44](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44)

Franz R., Kreuzer M., Hummel J., Hatt J., Clauss M. 2011. Intake, selection, digesta retention, digestion and gut fill of two coprophageous species, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*), on a hay-only diet. J Anim Physiol Anim Nutr. 95 (5):564–570. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01084.x>

Fukuda K., Ogawa M., Taniguchi H., Saito M. 2016. Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. J UOEH. 38 (3): 223-232. DOI: <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>

Galaxy Community Hub. 2019. NSF, NHGRI, The Huck Institutes of the Life Sciences, The Institute for CyberScience at Penn State, Johns Hopkins University. Disponible: <https://www.galaxyproject.org>

Garrido J., García F., Álvarez J., Manzano F. 2017. DNA sequencing sensors: An overview. *Sensors*. 17 3, (588): 1-15 DOI: 10.3390/s17030588

Garrido S., Nicodemus N., Chamorro S. 2006. Influencia de la edad al destete (25 vs 35), la nave y el periodo sobre la mortalidad y parámetros productivos en gazapos. *Nutrición. Cunicultura.com*. Asociación Española de Cunicultura. 95–101. Disponible: <https://cunicultura.com/2007/04/influencia-de-la-edad-al-destete-25-vs-35-la-nave-vacio-sanitario-o-no-y-el-periodo-dos-partos-consecutivos-o-no-sobre-la-mortalidad-y-parametros-productivos-de-los-gazapos>.

Gasmi A., Mosquera M., Boubaker B. 2013. In Vitro Fermentation of Diets Incorporating Carob Pulp Using Inoculum from Rabbit Caecum. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 43 (1): 2–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v43i1.10>

Gecele P. 1986. Fisiología digestiva del conejo adulto. *Monografías de medicina veterinaria*. 8 (2): 1-8. Disponible: <https://estudiosdeeconomia.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/4876>

Gidenne T. 2015. Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. *The Animal Consortium*. 9 (2): 227–242. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731114002729>

Gidenne T., Combes S., Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal*. 6 (9): 1407–19. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731112000389>

Gidenne T., Fortun-Lamothe L. 2002. Feeding strategy for young rabbit around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Science*. 75 (2): 169-184. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1357729800052942>

Gidenne T., García J., Lebas F., Licois. 2010. Chapter 10. Nutrition and Feeding strategy: Interactions with pathology. *Nutrition of rabbit*. 2nd Edition. De Blas C., Wiseman J. CAB Intern. 179–99. Disponible: <http://wabbitwiki.com/images/7/7d/Nutrition.of.the.Rabbit.2ed-deBlas.Wiseman.pdf>

Gilbert R., Klieve V. 2015. Ruminant Viruses (Bacteriophages, Archaeophages). In: Puniya A., Singh R., Kamra D. (eds) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer, New Delhi. 121-141. DOI: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_9

Gómez-Conde M., García J., Chamorro S., Eiras P., Rebollar P., Pérez De Rozas A., Badiola I., de Blas C., Carabano R. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J Anim Sci*. 85 (12): 3313–3321. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2006-777>

- Grönlund M., Grzeškowiak L., Isolauri E., Salminen S. 2011 Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant, *Gut Microbes*, 2:4, 227-233, DOI: 10.4161/gmic.2.4.16799
- Gu Y., Wang P., Kong C. 2009. Urease, invertase, deshydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety. *European Journal of Soil Biology*. 45 (5-6): 436-441. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2009.06.003
- Guerrero R., Margulis L., Berlanga M. 2013. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*. 16:133-143. DOI: 10.2436/20.1501.01.188
- Gupta P. 2008. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends in Biotechnology*. Cell press. 26 (11): 602-611. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.07.003
- Gutiérrez C., Cobos M., Docoing A., Hernández D., Rodríguez R. 2008. Productive response, cecal fermentation and diarrheic morbidity in rabbits fed with bacterial supplements of *Clostridium sordellii* or *Peptostreptococcus tetradius*. *Veterinaria México*. 39 (4): 397-410. Disponible: <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2008/vm084d.pdf>
- Haligur M., Ozmen O., Demir N. 2009. Pathological and Ultrastructural Studies on Mucoïd Enteropathy in New Zealand Rabbits. *J. Exot. Pet Med*. 18 (3): 224–228. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.06.006>
- Hall M., Beiko R. 2018. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. In: Beiko R., Hsiao W., Parkinson J. (eds) *Microbiome Analysis. Methods in Molecular Biology*, vol 1849. Humana Press, New York, NY. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3_8
- Heip C., Herman P., Soetaert K. 1998. Index of diversity and evenness. *Oceanis. Institut Océanographique*. 24 (4): 61-87. ISSN: 0182-0745
- Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Global Rumen Census Collaborators., Janssen P. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports. Nature Research Journal*. 5:14567. DOI: 10.1038/srep14567.
- Hernández D., Cobos M. 2001. Digestibilidad in vitro, población de bacterias celulolíticas y totales del apéndice cecal, ciego y colon del conejo. *Técnica Pecuaria en México*. 39, 3: 229-236. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61339305>
- Hernández P., Dalle Zotte A. 2010. Chapter 9. Influence of diet on rabbit meat quality. *The nutrition of the rabbit*. De Blas C., Wiseman J. 2da Edición. CAB International Publishing. 163–178. ISBN: 978-1-84593-669-3
- Herrera J.; Pérez, L. 2007. Investigación En Nutrición Del Conejo (*Oryctolagus cuniculus*) En México, de 1978 a 2006. Tesis profesional. Dirección: Dr. Ramés Salcedo Baca. Universidad Autónoma de Chapingo. Disponible: <https://docplayer.es/46589918-Universidad-autonoma-chapingo.html>

Hiergeist A., Glasner J., Reischl U., Gessner A. 2015. Analyses of intestinal microbiota: Culture versus sequencing. *ILAR Journal*. 56 (2): 228-240. DOI: 10.1093/ilar/ilv017

Hiranmayi K., Sirisha K., Ramoji Rao M., Sudhakar P. 2017. Novel pathogens in periodontal microbiology. *J Pharm Bioallied Sci*. 9 (3): 155-163. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_288_16

