

2022

Caracterización de la diversidad y función de la microbiota asociada a la mucosa intestinal utilizando un modelo aviar (*Gallus gallus*)

LN Sarah Rebeca
Delgado Luna



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Caracterización de la diversidad y función de la microbiota asociada a la mucosa intestinal utilizando un modelo aviar (*Gallus gallus*)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener del grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

LN Sarah Rebeca Delgado Luna

Dirigido por:

Dr. Gerardo M. Nava Morales

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Junio 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos

“Caracterización de la diversidad y función de la microbiota asociada a la mucosa intestinal utilizando un modelo aviar (*Gallus gallus*)”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.N. Sarah Rebeca Delgado Luna

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Comité de tesis:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Presidente

Dra. Andrea M. Olvera Ramírez
Secretario

Dr. Edmundo Mercado Silva
Vocal

Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez
Suplente

MC. Carolina N. Reséndiz Nava
Suplente

Centro Universitario. Querétaro, Qro.
Junio 2022
México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Sarah Rebeca Delgado Luna

DEDICATORIA

Para mi madre Irma y mis hermanas Paola y Fernanda, por guiarme, motivarme a ser mejor persona día con día y por enseñarme a soñar en grande y nunca rendirme.

AGRADECIMIENTOS

A Paco, por acompañarme en esta aventura, creer en mí y apoyarme incondicionalmente hasta el final.

A Caro, por compartir su conocimiento y guiarme paso a paso en el camino de la Biología Molecular.

Al Dr. Nava, por ser mi mentor, por el tiempo dedicado y la confianza depositada para llevar a cabo este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Liz, Iván, Isa, Wong, Migue y Francisco, por todos los momentos de enseñanza y risa durante los muestreos, por su ayuda y motivación para terminar este proyecto.

A Carmelita, por orientarme en todos los procesos administrativos, siempre con una sonrisa.

A mis amigas Gaby, Naye, Esther, Mayra y Tsiseje, por todas aquellas tardes de estudio y diversión. Y a Ramón, por sus consejos acertados.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y al Dr. Sergio Gómez por permitirnos usar sus instalaciones; a Don José, Mario, Myriam y Eugenio, por su apoyo en la crianza y toma de muestras.

A mis docentes y comité tutorial por su apoyo, paciencia, dedicación y ejemplo. Agradezco su motivación y palabras de aliento en tiempos de pandemia.

A CONACYT, por el apoyo económico brindado para poder cumplir una meta más.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 SISTEMA DIGESTIVO EN VERTEBRADOS.....	6
2.1.1 Anatomía y fisiología.....	6
2.1.2 Histología general.....	7
2.1.3 Anatomía del intestino delgado.....	10
2.2 MUCOSA INTESTINAL.....	12
2.2.1 Estructura y función.....	12
2.2.1.1 Epitelio intestinal.....	12
2.2.1.2 Lámina propia y muscular de la mucosa.....	15
2.2.2 Mecanismos de transporte a través del epitelio intestinal.....	15
2.2.2.1 Absorción transcelular mediante proteínas acarreadoras de solutos.....	16
2.2.3 Secreción de mucinas en la mucosa intestinal.....	23
2.2.3.1 Interacciones de mucinas con la microbiota intestinal.....	25
2.3 MICROBIOMA INTESTINAL.....	27
2.3.1 Función, diversidad y abundancia relativa.....	27
2.3.1.1 Factores que modulan la diversidad de la microbiota intestinal.....	32
2.3.2 Disbiosis intestinal.....	32
2.3.3 Uso del gen <i>16S rRNA</i> para el estudio de la microbiota.....	34
2.4 Análisis de la microbiota intestinal en el modelo <i>Gallus gallus</i>	35
2.4.1 Anatomía y fisiología aviar.....	37
2.4.2 Comparativa del sistema digestivo humano y aviar.....	40
2.4.3 Similitud genética entre el modelo <i>G. gallus</i> y el humano.....	41

2.4.4 Microbiota intestinal del modelo aviar	43
2.4.4.2 Características de los principales filos asociados a la microbiota intestinal del modelo aviar	46
2.4.4.3 Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota del modelo aviar	47
2.4.6 Importancia del modelo aviar en Ciencia y Tecnología de Alimentos	50
4. OBJETIVOS.....	52
4.1 Objetivo general.....	52
4.2 Objetivos específicos	52
5. METODOLOGÍA	53
5.1 Diseño experimental	53
5.2 Bienestar animal, Normas Oficiales Mexicanas y aprobación ética	54
5.3 Recepción de aves, lugar y condiciones de mantenimiento	54
5.4 Alimentación e hidratación	55
5.5 Calculo de parámetros de productividad	56
5.6 Sacrificio y desecho de restos.....	56
5.7 Muestreo de la mucosa intestinal.....	57
5.8 Determinación de la diversidad microbiana	59
5.8.1 Extracción y evaluación de la calidad del DNA genómico.....	59
5.8.2 Cuantificación de DNA genómico	60
5.8.3 Secuenciación masiva en paralelo del gen <i>16S rRNA</i>	60
5.8.4 Análisis bioinformático: asignación taxonómica, selección de genes homólogos implicados en la absorción de nutrientes y evaluación de iniciadores	60
5.9 Cuantificación de expresión de genes en la mucosa intestinal.....	62
5.9.1 Extracción y purificación de RNA total.....	62
5.9.2 Cuantificación de RNA total.....	63
5.9.3 Limpieza de RNA total y evaluación de integridad	63
5.9.4 Evaluación de integridad del RNA total con tratamiento TURBO DNA free	64
5.9.5 Cuantificación de la transcripción de genes por RT-qPCR	64
5.10 Análisis estadístico.....	68
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69

6.1 Genes homólogos implicados en la absorción de nutrientes, anotación genética, evidencia de expresión en el modelo <i>G. gallus</i>	69
6.1.1 Selección y evaluación bioinformática de iniciadores	74
6.2 Productividad y mortalidad.....	75
6.2.1 Mortalidad.....	76
6.3 Identificación de las poblaciones bacterianas asociadas a la mucosa intestinal en un modelo monogástrico <i>Gallus gallus</i>	77
6.4 Cuantificación de la transcripción de genes asociados a la absorción de nutrientes en el enterocito	91
6.4.1 Transportadores de glucosa: <i>GLUT2</i> y <i>SGLT1</i>	91
6.4.2 Transportador de di- y tri- péptidos (<i>PepT1</i>) y aminoácidos excitatorios (<i>EAAT3</i>)	96
6.4.3 Proteína de unión a ácidos grasos 2 (<i>FABP2</i>)	101
6.4.4 Mucina 2 (<i>MUC2</i>)	104
6.5 Asociación del efecto de los cambios en las poblaciones bacterianas autóctonas asociadas a la mucosa intestinal sobre la transcripción de genes responsables de la interacción microbioma-hospedador	108
7. CONCLUSIÓN.....	114
8. REFERENCIAS	116
9. ANEXOS.....	143
Anexo 1. Lugar y condiciones de mantenimiento	143
a. Crianza y Densidad.....	143
b. Medidas de instalación (French, 1981; Vantress, 2013).....	144
c. Medidas de limpieza (Agencia de Cooperación Internacional de Japón, 2017)	144
d. Medidas para el recibimiento (Vantress, 2013, Agencia de Cooperación Internacional de Japón, 2017):.....	145
e. Condiciones ambientales (Vaca, 1991; Sonaiya y Swan, 2007; Vantress, 2013):	146
Iluminación	146
Temperatura y humedad.....	146
Ventilación	147
f. Medidas de bioseguridad.....	147
Anexo 2. Alimentación e hidratación (Vantress, 2013)	148

Anexo 3. Técnicas de correcto agarre y sacrificio por dislocación cervical	150
Anexo 4. Características de una buena calidad de los polluelos a la hora de recepción	152
Anexo 5. Esquema de manejo de crianza.....	153
Anexo 6. Heatmap de (A) duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) ciegos en los días 1, 7, 15 y 35.	154

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tipo de células epiteliales del intestino, su función y localización	14
Tabla 2	Sistemas de transportadores de aminoácidos en el borde de cepillo del intestino delgado	19
Tabla 3	Expresión de mucinas asociadas a la mucosa en el intestino	24
Tabla 4	Estudios que indican el potencial del microbioma intestinal humano en la fisiología del hospedador	27
Tabla 5	Principales filos en la microbiota intestinal y algunas características importantes	30
Tabla 6	Asociación de la microbiota intestinal humana en la aparición de diversas enfermedades	33
Tabla 7	Miembros de la microbiota intestinal del pollo que pueden impactar en la salud humana	36
Tabla 8	Dimensiones del sistema digestivo del pollo	39
Tabla 9	Comparación entre el sistema digestivo humano y del modelo <i>Gallus gallus</i>	41
Tabla 10	Distribución espacial de la taxonomía bacteriana más común y abundante (filo, orden (o), familia (f), género) en el sistema gastrointestinal del pollo, sin tomar en cuenta edad, dieta o diferencias en técnicas de identificación	44
Tabla 11	División de muestreo	53
Tabla 12	Función molecular de genes intestinales y secuencias de iniciadores usados para RT-qPCR	67
Tabla 13	Niveles de homología entre especies	71
Tabla 14	Anotación genética y dominios conservados en las secuencias de aminoácidos de <i>Gallus gallus</i>	72
Tabla 15	Evidencia de expresión de RNA	73
Tabla 16	Secuencias de iniciadores seleccionados	74