Huybens N., Horueix J., Licois D., Mainil J., Marlier D. 2013. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples *The Veterinary Journal*. 196: 109-110. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.014>

Iebba V., Totino V., Gagliardi A., Santangelo F., Cacciotti F., Trancassini M., Mancini C., Cicerone C., Corazziari E., Pantanella F., Schippa S. 2016. Eubiosis and disbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol*. 39, (1): 1-12. Disponible: http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2016/1/1.pdf

INEGI. 2011. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos El Marqués, Querétaro. México; Disponible: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/22/22011.pdf

Inkpen A. 2019. Health, ecology and the microbiome. *Philosophy of Biology*. eLIFE. 8. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47626>

Irving-Pease E., Frantz L., Sykes N., Callou C., Larson G. 2018. Rabbits and the specious origins of domestication. *Trends in Ecology and Evolution*. 33 (3): 149-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.12.009>

Jacquier V., Combes S., Oswald I., Rogel-Gaillard C., Gidenne T. 2014. Early modulation of the cecal microbial activity in the young rabbit with rapidly fermentable fiber: Impact on health and growth. *J Anim Sci*. 92 (12): 5551–5559. DOI: 10.2527/jas.2014-7604

Jin D., Zou H., Liu S., Wang L., Xue B., Wu D., Tian G., Cai J., Yan T., Wang Z., Peng Q. 2018. The underlying microbial mechanism of epizootic rabbit enteropathy triggered by a low fiber diet. *Scientific reports*. Nature. 8: 12489 DOI: 10.1038/s41598-018-30178-2

Johnson-Delaney C. 2006. Anatomy and physiology of the rabbit and rodent gastrointestinal system. *Proc. Assoc. Avian Vet* 10: 9-17. Disponible: <http://www.chincare.com/HealthLifestyle/HLdocs2/gastrointestinal.pdf>

Jones J. 2014. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the ‘fiber gap’. *Nutrition Journal*. 13 (34). DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-34>

Kant S., Kant R., Choi Y., Kan E., Kim Y., Yang Y. 2018. Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*. 38 (8): 1209-1229. DOI: 10.1080/07388551.2018.1471445

Kebschull J., Zador A. 2015. Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. *Nucleic Acids Res*. 43 (21): 143. DOI: 10.1093/nar/gkv717

- Kim S., Rhee M. 2013. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (21): 6552-6560. DOI: 10.1128/AEM.02164-13
- Kimsé M., Bayourthe C., Monteils V., Fortun-Lamothe L., Cauquil L., Combes S., Gidenne T. 2012. Live yeast stability in rabbit digestive tract: Consequences on the caecal ecosystem, digestion, growth and digestive health. *Anim Feed Sci Technol*. 173, (3-4): 235-243. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.01.012>
- Knud E., Bach K. 2001. Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animal diets. *Proc Nutr Soc*. 60 (3): 291-299. DOI: <https://doi.org/10.1079/PNS2001109>
- Korlach J., Bjornson K., Chaudhuri B., Cicero R., Flusberg., Gray J., Holden D., Saxena R., Wegener J., Turner S. 2010. Real time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods in Enzymology*. 472: 431-455. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)72001-2
- Kostic A., Howitt M., Garrett W., 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Gene & Development*. 27: 701-718. DOI: 10.1101/gad.212522.112.
- Kovityadhi A., Gasco L, Ferrocino I, Rotolo L, Dabbou S, Malfatto V, Gai F., Peiretti P., Falzon M., Vignolini C., Coccolin L., Zoccarato I. 2015. Effect of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*) diet supplementation in rabbit nutrition on performance, digestibility, health and meat quality. *The Animal Consortium*. 10 (1): 10-18. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731115001822>
- Krause D., Denman S., Mackie R., Morrison M., Rae A., Attwood G., McSweeney C. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev*. 27 (5): 663-693 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X)
- Kraus T., Tahara T. 1993. Direct DNA sequencing of polymerase chain reaction-amplified genomic DNA by Maxam-Gilbert method. *Methods in Enzymology*. 218: 227-233. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)18018-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)18018-8)
- Krehbiel C., Rust S., Zhang G., Gilliland S. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J Anim Sci*. 81 (14) : 120-132. DOI: https://doi.org/10.2527/2003.8114_suppl_2E120x
- Kriss M., Hazleton K., Nusbacher N., Martin C., Lozupone C. 2018. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Current Opinion in Microbiology*. 44: 34-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.003>
- Lagier J., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G., Gimenez G., Maraninchi M., Trape J., Koonin E., La Scola B., Raoult D. 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*. 18 (12): 1185-1193. DOI: 10.1111/1469-0691.12023

Lahti L., Shetty S. 2019. Microbiome data science. *Journal of biosciences*. 44: 115. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9930-2>

Lau S., Woo P., Yip C., Fan R., Huang Y., Wang M., Guo R., Lam C., Tsang A., Lai K., Chan K., Che X., Zheng B., Yuen K. 2012. Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A Coronavirus, rabbit Coronavirus HKU14, from domestic rabbits. *Journal of Virology*. 86 (10) 5481-5496. DOI: 10.1128/JVI.06927-11

Le Bouquin S., Jobert J., Larour G., Balaine L., Eono F., Boucher S., Huneau A., Michel, V. 2009. Risk Factors for an Acute Expression of Epizootic Rabbit Enteropathy Syndrome in Rabbits after Weaning in French Kindling-to-Finish Farms. *Livest. Sci.* 125, (2-3): 283-290. DOI: 10.1016/j.livsci.2009.05.010

Lebas F., Coudert P., de Rochambeau H., Thebault R. 1996. El conejo cría y patología. *Coleccion FAO: Producción y sanidad animal* 19. ISSN 1014-6423. Disponible: <http://www.fao.org/3/t1690s/t1690s.pdf>

Le Gall G., Guttula K., Kellingray L., Tett A., Hoppen R., Kemsley K., Savva G., Ibrahim A., Narbad A. 2018. Metabolite quantification of fecal extracts from colorectal cancer patients and healthy controls. *Oncotarget*. 9 (70): 33278-33289. DOI: 10.18632/oncotarget.26022

Liangzhan S., Xiang J., Caixia Z., Zhaohui F., Fuchang L. 2016. Effect of substitution of oat hulls for traditional fiber source on digestion and performance of fattening rabbits. *The Animal Consortium*. 11 (6): 968-974. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731116002263>

Licois D., Coudert P., Cerén N., Vautherot J. 2000. Epizootic Enterocolitis of the rabbit: Review of current research. *World Rabbit Sci.* 8 (1): 187-194. ISSN: 1257-5011. Disponible: <http://www.world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2000-Valencia/Papers/Pathology/P00TR-Licois.pdf>

Licois D., Coudert P., Marlier D. 2006. Chapter 3.4 Epizootic rabbit enteropathy. *Recent advances in rabbit science*. ILVO. Animal Science Unit. 1er Edition. Maertens L., Coudert P. 163-170. ISBN: 92-898-0030.EPS. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Zsolt_Szendr/publication/313479648_Group_size_and_stocking_density/links/5c022e5aa6fdcc1b8d4d1cd5/Group-size-and-stocking-density.pdf#page=172

Licois D., Wyers M., Coudert P. 2005. Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet Res.* 36 (1): 601-613. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2005021>

Licois D.; Vautherot J.; Coudert P.; Dambrine G. 1998. Modele de Reproduction Experimentale de L'enterocolite Epizootique Chez Des Lapins Eops. *World Rabbit Sci.* 6 (3-4): 349-353. DOI: 10.4995/wrs.1998.367

Litterio N., Aguilar M. 2017. Consideraciones anatómo-fisiológicas para el uso prudente de fármacos en conejos. *Panorama actual del medicamento*, 41 (405): 679-684. ISSN:

0210-1394.

Disponible:

<https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2017/7/13/117049.pdf>

Liu Y., Rhoads J. 2013. Communication between B-cells and microbiota for the maintenance of intestinal homeostasis. *Antibodies* 2 (4): 535-553. DOI: 10.3390/antib2040535.

Lleonart F. 1990. Fisiopatología Comparada de las Diarreas del Gazapo. *Boletín de Cunicultura*. 13 (51-52): 49-55. ISSN: 0210-1978. Disponible: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_CUNI/Cuni_1990_051-052_completa.pdf

Looft T., Levine U., Stanton T. 2013. *Cloacibacillus porcorum* sp. nov., a mucin-degrading bacterium from the swine intestinal tract and emended description of the genus *Cloacibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 1960-1996. DOI: 10.1099/ijs.0.044719-0

López L., Hernández M., Colín C., Ortega S., Cerón G., Franco R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. 3 (1): 10-18. Disponible: <http://www.medigraphic.com/rid>

López-Siles M., Enrich-Capó N., Aldeguer X., Sabat-Mir M., Duncan S., García-Gil L., Martínez-Medina M. 2018. *Front Cell Infect Microbiol*. 8: 281. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00281

Lovegrove A., Edwards C., De Noni I., Patel H., El S., Grassby T., Zielke C., Ulmius M., Nilsson L., Butterworth P., Ellis P., Shewry P. 2015. Role of Polysaccharides in Food, Digestion and Health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 57 (2): 237-253. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939263>

Louis P., Flint H. 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294: 1-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x

Macchione I., Lopetuso L., Ianiro G., Napoli M., Gibiino G., Rizzatti G., Petito V., Gasbarrini A., Scaldaferrì F. 2019. *Akkermansia muciniphila*: key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 23: 8075-8083. DOI: 10.26355/eurrev_201909_19024

Macfarlane G., Gibson G., Beatty E., Cummings J. 1992. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiology Ecology*. 101: 81-88. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1992.tb00002.x>

Macfarlane S., Macfarlane G. 2003. Regulation of short chain fatty acid production. 2003. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62 (1): 67-72. DOI: 10.1079/PNS2002207

Marlier D., Dewrée R., Lassence C., Licois D., Mainil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R., Vindevogel H. 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit

enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *The Veterinary Journal*. 172: 493-500. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.07.011.

Marsh T., Saxman P., Cole J., Tiedje J. 2000. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and environmental microbiology*. 66 (8): 3616-3620. DOI: 10.1128/AEM.66.8.3616-3620.2000

Martin S., Nisbet D. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci*. 75 (6): 1736–1744. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77932-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77932-6)

Martínez M., Videgaray M., Elizondo G., Pescador D., Navarro G. 2004. *Cunicultura*. División Educación Continua. UNAM.

Marty J., Vernay M. 1984. Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hind-gut of the rabbit. *Br J Nutr*. 51 (2): 265-277. DOI: <https://doi.org/10.1079/BJN19840031>

Maslowski K., Vieira A., Ng A., Kranich J., Sierro F., Yu D., Schilter H., Rolph M., Mackay F., Artis D., Xavier R., Teixeira M., Mackay C. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature Letters*. 461: 1282-1286. DOI: 10.1038/nature08530

Mason N., Mouillot D., Lee W., Wilson J. 2005. Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. *Oikos Synthesising Ecology*. 111 (1): 112-118. DOI: 10.1111/j.0030-1299.2005.13886.x

Masters B. 2008. History of the Optical Microscope in Cell Biology and Medicine. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0003082

Mattioli S., Dal Bosco A., Combes S., Moscati L., Crotti S., Cartoni A., Cotozzolo E., Castellini C. 2019. Dehydrated alfalfa and fresh grass supply in young rabbits: Effect on performance and cecal microbiota biodiversity. *Animals*. 9: 341. DOI: 10.3390/ani9060341

Maxam A., Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry*. 74 (2): 560-564. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>

Maynard C., Elson C., Hatton R., Weaver C. 2012. Reciprocal interactions of intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 489: 231-241. DOI: 10.1038/nature11551

McMurdie P., Holmes S. 2013. Phyloseq: An R package for a reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *Plos ONE*. 8 (4): e61217. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

McNitt J., Lukefahr S., Cheeke P., Patton N. 2013. Chapter 8. Feeds and Feeding. *Rabbit production*. CAB International. 9th ed. 88-105. ISBN: 978-1-78064-011-2