Tabla 17	Rendimiento de crecimiento en los diferentes días de muestreo	75
Tabla 18	Mortalidad en cada día de muestreo	76
Tabla 19	Número total de secuencias, filos y familias en el intestino delgado y ciegos	77
Tabla 20	Requerimientos mínimos de la cama	144
Tabla 21	Programa de iluminación estándar	146
Tabla 22	Humedad y temperatura ambiental específicas para Cobb 500	147
Tabla 23	Velocidad máxima de aire al nivel de las aves según edad	147
Tabla 24	Requerimientos nutrimentales para pollo Cobb	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Capas del sistema gastrointestinal.	9
Figura 2	Estructura macroscópica del intestino delgado	11
Figura 3	Modelo de absorción de glucosa a través del enterocito	18
Figura 4	Modelo de la interacción entre PepT1 con diferentes péptidos en las células epiteliales del intestino	20
Figura 5	Función de LFABP e IFABP en los enterocitos	22
Figura 6	Mecanismo de afección de la capa de mucosa a través de la microbiota intestinal	26
Figura 7	Biogeografía y factores que conforman la organización espacial del microbioma intestinal	28
Figura 8	Esquema del sistema gastrointestinal del pollo	37
Figura 9	Genes del pollo clasificados de acuerdo a su relación de evolución predecida con genes de dos modelos vertebrados	42
Figura 10	Identificación de regiones intestinales para toma de muestras	57
Figura 11	Toma de mucosa intestinal para extracción de DNA	58
Figura 12	Representación de proteínas transportadoras expresadas en el enterocito	70

Figura 13	Curvas de rarefacción de la diversidad alfa (<i>chao1</i>) con respecto a la acumulación de secuencias en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos a los diferentes días de muestreo	78
Figura 14	Comparación de medias de ASVs en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos a los días (d) 1, 7, 15 y 35	79
Figura 15	Abundancia relativa a nivel taxonómico de filos en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos a diferentes días de muestreo	81
Figura 16	Principales familias encontradas en la microbiota de la mucosa intestinal en el modelo aviar monogástrico <i>Gallus gallus</i>	82
Figura 17	Abundancia relativa a nivel taxonómico de familia en la mucosa intestinal de (A) duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) ciegos en los días 1, 7, 15 y 35	83
Figura 18	Expresión temporal y regional de <i>SGLT1</i> en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos y a los días E) Día 1, F) Día 7, G) Día 15 y H) Día 35.	93
Figura 19	Expresión temporal y regional de <i>GLUT2</i> en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos y a los días E) Día 1, F) Día 7, G) Día 15 y H) Día 35.	94
Figura 20	Expresión temporal y regional de <i>PepT1</i> en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos y a los días E) Día 1, F) Día 7, G) Día 15 y H) Día 35.	97
Figura 21	Expresión temporal y regional de <i>EAAT3</i> en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos y a los días E) Día 1, F) Día 7, G) Día 15 y H) Día 35.	98
Figura 22	Expresión temporal y regional de <i>FABP2</i> en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos y a los días E) Día 1, F) Día 7, G) Día 15 y H) Día 35.	103

Figura 23	Expresión temporal y regional de <i>MUC2</i> en A) Duodeno, B) Yeyuno, C) Íleon y D) Ciegos y a los días E) Día 1, F) Día 7, G) Día 15 y H) Día 35.	106
Figura 24	Correlaciones positivas entre A) <i>Brevibacteriaceae</i> – <i>GLUT2</i> , B) <i>Carnobacteriaceae</i> – <i>GLUT2</i> , C) Orden Clostridiales – <i>MUC2</i> y D) Orden Clostridiales – <i>EAAT3</i> .	109
Figura 25	Corrales en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria del INIFAP	143
Figura 26	Bebedero de campana automático y comedero de tolva colgante	148
Figura 27	Agarre correcto de pollos	150
Figura 28	Agarre correcto para dislocación cervical	151

RESUMEN

La mucosa intestinal es uno de los órganos más activos en aves y mamíferos. A través de una compleja interacción microbiota-hospedador, se regulan los mecanismos moleculares que mantienen la función del enterocito. Se ha evidenciado que el consumo de nutracéuticos, probióticos y otros suplementos alimenticios puede afectar la interacción microbiota-hospedador, estimulando el desarrollo del epitelio intestinal, el sistema inmune y la transcripción de genes relacionados a la absorción de nutrientes. Basado en esta premisa, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer un modelo animal enfocado al estudio de la interacción microbiota-mucosa intestinal. Para cumplir esta meta, se caracterizó la biología de la mucosa intestinal en el modelo animal *Gallus gallus*. A diferentes etapas (1, 7, 15 y 35 días) del desarrollo fisiológico de las aves, se colectaron muestras de mucosa intestinal y se sometieron a análisis de secuenciación masiva (Illumina MiSeq) del gen *16S rRNA*. Además, se llevaron a cabo análisis transcriptómicos (RT-qPCR) de genes asociados al funcionamiento del enterocito. Este análisis reveló que *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptospreptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Clostridiaceae* y *Erysipelotrichaceae* son las principales ($P \leq 0.05$) familias que habitan la mucosa intestinal en el modelo aviar. El análisis transcriptómico reveló un aumento gradual ($P \leq 0.05$), conforme avanza la edad del ave, en la transcripción de los genes *GLUT2*, *SGLT1*, *EAAT3* y *MUC2*; mientras que *PepT1* y *FABP2* se mantuvo estable durante todos los días de muestreo. La mayor transcripción ($P \leq 0.05$) de *SGLT1*, *GLUT2* y *PepT1* se observó en duodeno y yeyuno; mientras que *EAAT3* y *MUC2* se transcribieron principalmente en íleon. Interesantemente, se observaron correlaciones positivas entre la abundancia relativa de *Brevibacteriaceae* ($R^2 = 0.6665$) y *Carnobacteriaceae* ($R^2 = 0.6617$) con los niveles de transcripción de *GLUT2*. También se observó una correlación positiva entre la abundancia relativa del orden Clostridiales y los niveles de transcripción de *MUC2* y *EAAT3* ($R^2 = 0.6659$ y 0.6565 , respectivamente). En conjunto, estos resultados resaltan la importancia del modelo *Gallus gallus* para identificar poblaciones bacterianas que podrían regular la fisiología del enterocito.

Palabras clave: microbiota, mucosa intestinal, gen *16S rRNA*, análisis transcriptómicos, modelo *Gallus gallus*

ABSTRACT

The intestinal mucosa is one of the most active tissues in avian and mammalian species. Through host-microbiota interactions, the enterocyte function is regulated. Supplementation of functional foods, probiotics and another feed additives could affect the balance between host and microbiota, affecting the intestinal epithelium development, immune system, and transcription of genes associated to nutrient absorption. Based on this premise, the objective of the present study was to establish an animal model to study microbiota-intestinal mucosa interactions. To accomplish this, studies were conducted to evaluate the biology of the intestinal mucosa in a *Gallus gallus* animal model. At different animal development stages (days 1, 7, 15 and 35 of age), intestinal mucosa samples were collected and subjected to 16S rRNA highthroughput sequencing (Illumina MiSeq). Also, transcription analysis of genes associated to nutrient absorption were measured by RT-qPCR. Herein, it was observed that *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptospreptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Clostridiaceae* and *Erysipelotrichaceae* were the most predominant ($P \geq 0.05$) families associated to the intestinal mucosa. Transcription of *GLUT2*, *SGLT1*, *EAAT3* and *MUC2* increased ($P \geq 0.05$) gradually as the bird aged. In contrast, transcription of *PepT1* and *FABP2* remained stable during all avian ages. Higher levels ($P \geq 0.05$) of *SGLT1*, *GLUT2* and *PepT1* transcription were observed in the duodenum and jejunum; whereas higher transcription levels of *EAAT3* and *MUC2* were observed in the ileum. Interestingly, positive correlations were observed between the relative abundance of *Brevibacteriaceae* ($R^2 = 0.6665$) and *Carnobacteriaceae* ($R^2 = 0.6617$) with *GLUT2* transcript levels. Also, a positive correlation was observed between relative abundance of the order Clostridiales and *MUC2* and *EAAT3* ($R^2 = 0.6659$ and 0.6565 , respectively) transcription levels. Together, these results highlight the importance of the *Gallus gallus* animal model, as a system to identify bacterial populations with potential to regulate enterocyte physiology.

Keywords: mucosa associated microbiota, host-microbiota interaction, *Gallus gallus*.

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal genera múltiples beneficios al hospedador, como la producción de vitaminas, protección contra la infección por patógenos y la renovación del epitelio intestinal (Yadav *et al.*, 2018). Diversos factores como los nutrientes de la dieta, condiciones ambientales y estrés, pueden afectar la diversidad y función de la microbiota intestinal (Kovatcheva-Datchary y Arora, 2013). El aumento en la diversidad de bacterias mucolíticas se ha asociado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (Bergstrom *et al.*, 2017; Tropini *et al.*, 2017), así como con la alteración de las funciones de barrera, absorción, metabolismo y activación de la respuesta inmune (Okumura y Takeda, 2017).

En la última década, ha incrementado nuestro conocimiento acerca de la diversidad y función de la microbiota intestinal de aves y mamíferos (Oakley *et al.*, 2014). Sin embargo, aún prevalecen muchos mecanismos fisiológicos que necesitan ser estudiados; por ejemplo, es fundamental conocer las bases que rigen la interacción microbiota - hospedador en la mucosa intestinal, un nicho ecológico donde convergen poblaciones bacterianas específicas que han establecido una simbiosis con el hospedador (Martens *et al.*, 2018). La microbiota asociada a la mucosa intestinal ofrece protección y algunos nutrientes al enterocito; mientras que el epitelio intestinal secreta nutrientes esenciales para mantener estas poblaciones bacterianas (Schroeder, 2019).