Meshorer A. 1976. Histological findings in rabbits which died with symptoms of mucoid enteritis. *Laboratory animals*. 10 (3): 199-202. DOI: <https://doi.org/10.1258/002367776781035143>

Metz J., Nisbet M., Geritz S. 1992. How should we define 'fitness' for general ecological scenarios? *Trends in Ecology & Evolution*. 7 (6): 198-202. DOI: 10.1016/0169-5347(92)90073-K

Metzker M. 2010. Sequencing technologies- the next generation. *Nature Reviews. Genetics*. 11: 31-46. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2626>

Michelland R., Monteils V., Combes S., Cauquil L., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. 2010. Comparison of the archaeal community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit. *Anaerobe*. 16 (4): 396-401. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.04.004>

Milton A. 1978. Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobics bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 35 (5): 872-875. PMID:566082 PMCID:pmc242945

Miśta D., Króliczewska B., Marounek M., Pecka E., Zawadzki W., Nicpoń J. 2015. In Vitro Study and Comparison of Caecal Methanogenesis and Fermentation Pattern in the Brown Hare (*Lepus europaeus*) and Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *PLoS One* 10 (1): e0117117. DOI: 10.1371/journal.pone.0117117

Möller J. 2014. Comparación de los métodos para la determinación de fibra en pienso y en los alimentos. FOSS. AAFCO. Disponible: <https://www.fossanalytics.com> › ebook-fibre-analysis-of-animal-feed-es

Montalban-Arques A., De Schryver P., Bossier P., Gorkiewicz G., Mulero V., Gatlin III D., Galindo-Villegas J. 2015. Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Front. Immunol*. 6: 512. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00512

Monteils V., Cauquil L., Combes S., Godon J., Gidenne T. 2008. Potential Core Species and Satellite Species in the Bacterial Community within the Rabbit Caecum. *FEMS Microbiol. Ecol*. 66 (3): 620-629. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00611.x>

Morris J. 2018. What is the hologenome concept of evolution? *F1000Research*. 7: 1664. DOI: 10.12688/f1000research.14385.1

Morse S., Meitzner T. 2010. Sección 1. Bases de la microbiología. Capítulo 5. Cultivo de microorganismos. *Microbiología Médica*. Jawetz, Melnick y Adelberg. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. ISBN: 978-607-15-0503-3

Mueller N., Bakacs E., Combellick J., Grigoryan Z., Maria G. 2015. The Infant Microbiome Development: Mom Matters. *Trends Mol Med*. 21 (7): 109-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002>

Murali A., Bhargava A., Wright E. 2018. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*. 6 (140). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2018. *Environmental Chemicals, the Human Microbiome, and Health Risk: A Research Strategy*. Washington, DC: The National Academies Press. DOI: <https://doi.org/10.17226/24960>.

Newbold J., De la fuente G., Belanche A., Ramos-Morales E., McEwan N. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front. Microbiol.* 6: 1313. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01313

Next Gen Seek. 2012 Complete Genomics. New Technology to Produce Accurate Sequencing With Small Amount of DNA. Disponible: <http://nextgenseek.com/2012/07/complete-genomics-new-technology-to-produce-accurate-sequencing-with-small-amount-of-dna/>

Niethammer J., Krapp F. *Handbuch der Säugetiere Europas*, 2003. Band 3/II: Hasentiere Lagomorpha. Aula-Verlag, Wiebelsheim. ISBN: 13:978389105091

Nocker A., Burr M., Camper A. 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*. 54 (2): 276-289. DOI: 10.1007/s00248-006-9199-5

NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Sección 5.6. Apéndice G

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Sección 9.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental Salud ambiental Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Sección 6

Núñez E. 1990. Sobre la cuantificación de la diversidad ecológica. Cuantificación de la diversidad ecológica. UAM. Depto. de Hidrobiología. 1, 1: 85-93. Disponible: <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/523/117>

Oblinger J., Koburger J. 1975. Understanding and teaching the most probable number technique. *Journal of milk and food technology*. 38 (9): 540-545. DOI: <https://doi.org/10.4315/0022-2747-38.9.540>

Oksanen J., Blanchet F., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlenn D., Minchin P., O'Hara R., Simpson G., Solymos P., Stevens M., Szoecs E., Wagner H. 2019. *Community Ecology Package*. Disponible: <https://github.com/vegandevs/vegan>

Olivares R., Gómez M., Rindermann R., Chávez B. 2009. Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y Sociedad*. Colegio de Sonora. 21 (46): 191-206. ISSN. 1870-3925. Disponible:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-39252009000300008

Oso A., Idowu O., Haastrup S., Ajibade J., Olowonefa K., Aluko O., Ogunade I., Osho S., Bamgbose A. 2013. Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. *Livest Sci.* 157 (1): 184–190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.06.017>

Oulas A., Pavludi C., Polymenakou P., Pavlopoulos G., Papanikolaou N., Kotoulas G., Arvanitidis C., Iliopoulos I. 2015. Metagenomics: Tools and insights for analysing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and Biology Insights.* 9: 75–88. DOI: [10.4137/BBI.S12462](https://doi.org/10.4137/BBI.S12462)

Park S., Kim J., Lee J., Rhee S., Kim H. 2014. Characterization of the fecal microbiome in different swine groups by high-throughput sequencing. *Anaerobe.* 28: 157-162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.002>

Pattayil L., Harikumar-Thampi B. 2019. In vitro evaluation of apoptotic induction of butyric acid derivatives in colorectal carcinoma cells. *Anticancer Research.* 39 (7): 3795-3801. DOI: [10.21873/anticancer.13528](https://doi.org/10.21873/anticancer.13528).