Conocer los mecanismos moleculares que rigen la interacción microbiota - hospedador es esencial en la ciencia de los alimentos. Primero, este conocimiento nos permitirá identificar las comunidades bacterianas autóctonas asociadas a la mucosa intestinal y dilucidar los patrones de colonización durante el desarrollo de los animales así como las diferentes regiones del intestino; segundo, un mejor entendimiento de la transcripción genética en la mucosa permitirá determinar nuevos marcadores moleculares para la evaluación de la salud intestinal; tercero, permitirá identificar el efecto de los nutrientes sobre la colonización bacteriana de la

mucosa intestinal; y cuarto, conocer los efectos generados por la dieta y aditivos nutricionales sobre la salud intestinal de los individuos.

Para lograr estos avances, es esencial contar con un modelo animal que permita evaluar de forma sistemática la interacción bacteria - hospedador a nivel de la mucosa intestinal. En este sentido, en el presente trabajo propone el modelo aviar *Gallus gallus* como sistema biológico. Las aves son consideradas un organismo ideal para el estudio de fundamentos fisiológicos e inmunológicos en mamíferos (Stern, 2005); por ejemplo, el modelo aviar ha sido trascendente para la investigación de la etiología y progresión del cáncer de ovarios en humanos, estudios de toxicología debido a su sensibilidad y rápida respuesta ante agentes ambientales (Bahr, 2008), estudios de la fisiología digestiva debido a que su sistema gastrointestinal se encuentra totalmente maduro para el fin de la embriogénesis, lo que lo hace capaz de alimentarse de manera independiente inmediatamente después de su eclosión (Zhang *et al.*, 2019); asimismo, comparte mecanismos inmunológicos con los mamíferos, involucrados en la liberación de citosinas (Kaiser, 2012). Además, fue la primera especie de producción animal que contó con la secuenciación completa de su genoma; este trabajo reveló un alto grado de similitud con el genoma humano principalmente en los genes involucrados en la función y estructura básica celular (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

Por lo anterior, el modelo aviar podría representar un sistema biológico adecuado para elucidar el efecto de la dieta, aditivos nutricionales, pesticidas y antibióticos sobre la biología de la mucosa intestinal. La información generada con la presente propuesta es fundamental en trabajos de biomedicina enfocados a la salud humana y animal.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, ha aumentado nuestro interés por considerar la biología de la microbiota intestinal durante el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos alimenticios. Se sabe que el correcto funcionamiento del intestino es primordial para mantener un buen estado de salud en los mamíferos y aves. Sin embargo, la mayoría de los estudios del microbioma están basados en el análisis de muestras fecales, aun cuando se han reportado diferencias significativas en los patrones de colonización de la mucosa intestinal. Además, el consumo de nutrientes, suplementos y aditivos puede alterar el balance microbiota - hospedador y afectar la regulación del metabolismo, la mejora de la digestión o el desencadenamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.

Por esta razón, la meta del presente proyecto fue establecer un modelo animal que nos permita identificar el impacto de los alimentos y aditivos nutricionales sobre la salud intestinal de los consumidores. Para este fin, se establecieron las bases para el análisis de las poblaciones bacterianas autóctonas asociadas a la mucosa intestinal, así como la expresión de genes involucrados en la función y salud del enterocito. El conocimiento de la biología de la mucosa intestinal podría ayudar al desarrollo de nuevos alimentos funcionales y aditivos nutricionales para mejorar la salud humana y animal.

2. ANTECEDENTES

2.1 SISTEMA DIGESTIVO EN VERTEBRADOS

2.1.1 Anatomía y fisiología

El sistema gastrointestinal de cualquier organismo vertebrado tiene el objetivo de digerir los alimentos con la finalidad de absorber nutrientes y eliminar los componentes no digeridos (Walthall *et al.*, 2005). A pesar de las diferencias estructurales, este sistema en vertebrados se describe acorde al fraccionamiento de porción craneal, que incluye la cavidad oral, garganta y faringe para capturar, lubricar y/o triturar el alimento; la región anterior intestinal la cual consiste en el esófago y estómago para transportar y digerir el alimento; el intestino medio (delgado) para la absorción de nutrientes y región intestinal posterior (intestino grueso y recto) para la formación y almacenamiento de heces, la absorción de electrólitos y agua, y la fermentación microbiana; el recto o cloaca es el esfínter de salida de heces (Stevens y Hume, 2004).

A pesar de las diferencias, se reconoce que el sistema digestivo lleva a cabo seis funciones básicas (Moini, 2020):

1. Ingestión: es el acto de llevar los alimentos y líquidos a la boca para la masticación.
2. Secreción: de agua, ácidos, amortiguadores y enzimas.
3. Mezclado y propulsión: la peristalsis constante del tubo digestivo consiste en intervalos continuos de contracción y relajación que dirigen los alimentos y secreciones hacia en ano.
4. Digestión: combina procesos mecánicos y químicos para transformar los alimentos en moléculas pequeñas y residuos.
5. Absorción: las moléculas pequeñas provenientes de la digestión son capaces de entrar a las células epiteliales del tubo digestivo con el propósito de pasar al torrente sanguíneo y llegar a las diferentes células del cuerpo.

6. Defecación: las sustancias no digeribles, bacterias, agua no absorbida y algunas células del tubo digestivo son desechadas a través del ano.

2.1.2 Histología general

Una característica en común entre la mayoría de los organismos vertebrados es que el tubo digestivo (porción del esófago al ano) está recubierto por cuatro revestimientos epiteliales (Figura 1); comenzando desde el interior hacia el exterior, primero se encuentra la mucosa, la cual se divide en tres capas (Moini, 2020):

- 1) Membrana de moco que protege el epitelio que se encuentra en contacto directo con el contenido del tubo digestivo.
- 2) Lámina propia que consiste en un tejido conectivo irregular y suelto.
- 3) Músculo liso denominado "*muscularis mucosa*".

La mucosa es más gruesa en la boca, esófago y ano, debe resistir la abrasión; mientras que es delgada en el intestino para facilitar la absorción y la secreción; después se encuentra la submucosa, responsable de regular los movimientos de la mucosa y la constricción de los vasos sanguíneos; su importancia radica en que contiene nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (glándulas) que conforman lo que se conoce como “plexo submucoso” o plexo de Meissner, y que consiste en 100 millones de neuronas sensoriales y motoras que son parte del sistema nervioso entérico (Netter y Reynolds, 2016).

La siguiente capa es la *muscularis* externa, un músculo esquelético que en la boca, faringe y esófago ayuda a llevar a cabo la deglución voluntaria, y en el esfínter del ano ayuda al control de la defecación; el estómago e intestino delgado y grueso, tienen musculatura de tipo lisa, cuyas contracciones ayudan al desdoblamiento de los alimentos, mezcla de secreciones y propulsión digestiva (peristalsis) (Tortora y Derrickson, 2017).

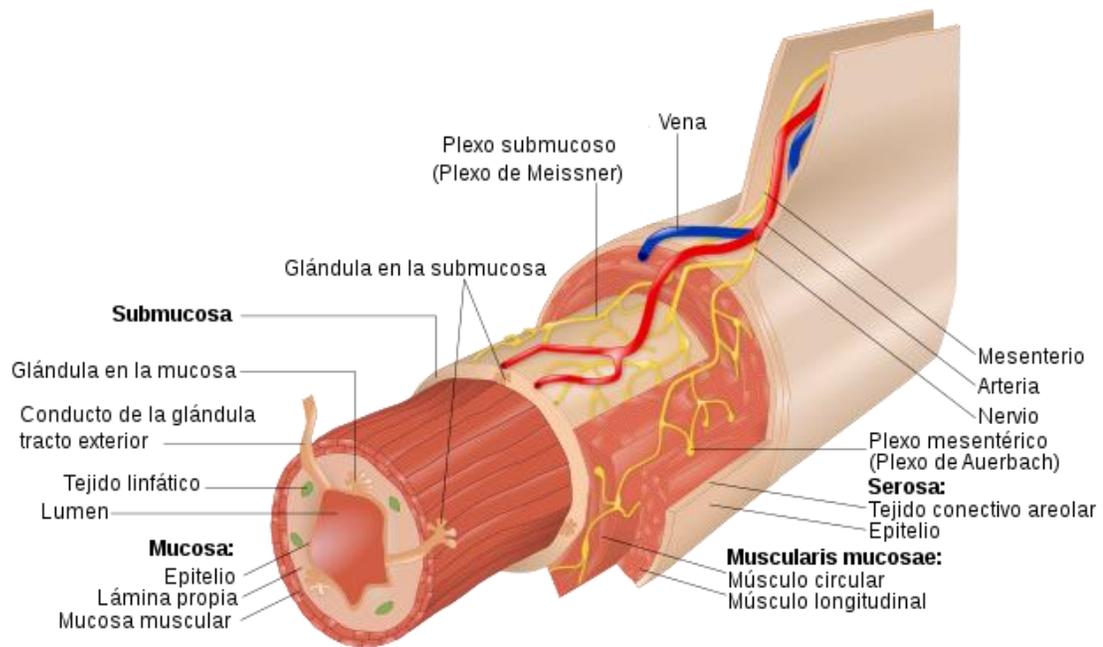


Figura 1. Capas del sistema gastrointestinal. Desde el interior hacia la superficie se encuentra la mucosa, submucosa, *muscularis* y serosa. Tomado de: Goran tek-en.

Por último, se encuentra la *túnica serosa*, la cual es la capa superficial suave del tubo digestivo, y se conoce como “peritoneo” o “adventicia”, dependiendo del órgano que rodea (Moini, 2020). El mesenterio y el mesocolon son repliegues del peritoneo, cuya función es mantener en sus sitio a los intestinos, permitiendo la contracción de estos (Walthall *et al.*, 2005).

2.1.3 Anatomía del intestino delgado

La longitud y diámetro del intestino delgado difiere entre especies; sin embargo, la composición celular es similar entre mamíferos y aves (Walthall *et al.*, 2005). El intestino delgado comienza en el esfínter pilórico gástrico y en el humano mide 2.5 cm de diámetro y 6 m de longitud; consiste en 3 partes: el duodeno, de 25 cm de largo, yeyuno, de 2.5 m e íleon de 3.5 m (Moini, 2020).

La pared intestinal de mamíferos está compuesta por las mismas capas del resto del tubo digestivo, como se describió anteriormente; no obstante, existen algunas diferencias en la túnica mucosa y submucosa con la finalidad de mejorar la digestión y absorción: la superficie del duodeno tiene pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades que incrementan el área por 600 dobles (Figura 2); los pliegues circulares (rebordes permanentes de la mucosa intestinal) mejoran la absorción al incrementar el área de superficie, además de hacer que la quimo, degradación del alimento después de la digestión en el estómago para pasar al intestino, transite en espiral y no en línea recta, lo que disminuye el movimiento y permite un mayor tiempo de exposición a la superficie intestinal (DeSesso y Williams, 2008). Las vellosidades de la mucosa, con una longitud de 0.5 a 1.5 mm, le confieren un aspecto aterciopelado, hay aproximadamente de 20 a 40 vellosidades por mm² y cada una de estas contiene una lámina propia, donde encontramos una red de capilares sanguíneos y el vaso quilífero, que es un capilar linfático; las células que conforman las vellosidades presentan extensiones apicales citoplasmáticas conocidas como “microvellosidades”, lo que confiere una apariencia de “borde de cepillo”, donde existen algunas enzimas para la digestión (Moini, 2020; Tortora y Derrickson, 2017).

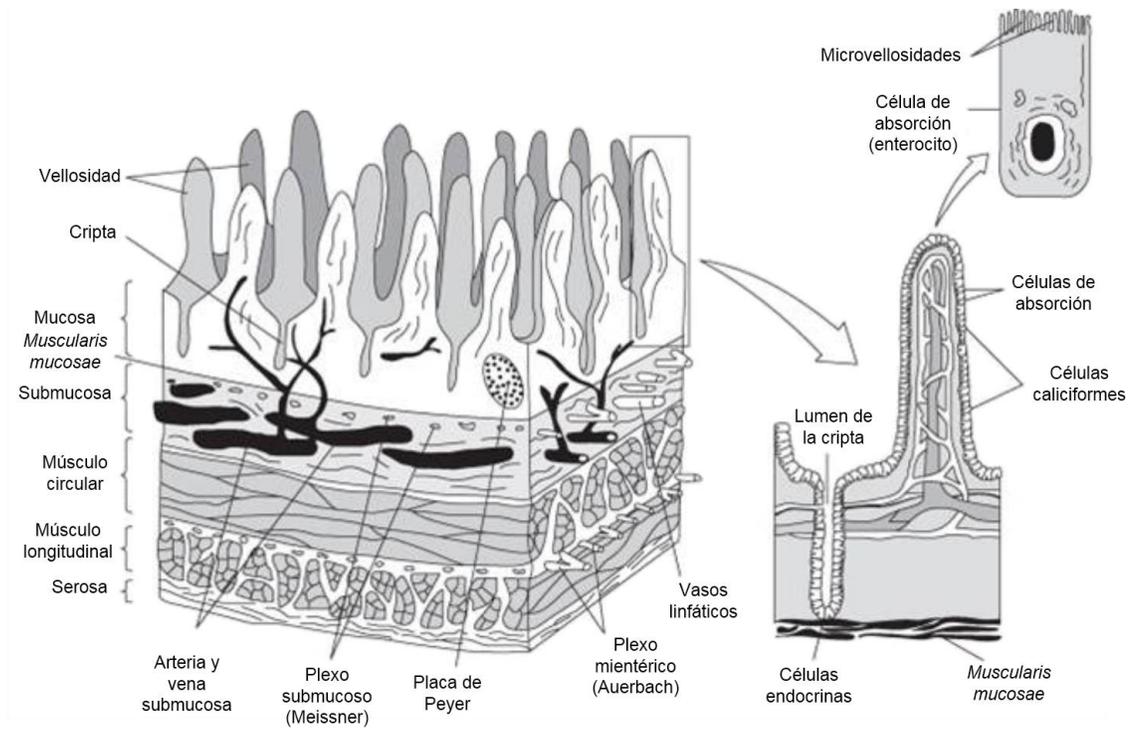


Figura 2. Estructura macroscópica del intestino delgado humano. Adaptado de: Rumsey, 2005. Publicado con permiso de Elsevier.

2.2 MUCOSA INTESTINAL

2.2.1 Estructura y función

La mucosa intestinal es el recubrimiento compuesto por el epitelio, la lámina propia y la *muscularis mucosae* (Ferrufino *et al.*, 2013). Este revestimiento representa el primer tejido que está en contacto con el lumen y desempeña una función de protección conocida como barrera intestinal, que actúa gracias a mecanismos físicos y químicos (Slawinska *et al.*, 2019). Los mecanismos físicos incluyen tres secciones: i) la capa de moco que cubre la mucosa intestinal, ii) el glucocálix en las microvellosidades de las células y iii) la monocapa de enterocitos; los mecanismos químicos son: la secreción de péptidos antimicrobianos, defensinas y lisozima, secretadas por las células de Paneth, y por el moco secretado por las células caliciformes (Okumura y Takeda, 2018).

La mucosa es semipermeable, permitiendo el paso selectivo de sustancias y nutrientes para su absorción por los enterocitos (Schoultz y Keita, 2020). Cuando se compromete alguno de los elementos de la función barrera, se favorece el paso de sustancias lumenales al medio interno y provoca una respuesta inmune exagerada y por ende, inflamación (Farré *et al.*, 2020).

2.2.1.1 Epitelio intestinal

Las células epiteliales del tracto digestivo tienen tres funciones principales: digestión y absorción de nutrientes, protección contra patógenos y renovación celular para eliminar las células dañadas (Kraehenbuhl *et al.*, 1997).

El epitelio está constituido por una capa de células epiteliales, cada una con funciones especiales; su recambio continuo es un mecanismo de defensa que previene daño de la pared intestinal por patógenos y la colonización del intestino (Takiishi *et al.*, 2017).

En el intestino delgado, el epitelio sobresale hacia el lumen en forma de vellosidades y permiten la presencia de invaginaciones conocidas como criptas de Lieberkühn, donde residen las células madre que permiten la proliferación y diferenciación celular (Crosnier *et al.*, 2006). Se ha estimado que la vellosidad es renovada por completo cada 4 – 5 días (Allaire *et al.*, 2018).

El epitelio de la mucosa se caracteriza por tener forma cilíndrica e incluye 4 tipos de células (Tabla 1): de absorción, caliciformes, enteroendocrinas y de Paneth; las células de absorción tienen microvellosidades que permiten una mayor captación de nutrientes y producen enzimas digestivas; las células caliciformes producen la capa de moco que recubre el epitelio intestinal; las células de Paneth, situadas en la parte más profunda de las criptas, producen enzimas con actividad bactericida (lisozimas); las células enteroendocrinas secretan hormonas, por ejemplo secretina (S), colecistocinina (CCC), motilina (M) y péptido insulínico dependiente de la glucosa (K) (Moini, 2020; Tortora y Derrickson, 2017; Walthall *et al.*, 2005).

Tabla 1. Tipo de células epiteliales del intestino, su función y localización

Tipo de célula	Localización en la mucosa	Función
De absorción	Epitelio y glándulas intestinales	Digestión y absorción de nutrientes en el quimo.
Caliciformes	Epitelio y glándulas intestinales	Secreción de moco.
Paneth	Glándulas intestinales	Secreción de lisozima; fagocitosis.
Enteroendocrinas: Células G Células I Células K Células M Células S	Glándulas intestinales del G: duodeno I: duodeno K: general M: duodeno y yeyuno S: general	G: Secreción de la hormona gastrina. I: Secreción de la hormona colecistocinina, la cual estimula la liberación de jugos pancreáticos y biliares. K: Secreción de la hormona péptido insulínico dependiente de glucosa, que estimula la liberación de insulina. M: Secreción de la hormona motilina, la cual acelera el vaciado gástrico, estimula la peristalsis intestinal y la producción de pepsina. S: Secreción de la hormona secretina.

Adaptado de: Yamada, 2003. Modificado por Volk, 2017.

El enterocito, una célula intestinal columnar y polarizada, es la más abundante del epitelio, es parte de la función barrera gracias a los complejos de uniones estrechas, de adhesión y desmosoma; el enterocito es el responsable de la absorción de nutrientes y otras sustancias; y presenta una concentración elevada de enzimas digestivas para regular el rompimiento y captación de nutrientes (Ali *et al.*, 2020).