Pérez C., Pérez A., Coscelli A., Prieto A., Díaz-Baños P. 2015. Identificación de infecciones digestivas en conejos: orientaciones para optimizar la prevención y el control. *Boletín de Cunicultura.* 176: 14–18. JSSN: 1696-6074. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/277978752_Identificacion_de_infecciones_digestivas_en_conejos_orientaciones_para_optimizar_la_prevenccion_y_control

Pérez de Rozas A., Carabaño R., García J., Rosell J., Díaz J., Barbe J., Pascual J., Badiola I. 2005. Etiopatogenia de la enteropatía epizootica del conejo. *Boletín de Cunicultura.* 139: 167-174. Disponible: https://www.academia.edu/21436620/Etiopatogenia_de_la_Enteropatía_Epizootica_del_Conejo

Pérez J. 2013. Revisión y conclusiones de la enteropatía epizootica del conejo. *Cunicultura.* 38 (223): 9-12. JSSN: 0210-1912. Disponible: <https://cunicultura.com/2013/06/revision-y-conclusiones-de-la-enteropatia-epizootica-del-conejo>

Pituch-Zdanowska A, Banaszkiwicz A, Albrecht P. 2015. The role of dietary fibre in inflammatory bowel disease. *Przegląd Gastroenterologiczny.* 10 (3): 135–141. DOI: [10.5114/pg.2015.52753](https://doi.org/10.5114/pg.2015.52753)

Plovier H., Everard A., Druart C., Depommier C., Van Hul M., Geurts L., Chilloux J., Ottman N., Duparc T., Lichtenstein L., Myridakis A., Delzenne N., Klievink J., Bhattacharjee A., Van der Ark K., Aalvink S., Martínez L., Dumas M., Maiter D., Loumaye A., Hermans M., Thissen J., Belzer C., M de vos W., Cani P. 2016. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves

metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine*. 23: 107-113. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4236>

Plummer E., Twin J., Bulach D., Garland S., Tabrizi S. 2015. A comparison of three bioinformatics pipelines for the analysis of preterm gut microbiota using 16S rRNA gene sequencing data. *Proteomics Bioinform.* 8, (12): 283-291. DOI:10.4172/jpb.1000381

Pommerville J. 2010. Basic laboratory techniques and skills. *Alcamos' laboratory fundamentals of microbiology*. Jones & Bartlett Publishers. 1-11. Praveen P., Jordan F., Priami C., Morine M. 2015. The role of breast-feeding in infant immune system: A systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome*. 3 (41). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0104-7>

Praveen P., Jordan F., Priami C., Morine M. 2015. The role of breast-feeding in infant immune system: A systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome*. 3 (41). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0104-7>

RAE. Real 2001. Academia Española. Diccionario de la lengua española. (22^a ed.). Disponible: <http://www.rae.es/rae.html>

Rees R., Rees J. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 6 (1): 139-153. Disponible: http://www.medirabbit.com/EN/GI_diseases/Rees-Davies.pdf

Ríos-Covián D., Ruas-Madiedo P., Marolles A., Gueimonde M., De los Reyes-Gavilán., Salazar N. 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* 7 (185). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00185

Roca T. 1993. Sistemas, métodos y técnicas de manejo en la explotación cunícola industrial para carne. *Cunicultura*. Universidad Autónoma de Barcelona. 18 (104): 223-244. Disponible: https://ddd.uab.cat/pub/cunicultura/cunicultura_a1993m8v18n104/cunicultura_a1993m8v18n104p223.pdf

Rodionov D., Arzamasov A., Khoroshkin M., Iablokov S., Leyn S., Peterson S., Novichkov P., Osterman A. 2019. Micronutrient requirements and sharing capabilities of the human gut microbiome. *Front. Microbiol.* 10 (1316). DOI: 10.3389/fmicb.2019.01316

Rodríguez-De Lara R., Cedillo C., Constantino F., Fallas M., Cobos M., Gutiérrez C., Juárez M., Miranda L. 2008. Studies on the evolution, pathology and immunity of commercial fattening rabbits affected with epizootic outbreaks of diarrhoeas in Mexico: a case report. *Research in Veterinary Science*. 84 (2): 257-268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.018>

Rodríguez-Romero N., Abecia L., Fondevila M. 2012. Bacterial profile from caecal contents and soft faeces in growing rabbits given diets differing in soluble and insoluble fibre levels. *Anaerobe*. 18 (6): 602–607. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.006

Rodríguez-Santiago B., Armengol L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre y postnatal. *DIAGN PRENAT.* 23 (2): 56-66. DOI: 10.1016/j.diapre.2012.02.001

Rolfe R. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition.* 130 (2S Suppl): 396–402. DOI: 10.1093/jn/130.2.396S

Romero C. 2008. La importancia de la cecotrofia en el conejo. *Boletín de Cunicultura Lagomorpha.* 156: 53-56. JSSN: 1696-6074. Disponible: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_CUNI/cuni_2008_156_completa.pdf

Romero C., Nicodemus N., Jarava M., Menoyo D. 2011. Characterization of *Clostridium perfringens* presence and concentration of its α -toxin in the caecal contents of fattening rabbits suffering from digestive diseases. *World Rabbit Science.* 19 (4): 177-189. DOI: <https://doi.org/10.4995/wrs.2011.941>

Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. 2019. The Hologenome Concept of Evolution: Medical Implications. *Rambam Maimonides Med J.* 10 (1): e0005. DOI:10.5041/RMMJ.10359

Roser L., Agüero F., Sánchez D. 2019. FastqCleaner: an interactive Bioconductor application for quality-control, filtering and trimming of FASTQ files. *BMC Bioinformatics* 20:361. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2961-8>

Rowland I, Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I, Tuohy K. 2017. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition.* 57 (1): 1–24. DOI: 10.1007/s00394-017-1445-8

Ruijter J., Lorenz P., Tuomi J., Hecker M., van den Hoff M. 2014. Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Microchim Acta.* 181: 1689-1696. DOI: 10.1007/s00604-013-1155-8

Russell J., Muck R., Weimer P. 2009. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiol Ecol.* 67 (2): 183–197. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00633.x

Sanger F., Coulson A. 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters.* 87 (1): 107-110. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80145-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80145-8)

Sarhan M., Hamza M., Youssef H., Patz S., Beclker M., ElSawey H., Nemr R., Daanaa H., Mourad E., Morsi A., Abdelfadeel M., Abbas M., Fayez M., Ruppel S., Hegazi N. 2019. Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based cultures media – A review. *Journal of Advanced Research* 19: 15-27. DOI: 10.1016/j.jare.2019.04.002

Schiffrin E., Blum S. 2002. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr.* 56 (Suppl 3): 60–64. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601489>