2.2.1.2 Lámina propia y muscular de la mucosa

Debajo del epitelio se encuentra la lámina propia, la cual se compone de tejido conectivo no celular, como colágeno, elastina y miofibroblastos que dan soporte a la vellosidad; esta contiene el Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT) integrado por células del sistema inmune innato y adaptativo, como neutrófilos, células dendríticas y células T reguladoras (Shi y Walker, 2015). El GALT desencadena una respuesta inmune cuando identifica la entrada y diseminación de patógenos a través de la mucosa intestinal (Ahluwalia *et al.*, 2017). Además, se encuentran terminaciones nerviosas en estrecho contacto con los mastocitos, células que liberan mediadores inflamatorios y pueden afectar la función del sistema nervioso entérico y la contractibilidad del músculo liso (Boudry *et al.*, 2004; Takiishi *et al.*, 2017). Los macrófagos en la lámina propia se encuentran cerca de los enterocitos para fagocitar antígenos lumbinales que podrían dañar la barrera intestinal (Schoultz y Keita, 2020). Por otro lado, la *muscularis mucosae* separa la lámina propia de la submucosa y se compone de varias capas de músculo liso que da sostén y permite el estímulo de las glándulas de la cripta (Lee y Mezoff, 2021).

2.2.2 Mecanismos de transporte a través del epitelio intestinal

La absorción a través del epitelio depende del tamaño, la hidrofobicidad y otras propiedades químicas de los nutrientes, estos pueden ser transportados mediante dos mecanismos principales: la vía paracelular (entre células y a través de las uniones estrechas) y la vía transcelular (a través del enterocito) (Lennernäs, 2007). El transporte paracelular permite el paso de sustancias con un tamaño entre 400 Da y 10-20 kDa, los iones y moléculas de agua pueden transportarse a través de esta vía, restringiendo el paso de proteínas y macromoléculas antigénicas (Kapus y Szászi, 2006). El sistema paracelular está regulado por las proteínas de uniones estrechas, cuando esta barrera se compromete puede permitir el paso de antígenos que desencadenan procesos inflamatorias (Farré *et al.*, 2020).

El transporte transcelular permite la absorción de aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono, entre otros, mediante transporte activo (transportadores de membrana) o pasivo (por difusión) desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo (Schoultz y Keita, 2020). Las moléculas más grandes, como proteínas y bacterias, son captadas por las células mediante endocitosis (vesículas) y son transportadas activamente por transcitosis vectorial a través del citoplasma para llevar a cabo una respuesta inmunológica (Salvo-Romero *et al.*, 2015). También existe la bomba sodio – potasio (Na^+ , K^+ -ATPasa) capaz de crear un gradiente eléctrico que controla el paso a través del enterocito mediante la regulación de la secreción y absorción del Na^+ ligado a otros nutrientes en las membranas basolaterales (Kato y Owen, 2005).

2.2.2.1 Absorción transcelular mediante proteínas acarreadoras de solutos

Los acarreadores de solutos son proteínas transportadoras esenciales para la captación de nutrientes y xenobióticos, existen cerca de 400 genes que codifican para estas proteínas (Cedernaes *et al.*, 2011). Estas proteínas pueden acarrear aminoácidos, oligopéptidos, glucosa, hidratos de carbono, sales biliares, metales, vitaminas, lípidos, ácidos grasos, hormonas, cationes y aniones, entre otros (Steffansen *et al.*, 2004).

En la nomenclatura para nombrar estas proteínas transportadoras se incluye el prefijo *SLC*, siglas de su nombre en inglés *Solute Carrier*, seguido por un número y una letra que corresponden a la subfamilia, y un número al final que especifica el transportador (Ej. *SLC5* es la subfamilia responsable del transporte sodio glucosa y *SLC5A1* transcribe para el cotransportador sodio glucosa 1) (Hediger *et al.*, 2013). Los *SLC* se han estudiado extensamente en tejidos como el hígado y riñón; sin embargo, los estudios de la expresión de estos genes en el intestino son escasos (Estudiante *et al.*, 2016). Para la absorción de nutrientes en el intestino delgado es necesario una hidrólisis previa de los macronutrientes mediante enzimas o, en caso de lípidos, mediante sales biliares; después de esta hidrólisis, el transporte de los

micronutrientes hidrofílicos y con carga hacia el interior del enterocito, depende exclusivamente de *SLC* específicos (Engevik y Goldenring, 2018; Lin *et al.*, 2015).

Los acarreadores de glucosa regulan el tránsito de monosacáridos a través de la membrana celular del enterocito mediante los co-transportadores dependientes de sodio (Na^+)/glucosa (SGLT) e independientes de sodio (GLUT) para proporcionar energía a las células (Steffansen *et al.*, 2004). El SGLT1 y el transportador de glucosa 2 (GLUT2) son los principales transportadores intestinales de glucosa, galactosa y fructosa al interior del enterocito y hacia el torrente sanguíneo (Poulsen *et al.*, 2015). SGLT1 es una proteína apical (hacia el lumen) y GLUT2 es una proteína basolateral (parte inferior lateral del enterocito) (Figura 3) (Ferraris, 2001).

La proteína SGLT1, con afinidad por glucosa y galactosa, usa un mecanismo de transporte activo donde son necesarios dos iones de sodio para el paso de una molécula de glucosa; una vez dentro, el sodio regresa al espacio extracelular mediante la bomba sodio-potasio, utilizando 1 molécula de ATP (Navale y Paranjape, 2016). En el epitelio, las hexosas acumuladas (glucosa, galactosa y fructosa) son expulsadas por la membrana basolateral mediante GLUT2 de manera pasiva (Figura 3) (Wright *et al.*, 2012).

En el intestino del modelo aviar, la expresión de *SGLT1* y *GLUT2* aumenta de manera lineal con la edad (Gilbert *et al.*, 2007). El yeyuno es la región intestinal con mayor actividad transportadora de monosacáridos; sin embargo, la expresión de *GLUT2* también ocurre en el duodeno (Pinca *et al.*, 2019).

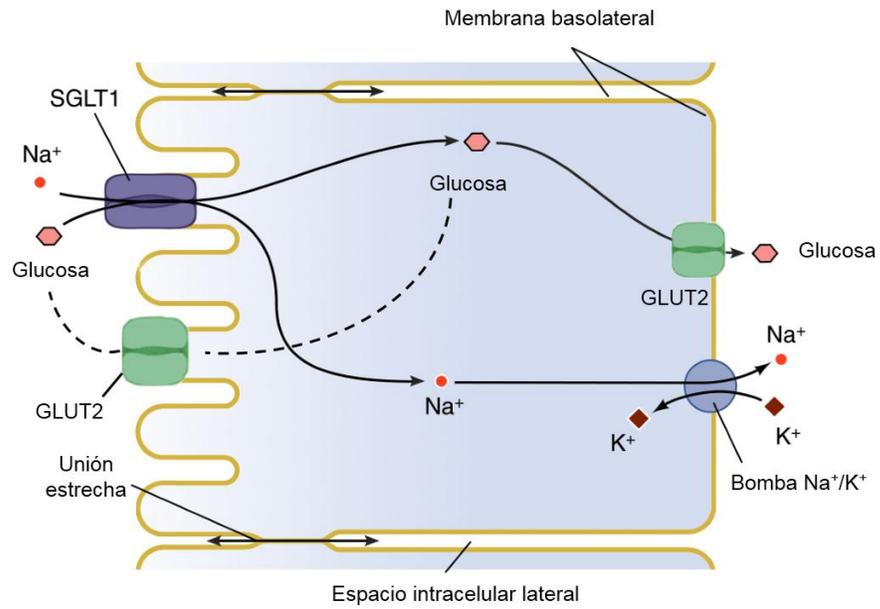


Figura 3. Modelo de absorción de glucosa a través del enterocito. Adaptado de Wright *et al.*, 2011

En el caso de las proteínas, después de la digestión por proteasas y peptidasas, los aminoácidos y pequeños péptidos están disponibles para su absorción mediante un transporte activo en el borde de cepillo intestinal (Tabla 2) (Kong *et al.*, 2018). Los transportadores de aminoácidos desempeñan funciones importantes en la captación de nutrientes, balance celular redox, señalización celular, reciclaje de neurotransmisores y la síntesis de proteínas para el crecimiento y supervivencia de las células; se han identificado al menos 9 transportadores de aminoácidos en el intestino delgado (Tabla 2) (Schweikhard y Ziegler, 2012).

Tabla 2. Sistemas transportadores de aminoácidos en el borde de cepillo del intestino delgado.

Sistema de transporte	Nombre común	Gen	Sustrato	Dependencia de Na ⁺
B ⁰	B ⁰ AT1	<i>SLC6A19</i>	L-aminoácidos neutrales	Sí
B ^{0,+}	ATB ^{0,+}	<i>SLC6A14</i>	L-aminoácidos neutrales, L-aminoácidos catiónicos y algunos D-aminoácidos neutrales	Si
b ^{0,+}	b ^{0,+} AT-rBAT	<i>SLC7A9</i> – <i>SLC3A1</i>	L-aminoácidos neutrales, L-aminoácidos catiónicos y cisteína	No
IMINO	SIT1	<i>SLC6A20</i>	Iminoácidos	Si
β	TAUT	<i>SLC6A6</i>	Taurina, β-alanina	Si
X _{AG} ⁻	EAAT3	<i>SLC1A1</i>	Aminoácidos aniónicos	Si
ASC	ASCT ₂ /ATB ⁰	<i>SLC1A5</i>	L-aminoácidos neutrales	Si
N	SN ₂ /SNAT ₅	<i>SLC38A5</i>	Glutamina, Asparagina e Histidina	Si
PAT	PAT1	<i>SLC36A1</i>	Aminoácidos neutrales pequeños	No

(Johnson *et al.*, 2012)

Específicamente, los pequeños péptidos (2-3 aminoácidos) son transportados por la proteína “transportador de péptidos 1” (PepT1) presente en la membrana apical de duodeno, yeyuno e íleon en mamíferos (Chen *et al.*, 2018). PepT1 utiliza un mecanismo electroquímico dependiente del paso de hidrógeno, es decir, es necesario el paso de un proton para el transporte de di- y tri- péptidos, el cual regresará al espacio luminal mediante la bomba de protones (Na^+/H^+ ; NHE_3); una vez dentro del citoplasma, los péptidos se hidrolizan y pasan al torrente sanguíneo mediante transportadores específicos para cada aminoácido, localizados en la membrana basolateral (Figura 4) (Spanier y Rohm, 2018).

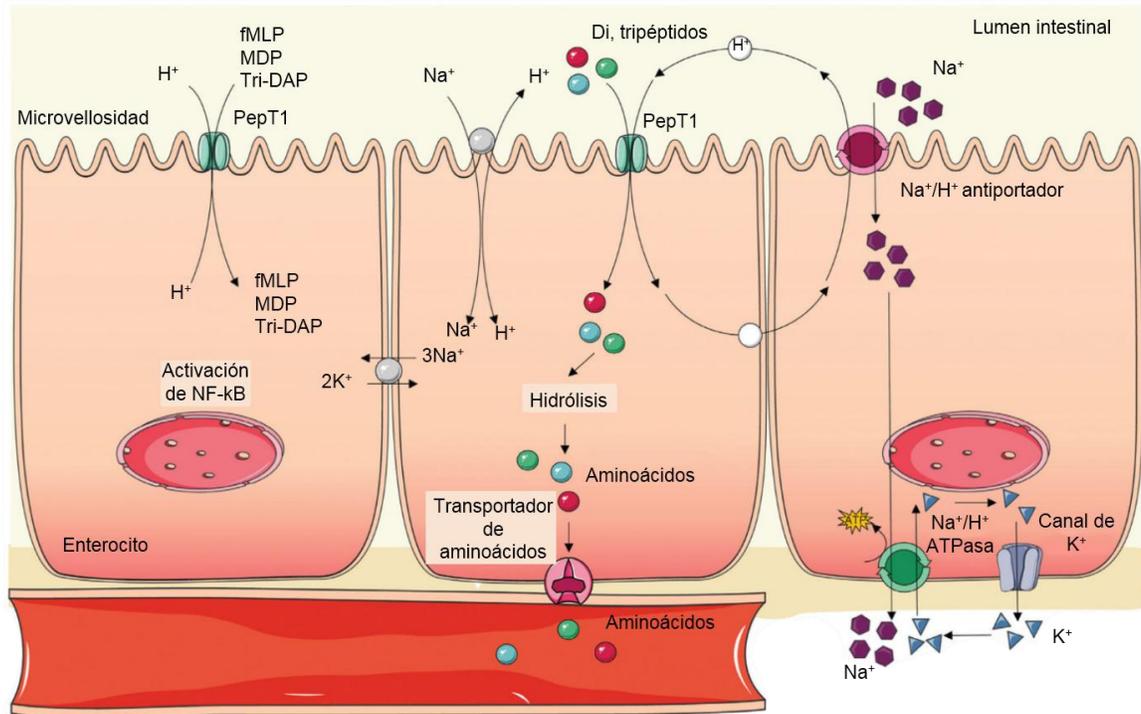


Figura 4. Modelo de la interacción entre PepT1 con diferentes péptidos en las células epiteliales del intestino. Adaptado de: Viennois *et al.*, 2018.

La absorción de di- y tri- péptidos es mayor en duodeno y yeyuno, mientras que la absorción de aminoácidos es mayor en íleon (Johnson y Gerwin, 2007). Las proteínas y aminoácidos son necesarios para el crecimiento y desarrollo de

vertebrados, pero también para la maduración del enterocito; por ejemplo, la Arginina (Arg) estimula la proliferación celular mediante la activación de la vía *mTOR* (mammalian Target of Rapamycin), mientras que la leucina (Leu) aumenta la tasa/velocidad de migración celular mediante la activación de *p70 S6* cinasa y la fosforilación de *4E-BP1* (Chen *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2018).

El transportador de aminoácidos excitatorios 3 (EAAT3) regula la absorción de aspartato y glutamato, que funcionan como fuente de energía oxidativa para el enterocito (Kaminski y Wong, 2018; Yang y Liao, 2019). Además, L-glutamato actúa como precursor de otros aminoácidos, como L-aspartato, L-alanina, L-prolina, L-ornitina y L-citrulina (Blachier *et al.*, 2009). EAAT3 necesita de tres iones sodio, un protón y un ion potasio como contra transportador para movilizar el glutamato en contra del gradiente electroquímico (Bjørn-Yoshimoto y Underhill, 2016).

En el modelo aviar, la absorción de péptidos sucede a lo largo de todo el intestino; sin embargo, el duodeno es la región que presenta una mayor expresión de *PepT1*, seguido de yeyuno e íleon (Corzo *et al.*, 2011). Asimismo, el enterocito de las aves presenta la mayoría de los sistemas de transporte de aminoácidos; estos transportadores también se localizan en los ciegos, donde el amonio obtenido de la urea es utilizado por la microbiota para la producción de aminoácidos (Miska *et al.*, 2015).

Para la absorción de ácidos grasos, los triglicéridos y los lípidos obtenidos de la dieta, son hidrolizados por lipasas durante la digestión, liberando monoacilglicerol y dos ácidos grasos libres; estos ácidos grasos son captados por el enterocito en forma de miscelas y transportados hacia el citoplasma por difusión pasiva, son resintetizados a triglicéridos en el retículo endoplásmico para formar quilomicrones (molécula capaz de atravesar la membrana basolateral) y llegar hacia la circulación portal (Figura 5); cuando se consume una alta cantidad de lípidos, estos se almacenan en el enterocito como gotas de lípidos citoplásmicas, o son utilizados

para la síntesis de lípidos complejos, oxidación o señalización celular (Carreiro y Buhman, 2019). La absorción de ácidos grasos sucede principalmente en yeyuno; sin embargo, una porción pequeña puede suceder a lo largo del duodeno e íleon (Niot *et al.*, 2009)

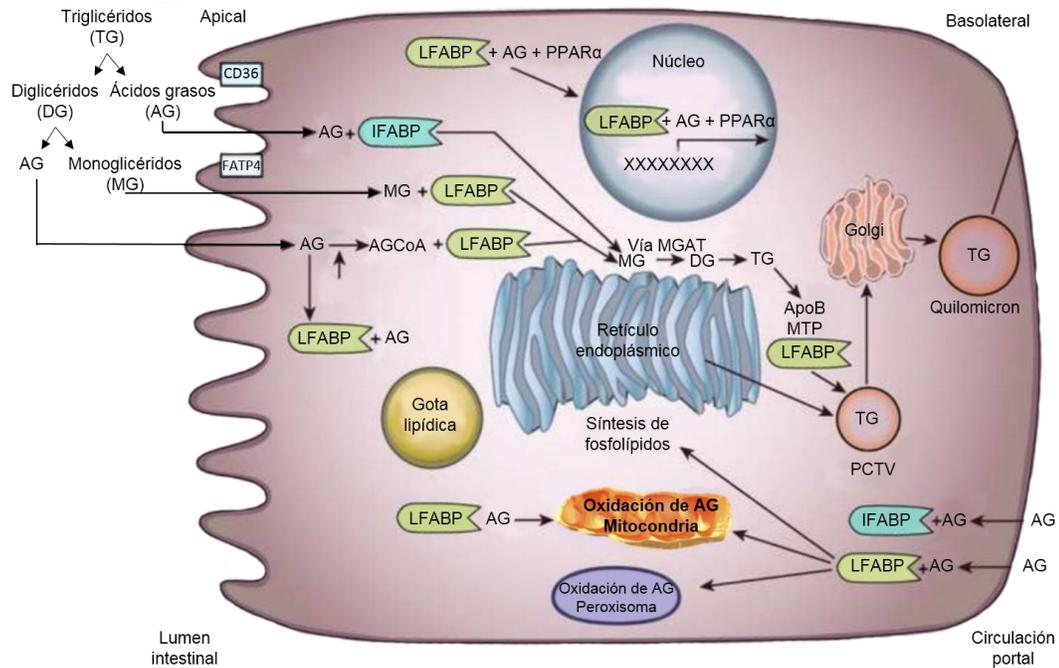


Figura 5. Función de LFABP e IFABP en los enterocitos intestinales. Adaptado de: Gajda y Storch, 2015

La proteína de unión a ácidos grasos (FABP, por sus siglas en inglés) desempeña funciones como: i) la captación intracelular de ácidos grasos de cadena larga (saturados e insaturados), así como de eicosanoides, grupo hemo y fosfolípidos; ii) asimilación y almacenamiento de lípidos dietarios, iii) regulación de la β oxidación de ácidos grasos, iv) regulación de citocinas proinflamatorias, v) regulación de lipólisis, proliferación y diferenciación celular (Su y Abumrad, 2009). FABP1 se localiza en intestino delgado, hígado, riñón y corazón, mientras que FABP2 es exclusivo del intestino delgado, tanto en la membrana apical como en la basolateral del enterocito; sin embargo, después de consumir alimento, FABP2 se encuentra

en el citosol del enterocito, mientras que en un periodo de ayuno puede expresarse en la superficie apical de esta célula (Gajda y Storch, 2015).

FABP1 y FABP2 han sido identificados en el intestino del pollo y se ha propuesto a FABP2 como un indicador de daño en el epitelio intestinal en aves (Chen *et al.*, 2015). En humanos, FABP2 tiende a disminuir su expresión en pacientes con isquemia/reperfusión causada por daño a la barrera intestinal (Chen *et al.*, 2015).