Schloss P. Mothur. 2017. Department of Microbiology & Immunology, The University of Michigan Medical School, The University of Michigan. Disponible: <https://www.mothur.org/>

Schloss P., Westcott S., Ryabin T., Hall J., Hartmann M., Hollister E., Lesniewski R., Oakley B., Parks D., Robinson C., Sahl J., Stres B., Thallinger G., Van Horn D., Weber C. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (23): 7537-7541. DOI: 10.1128/AEM.01541-09

Schnupf P., Sansonetti P. 2012. Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response: assessment of acute *Shigella flexneri* infection. *PLoS One*. 7 (6): 1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0036446

Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W., Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*. 12:R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60

Sekirov I., Russell S., Antunes C., Finlay B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *American physiological society. Reviews*. 90 (3): 859-904. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>

Siegwald L., Touzet H., Lemoine Y., Hot D., Audebert C., Caboche S. 2017. Assessment of common an emerging bioinformatics pipelines for targeted metagenomics. *PlosOne*. 12 (1): e0169563. DOI: 10.1371/journal.pone.0169563

Simpson H., Campbell J. 2015. Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*. 42 (2): 158–179. DOI: <https://doi.org/10.1111/apt.13248>

Skrivanova E., Molatova Z., Skrivanova V., Marounek M. 2009. Inhibitory activity of rabbit milk and médium-chain fatty acids aginst enteropathogenic *Escherichia coli* O128. *Veterinary Microbiology*. 135 (3-4): 358-362. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.083

Smith P., Howit M., Panikov N., Michsud M., Gallini C., Bohlooy-Y M., Glizman., Garrerrtt. 2013. The microbial metabolites short chain fatty acids, regulate colonic Treg homeostasis. *Science*. 341, (6145): 569-573. DOI: 10.1126/science.1241165

Soltan M, El-Katcha M. 2011. Effect of dietary probiotics supplementation on growth performance, immune response, some blood parameters and carcass quality of growing rabbits. *Alex J Vet Sci*. 34 (1): 153–169. ISSN: 110-2047. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Karima_El-Naggar/publication/268508245_EFFECT_OF_DIETARY_PROBIOTICS_SUPPLEMENTATION_ON_GROWTH_PERFORMANCE_IMMUNE_RESPONSE_SOME_BLOOD_PARAMETERS_AND_CARCASS_QUALITY_OF_GROWING_RABBITS/links/546d7f0a0cf26e95bc3cb5e3/EFFECT-OF-DIETARY-PROBIOTICS-SUPPLEMENTATION-ON-GROWTH-PERFORMANCE-IMMUNE-RESPONSE-SOME-BLOOD-PARAMETERS-AND-CARCASS-QUALITY-OF-GROWING-RABBITS.pdf

Naggar/publication/268508245_EFFECT_OF_DIETARY_PROBIOTICS_SUPPLEMENTATION_ON_GROWTH_PERFORMANCE_IMMUNE_RESPONSE_SOME_BLOOD_PARAMETERS_AND_CARCASS_QUALITY_OF_GROWING_RABBITS/links/546d7f0a0cf26e95bc3cb5e3/EFFECT-OF-DIETARY-PROBIOTICS-SUPPLEMENTATION-ON-GROWTH-PERFORMANCE-IMMUNE-RESPONSE-SOME-BLOOD-PARAMETERS-AND-CARCASS-QUALITY-OF-GROWING-RABBITS.pdf

Song E., Lee E., Nam Y. 2018. Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *Journal of Microbiology*. 56 (10): 693–705. DOI 10.1007/s12275-018-8238-5

Strong C., Dils R. 1972. Fatty acid biosynthesis in the rabbit mammary gland during pregnancy and early lactation. *Biochemical. Journal*. 128 (5): 13003-1309. DOI: 10.1042/bj1281303

Strychalski J, Juszkiewicz J, Gugolek A, Wyczling P, Daszkiewicz T, Zwolinski C. 2014. Usability of rapeseed cake and wheat-dried distillers' grains with solubles in the feeding of growing Californian rabbits. *Archives of animal nutrition*. 68 (3): 227–244. DOI: 10.1080/1745039X.2014.921482

Suárez A. 2017. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*. 30 (5): 305-311. ISSN: 0214-3429.

Sugiyama N., Valadez R., Rodríguez B. 2016. Faunal acquisition, maintenance and consumption: how the Teotihuacanos got their meat. *Archeological and Anthropological Sciences*. 9 (1): 61-81. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12520-016-0387-z>

Sun J., Le G., Shi Y., Su G. 2007. Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol*. 44 (1): 79–85. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02031.x>

Surridge A., Bell D., Ibrahim K., Hewitt G. 1999. Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia. *Heredity*. 82: 479–487. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885110>

Takahashi K., Nishida A., Fujimoto T., Fujii M., Shioya M., Imaeda H., Inatomi O., Bamba S., Andoh A., Sugimoto M. 2016. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in fecal microbial community in Crohn's disease. *Digestion*. 93: 59-65. DOI: 10.1159/000441768

Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. 2014. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2 (2):70-78. Disponible: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

The R Foundation. 2019. Introduction to R. Disponible: <https://www.r-project.org/about.html>

ThermoFisher Scientific. 2015. Real-Time PCR Basics. TaqMan vs SYBR Green Chemistry. Consultado: 1-10-2019. Disponible: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>

Tilak M., Botero-Castro F., Galtier N., Nabholz B. 2018. Illumina library preparation for sequencing the GC-rich fraction of heterogeneous genomic DNA. *Genome Biology and Evolution*. 10 (2): 616-622. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evy022>

Tormo R. 2006. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*. 65, (4): 30–41. Disponible: <https://www.analesdepediatria.org/es-probioticos-concepto-mecanismos-accion-articulo-13092364>

Tortora G., Funke B., Case C. 2007. *Introducción a la microbiología*. Editorial Médica Panamericana. 9a Ed. Buenos Aires. Argentina

Trifi H., Najjari A., Achouak W., Barakat M., Ghedira K., Mrad F., Saidi M., Sghaier H. 2019. Metataxonomics of Tunisian phosphogypsum based on five bioinformatics pipelines: Insights for bioremediation. *Genomics*. DOI: 10.1016/j.ygeno.2019.06.014

Trocino A., Xiccato G., Carraro L., Jimenez G. Effect of diet supplementation with Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on performance and health of growing rabbits. *World Rabbit Sci*. 13: 17 – 28. DOI: <https://doi.org/10.4995/wrs.2005.532>

Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. 2015. Effect of Probiotics / Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Env*. 30 (2): 126–132. DOI: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14176>

Valdespino P., Merino M., Valdespino V., Falcon L. 2014. ¿Es una planta, un animal o un holobionte? *Ciencia y Desarrollo*. 4-11. Disponible: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/archivo/272/articulos/planta-animal-u-holobionte.html>

Valdivia G., Cortés N., Alba F., Martínez H., Tórtora J., Montaraz J. 2007. Morphological and Immunologic Aspects of the Cecal Appendix of the Rabbit. *Veterinaria México*. 38 (3): 319–330. Disponible: <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2007/vm073f.pdf>

Valpuesta J. 2008. *La microscopía electrónica. La fundación y las técnicas. A la búsqueda del secreto de la vida. Una breve historia de la biología molecular*. Editorial Hélice. 60-67. ISBN: 978-84-936196-1-9.

Van Kruiningen H., Williams C. 1972. Mucoïd Enteritis of Rabbits: Comparison to Cholera and Cystic Fibrosis (with color plate II). *Veterinary pathology*. 9 (1): 53-77. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098587200900105>

Van Soest P., Robertson J., Lewis B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 74 (10): 3583–3597. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Vántus, V. B.; Kovács, M.; Zsolnai, A. 2014. The rabbit caecal microbiota: Development, composition and its role in the prevention of digestive diseases – a review on recent literature in the light of molecular genetic methods. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 18 (1): 55–65. ISSN: 1418-1789. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Viola_Bagone_Vantus/publication/270829742_The_rabbit_caecal_microbiota_development_composition_and_its_role_in_the_prevention_of_digestive_diseases_-_a_review_on_recent_literature_in_the_light_of_molecular_genetic_methods/links/54b8ee460cf2c27adc490600.pdf

Vázquez C., Martín A., Silóniz M., Serrano S. 2010. Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias. Serie Microbiología. 3 (5): 15-38. ISSN: 1989-3620.

Vernay M. 1987. Origin and utilization of volatile fatty acids and lactate in the rabbit: influence of the faecal excretion pattern. *British Journal of Nutrition* 57 (3): 371-381. DOI: 10.1079/BJN19870045

Villarreal H., Álvarez M., Córdoba s., Escobar F., Fagua G., Gast F., Mendoza H., Ospina M., Umana A. 2004. Capítulo 7. Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 187-225

Vo N., Tsai T., Maxwell C., Carbonero F. 2017. Early exposure to agricultural soil accelerates the maturation of the early-life pig gut microbiota. *Anaerobe*. 45: 31-39. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.022>

Wayne D. 2002. Capítulo 7. Análisis de varianza. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª Edición. México: Limusa Wiley, 347-370.

WHO. World Health Organization. 2001. Anti-Infective Drug Resistance Surveillance and Containment Team. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. 10 (4): 284–293. DOI: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67197>

WHO, World Health Organization. 2018. Antimicrobial resistance and primary health care: brief (No. WHO/HIS/SDS/2018.57). World Health Organization.

Wickham H. 2011. Ggplot2. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. 3 (2). DOI: <https://doi.org/10.1002/wics.147>

Willyard C. 2017. The drug-resistant that pose the greatest health treats. *Nature*. 543: 15. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>

Wong C., Harris P., Ferguson L. 2016. Potential benefits of dietary fibre intervention in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci*. 17 (6): 8348-8365. DOI: 10.3390/ijms17060919

Xiao J., Metzler-Zebeli B., Zebeli Q. 2015. Gut function-enhancing proprieties and metabolic effects of dietary indigestible sugars in rodents and rabbits. *Nutrients*. 7 (10). DOI: 10.3390/nu7105397

Xiccato G., Trocino A., Carraro L., Fragkiadakis M., Majolini D. 2008. Digestible fiber to starch ratio and antibiotic treatment time in growing rabbits affected. Proceedings of the 9th World Rabbit Congress. 847-852 ref.10. Disponible: <https://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2008-Verona/Papers/N-Xiccato.pdf>

Yáñez D., Abecia L., Newbold C. 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: A review. *Frontiers in Microbiology*. 6 (1133): 1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01133

Yanni A. 2004. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory animals Limited*. 38 (3): 246-256. DOI: 10.1258/002367704323133628

Yilmaz P., Kottmann R., Pruesse E., Quast C., Glöckner F. 2011. Analysis of 23S rRNA genes in metagenomes- A case study from the Global Ocean Sampling Expedition. *Systematic and Applied Microbiology*. 34 (6): 462-469. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.04.005>

Yao Y., Suo T., Andresson R., Cao Y., Wang C., Lu J., Chui E. 2017. Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Systematic Review*. 1. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003430.pub2>

Yoon S., Kim E., Lee W. 2015. Functional genomic and metagenomics approaches to understanding gut microbiota-animal mutualism. *Current Opinion in Microbiology* 24: 28-36 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.007>.