2.2.3 Secreción de mucinas en la mucosa intestinal

Las mucinas se definen como aglomerados complejos de glucoproteínas, con más de 50% de enlaces O-glicanos en su composición; cada molécula de mucina tiene un peso molecular de 2.7 MDa debido a sus abundantes cadenas de oligosacáridos, lo que explica su propiedad de formación de geles (Faderl *et al.*, 2015). Las glucoproteínas de las mucinas comparten una estructura común y son ricas en prolina (Pro), treonina (Thr) y serina (Ser) (dominio PTS); asimismo, los principales polisacáridos que se encuentran en las mucinas son galactosa, N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina (Johansson y Hansson, 2016). En aves y mamíferos, se han identificado principalmente dos tipos de mucinas clasificadas de acuerdo con su función:

- **Mucinas transmembranosas:** se encuentran en la superficie apical de la célula y no son capaces de formar gel, su importancia radica en anclar la red de mucosa hecha por las mucinas formadoras de gel; entre estas destacan las mucinas MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 y MUC17 encontradas en todo el intestino (Tabla 3) (Sicard *et al.*, 2017).
- **Mucinas formadoras de gel:** son secretadas por las células caliciformes y forman una capa de moco, se caracterizan por la presencia de cisteína en su C y N-terminal, la cual regula la oligomerización; de estas, MUC2 es la principal mucina en el intestino, mientras que MUC6 se expresa en glándulas

del estómago y duodeno. Existen otro tipos de mucinas que su expresión es especie dependiente (Tabla 3) (Yamashita y Melo, 2018).

Tabla 3. Expresión de mucinas asociadas a la mucosa en el intestino

Proteína	Expresión en mamífero/ modelo aviar	Célula que la expresa	Localización de expresión	Referencias
MUC2	Mamíferos y aves	Células caliciformes y de Paneth	En todo el intestino	(Audie <i>et al.</i> , 1993; Weiss <i>et al.</i> , 1996)
MUC4	Mamíferos y aves	Células caliciformes y Enterocito	Colon	(Audie <i>et al.</i> , 1993)
MUC13	Mamíferos y aves	Enterocito	En todo el intestino	(Williams <i>et al.</i> , 2001)
MUC3	Mamíferos	Enterocito	Intestino delgado	(Gum <i>et al.</i> , 2002; Chang <i>et al.</i> , 1994)
MUC12	Mamíferos	Enterocito	Colon	(Williams <i>et al.</i> , 1999)
MUC17	Mamíferos	Enterocito	Intestino delgado	(Gum <i>et al.</i> , 2002)
MUC5B	Mamíferos	Célula caliciforme	Colon	(Larsson <i>et al.</i> , 2011)
MUC6	Mamíferos y aves	Células glandulares	Glándula de Brunner	(HO SB <i>et al.</i> , 1995)

Adaptado de: Johansson y Hansson, 2016 y Duangnumswang *et al.*, 2021

La MUC2 es un polipéptido largo de 5,289 aminoácidos, cuyo dominio principal corresponde a un dominio rico en prolina (Pro), serina (Ser) y treonina (Thr); la O-glucosilación más abundante de MUC2 ocurre en las cadenas laterales con Ser y Thr y esto contribuye a las propiedades biofísicas esenciales de la mucosa, como la hidrofilia, la cual mantiene las glucoproteínas secretadas en una forma extendida (Martens *et al.*, 2018). Estudios con ratones han demostrado su importancia como barrera contra agentes patógenos y para el mantenimiento de la homeostasis intestinal; se ha observado que la ausencia de esta mucina conlleva al desarrollo de colitis, colonización bacteriana, inflamación y cáncer intestinal (Yamashita y Melo, 2018).

2.2.3.1 Interacciones de mucinas con la microbiota intestinal

La composición de las mucinas puede ser modificada por la microbiota intestinal, debido a que algunas comunidades bacterianas son capaces de inducir la expresión de *MUC2* y galactosidasa 2-alfa-L-fucosiltransferasa 2 (*FUT2*), afectando la fuerza y estructura glucolítica de las mucinas (Martens *et al.*, 2018). A su vez, este cambio puede crear un ambiente apto para bacterias específicas como *Bacteroides thetaiotaomicron*, la cual puede unirse y metabolizar las mucinas como fuente de energía; la degradación resultante de las mucinas conlleva a la producción de metabolitos microbianos que pueden afectar tanto la diferenciación de las células caliciformes y la composición de la microbiota, permitiendo la sobrepoblación de bacterias específicas como *Faecalibacterium prausnitzii* (Figura 6) (Schroeder, 2019).

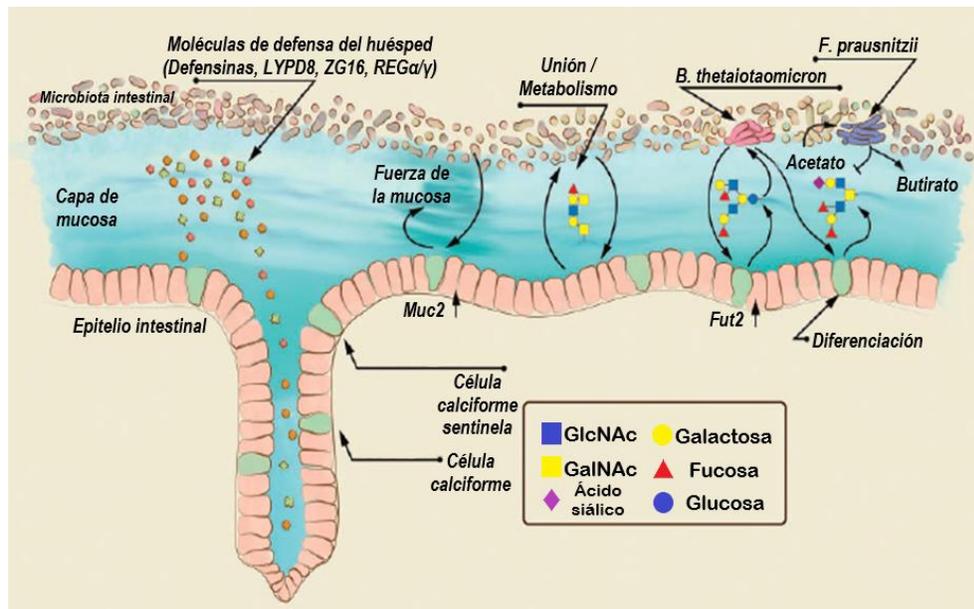


Figura 6. Mecanismo de infección de la capa de mucosa a través de la microbiota intestinal. Adaptado de: Schroeder, 2019.

Al ser una fuente importante de carbono y contener sitios de acoplamiento para la colonización bacteriana, es necesario que la mucosa cuente con moléculas de defensa para evitar el paso de bacterias oportunistas presentes en el lumen, tales como AMPs y anticuerpos específicos para antígenos microbianos (Schroeder, 2019). Las bacterias mucolíticas son aquellas capaces de degradar los oligosacáridos de las mucinas, entre ellas se encuentran: *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus gnavus* y *Ruminococcus torques*; los sacáridos que se liberan de esta degradación, tales como N-acetil-D glucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa fucosa y ácido siálico, son utilizados por bacterias comensales y patógenas incapaces de degradar mucinas (Ej. *Vibrio cholerae* utiliza ácido salico y N-acetil-D-glucosamina, mientras que *Campylobacter jejuni* metaboliza la fucosa) (Sicard *et al.*, 2017).

2.3 MICROBIOMA INTESTINAL

2.3.1 Función, diversidad y abundancia relativa

El término “microbioma” refiere a las bacterias, archaeas, hongos, protozoarios y virus, así como sus genes, metabolitos y el ambiente del hospedador (Khanna, 2018). La importancia del microbioma radica en el mantenimiento de la homeostasis energética, metabolismo, salud del epitelio intestinal, actividad inmunológica y desarrollo neurológico (Tabla 4); la diversidad de poblaciones, miembros de la microbiota, difiere considerablemente entre individuos debido a factores como la dieta, edad, genética, influencia étnica, geográfica, estado de salud y tratamientos médicos (Hillman *et al.*, 2017).

Tabla 4. Estudios que indican el potencial del microbioma intestinal humano en la fisiología del hospedador

Beneficios del microbioma en el humano	Referencias
Desarrollo del sistema nervioso	(Principi y Esposito 2016)
Maduración del sistema inmune	(Chung <i>et al.</i> 2012; Kamada y Nunez 2013)
Protección contra patógenos	(Kamada <i>et al.</i> 2013; Ubeda <i>et al.</i> 2017)
Renovación del epitelio intestinal	(Koboziev <i>et al.</i> 2014; Lin y Zhang 2017)
Regulación de la integridad de la barrera intestinal	(Sharma <i>et al.</i> 2010)
Regulación del apetito y comportamiento	(Norris <i>et al.</i> 2013; Kanwar <i>et al.</i> 2016; Fetissov 2017)
Angiogénesis intestinal	(Stappenbeck <i>et al.</i> 2002)
Recuperación de lesiones del epitelio intestinal	(Yu <i>et al.</i> 2012)
Mejora de obtención de energía mediante la digestión de fibras complejas	(Savage 1970; Hooper <i>et al.</i> 1998; Guarner y Malagelada 2003; Xu y Gordon 2003; Acheson y Luccioli 2004)
Producción de vitaminas	(Frick <i>et al.</i> 1967b; Gustafsson <i>et al.</i> 1977; Hill 1997; LeBlanc <i>et al.</i> 2013; Magnúsdóttir <i>et al.</i> 2015)
Metabolismo de xenobióticos	(O'Hara y Shanahan 2006)

Adaptado de: Yadav *et al.*, 2018.