Yuan M., Liu S., Wang Z., Wang L., Xue B., Zou H., Tian G., Cai J., Peng Q. 2019. Effects of particle size of ground alfalfa on cecal bacteria and archaea populations of rabbits. *PeerJ* 7: e7910. DOI: <http://doi.org/10.7717/peerj.7910>

Zebeli Q., Aschenbach J., Tafaj M., Boguhn J., Ametaj B., Drochner W. *Invited review*: 2012. Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *J Dairy Sci*. 95 (3): 1041–1056. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4421>

Zeng Y., Zeng D., Zhang Y., Ni X., Tang Y., Zhu H., Wang H., Yin Z., Pan K., Jing B. 2015. Characterization of the cellulolytic bacteria communities along the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep by using PCR-DGGE and real-time PCR analysis. *World J Microbiol Biotechnol*. 31 (7): 1103-1113. DOI: 10.1007/s11274-015-1860-z

Zeng X., Gao X., Peng Y., Wu Q., Zhu J., Tan C., Xia G., You C., Xu R., Pan S., Zhou H., He Y., Yin J. 2019. Higher risk of stroke is correlated with increased opportunistic pathogen load and reduced levels of butyrate-producing bacteria in the gut. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 9 (4). DOI: 10.3389/fcimb.2019.00004

Zhu Y., Sun Y., Wang., Li F. 2016. Impact of dietary fibre:starch ratio in shaping caecal archaea revealed in rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 101 (4). DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12585>

Zhu Y, Wang C, Li F. 2015. Impact of dietary fiber: starch ratio in shaping caecal microbiota in rabbits. *Canadian Journal of Microbiology*. 61 (10): 771-784. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0201>

Zhu Y., Wang C., Wang X., Li B., Sun L., Li F. 2013. Effects of dietary fiber and starch levels on the non-specific immune response of growing rabbits. *Livestock Science*. 155, (2-3): 285-293. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2013.04.018>

9. Anexos

A1. Carta del Comité de Bioética

	Universidad Autónoma de Querétaro	Facultad de Ciencias Naturales					
Comité de Bioética							
Querétaro, Qro, 26 octubre 2016.							
 XIAO HAITZI DANIEL PUÓN PELAEZ DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES							
 Estimado: XIAO HAITZI DANIEL PUÓN PELAEZ							
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:							
<table border="1"><thead><tr><th>Título</th><th>Resolución</th></tr></thead><tbody><tr><td>"Estudio de la diversidad de la microbiota asociada con Enteropatía Epizootica en conejos Nueva Zelanda suplementados con probiótico y/o fibra."(93FCN2016).</td><td>Aprobado</td></tr></tbody></table>				Título	Resolución	"Estudio de la diversidad de la microbiota asociada con Enteropatía Epizootica en conejos Nueva Zelanda suplementados con probiótico y/o fibra."(93FCN2016).	Aprobado
Título	Resolución						
"Estudio de la diversidad de la microbiota asociada con Enteropatía Epizootica en conejos Nueva Zelanda suplementados con probiótico y/o fibra."(93FCN2016).	Aprobado						
Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.							
Atentamente,							
							
M.V.Z. Verónica Andrade Portillo Comité de Bioética Facultad de Ciencias Naturales							
2							

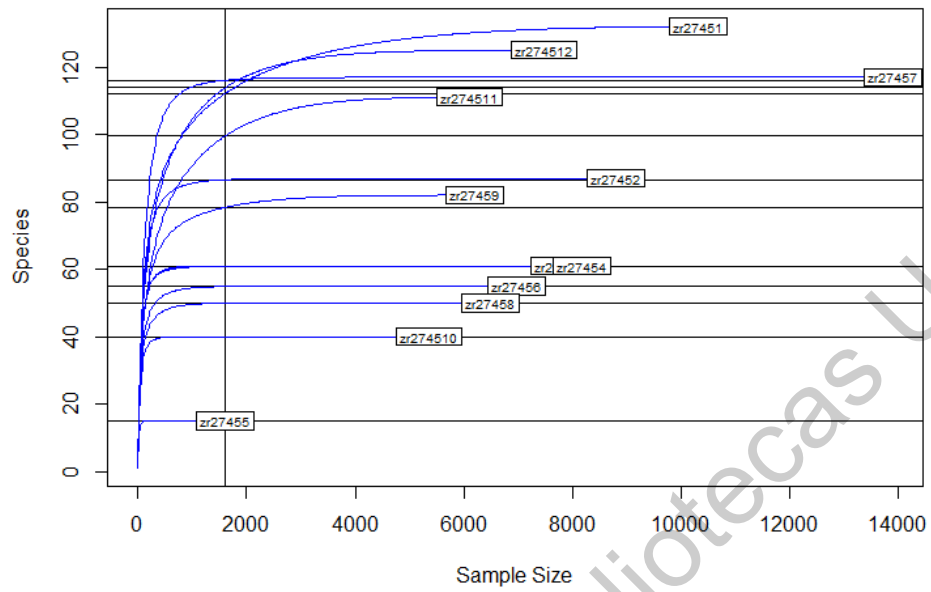


Figura A2. Curva de rarefacción de las muestras de contenido cecal de conejos del experimento 1.

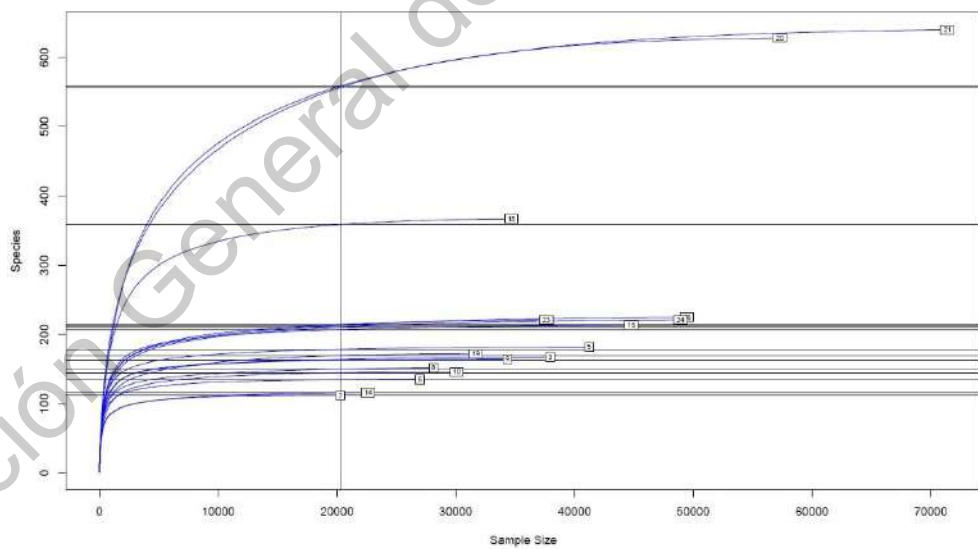


Figura A3. Curva de rarefacción de las muestras de contenido cecal de conejos del experimento 2.