El intestino es el órgano que alberga la mayor concentración de células bacterianas, con una cantidad aproximada de 10 – 100 billones de células (Barko *et al.*, 2018), y se estima que existen entre 500 a 2000 especies de bacterias (Khanna, 2018). Se estima una concentración de 10^3 – 10^4 células microbianas por gramo de contenido intestinal en el sistema digestivo superior (esófago, estómago e intestino grueso), aumentando conforme avanza hacia el colon, donde se encuentra una

concentración de 10^{10} – 10^{11} bacterias por gramo (Figura 7) (Gorkiewicz y Moschen, 2018).

La diversidad y abundancia relativa de la microbiota difiere en cada región del sistema intestinal y varios factores influyen en esta: i) el pH es menor en el duodeno (pH ~6) y aumenta a medida que se acerca al íleon (pH ~7); ii) la concentración de oxígeno cambia de aerobio a anaerobio de la región proximal hacia la distal o con condiciones anóxicas en el lumen y una ligera tensión de oxígeno en la mucosa; iii) la presencia de péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth como α -defensinas, lectinas tipo C, lisozimas y fosfolipasas A2; iv) la velocidad de tránsito es rápida en la región intestinal superior y se enlentece en el inferior (Gorkiewicz y Moschen, 2018; Hillman *et al.*, 2017).

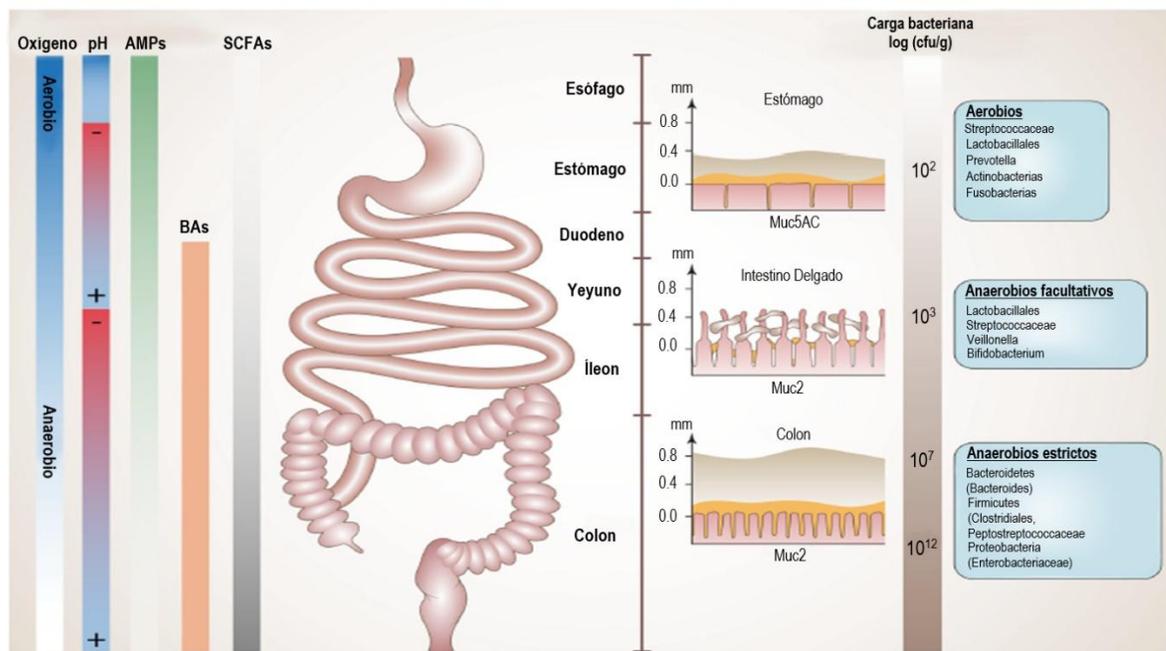


Figura 7. Biogeografía y factores que conforman la organización espacial del microbioma intestinal. Adaptado de: Gorkiewicz y Moschen, 2018.

La microbiota en el intestino adulto, está compuesta principalmente por los filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia, y en menores concentraciones por Fusobacteria, Tenericutes, Spirochaetes, Cyanobacteria y TM7 (Tabla 5) (Hillman *et al.*, 2017; Human Microbiome Project Consortium, 2012; Khanna, 2018). Los filos Bacteroidetes y Firmicutes representan la mayor proporción de la microbiota, con un porcentaje aproximado de 23% y 64%, respectivamente; el filo Firmicutes comprende hasta >200 géneros diferentes, entre los que destacan *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y los productores de butirato *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Roseburia*; mientras que el filo Bacteroidetes presenta géneros como *Bacteroides*, *Prevotella* y *Xylanibacter*, capaces de degradar glucanos complejos (Sánchez-Tapia *et al.*, 2019).

Tabla 5. Principales filos en la microbiota intestinal y algunas características importantes.				
Filo	Clase	Géneros representativos	Especies	Características generales
Actinobacteria	Acidimicrobiia Actinobacteria Coriobacteriia Nitriliruptoria Rubrobacteria Thermoleophilia	<i>Bifidobacterium</i> <i>Adlercreutzia</i> <i>Collinsella</i>	~123	Gram positivos, con un contenido alto de guanina – citosina en su ADN.
Bacteroidetes	Bacteroidia Flavobacteria Sphingobacteria Cytophagia	<i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Alistipes</i> <i>Butyricimonas</i> <i>Odoribacter</i> <i>CF231</i> <i>Paraprevotella</i>	Más de 700	Gram negativos, no formadores de esporas, anaerobios o aerobios, con forma de barra.
Cyanoba	Chroobacteria Hormogoneae Gloeobacteria	<i>Halospirulina</i> <i>Planktothricoides</i> <i>Prochlorococcus</i> <i>Prochloron</i> <i>Prochlorothrix</i>	~54	Son las únicas procariontes fotosintéticos oxigenados; juegan roles clave en los ciclos globales de carbono y nitrógeno.
Elusimic	Elusimicrobia Endomicrobia Blastocatellia	<i>Elusimicrobium</i> <i>Endomicrobium</i> <i>Chloracidobacterium</i> <i>Arenimicrobiom</i> <i>Brevitalea</i> <i>Pirynomonas</i> <i>Blastocatella</i>	15	Presentes en ecosistemas contaminados. Simbiontes.
Firmicutes	Bacilli Clostridia Erysipelotrichi	<i>Ruminococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Faecalibacterium</i>	>1200	Gram positivas. Con una concentración baja de GC en su ADN. En forma de cocos o de bacillos. Varios Firmicutes producen endosporas.
Fusobacteria	Fusobacteriia	<i>Sebaldella</i>	~40	

		<i>Sneathia</i> <i>Streptobacillus</i> <i>Leptotrichia</i> <i>Cetobacterium</i> <i>Fusobacterium</i>		Son anaerobios obligados, no formadores de esporas, bacilos gram negativos.
Proteobacteria	Alphaproteobacteria Betaproteobacteria Gammaproteobacteria Deltaproteobacteria Epsilonproteobacteria Zetaproteobacteria	<i>Desulfovibrio</i> <i>Escherichia</i> <i>Helicobacter</i>	>450	Filo con mayor cantidad de bacterias gram negativas, incluye una gran variedad de patógenos.
TM7	TM7X		~50 filotipos	Cocos pequeños (200 – 300nm). Son epibiontes obligados en diversos hospedadores.
Tenericute	Mollicutes	<i>Mycoplasma</i> <i>Spiroplasma</i> <i>Ureaplasma</i> <i>Phytoplasma</i>	>25	No contiene pared celular. Tamaño pequeño (0.2 – 0.3 µm).
Verrucomicrobia	Spartobacteria Opitutae Verrucomicrobiae Lentimonas Methylacidimicrobium	<i>Verrucomicrobia</i>	~10	Las especies identificadas han sido aisladas de agua, suelo y heces humanas. Tienen una morfología parecida a verruga.

Adaptado de: Sánchez-Tapia *et al.*, 2019.

2.3.1.1 Factores que modulan la diversidad de la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal es dinámica y diversos factores influyen en su diversidad, entre los que destacan: i) la dieta; por ejemplo, una dieta abundante en proteínas favorece la colonización de *Bacteroides*; mientras que una dieta abundante en hidratos de carbono favorece la abundancia del género *Prevotella* (Jacobs y Braun, 2015); ii) la edad, el intestino en adultos mayores se caracteriza por una menor biodiversidad microbiana, el aumento de bacterias aerobias facultativas oportunistas como *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* y *Enterobacteriaceae*, y la disminución de *Bifidobacteriaceae* (Flach y Diefenbach, 2015; Kovatcheva-Datchary y Arora, 2013; Tokuhara *et al.*, 2019); iii) el consumo de antibióticos debido a que ocasiona cambios en la microbiota persistentes hasta después de terminado el tratamiento y una disminución de la diversidad a largo plazo (Kovatcheva-Datchary y Arora, 2013); iv) la genética del hospedador; estudios con gemelos idénticos (monocigotos) han demostrado similitudes en la composición de la microbiota intestinal en comparación con la microbiota de individuos relacionados (Turnbaugh *et al.*, 2009).

2.3.2 Disbiosis intestinal

Una disminución o aumento inusual de la microbiota se ha correlacionado con el desarrollo de patologías. Al proceso de alteración en la diversidad y abundancia de la microbiota intestinal se le conoce como disbiosis; la disbiosis se ha asociado al desarrollo de enfermedades intestinales y sistémicas (Tabla 6) (Cai *et al.*, 2020).

Tabla 6. Asociación de la microbiota intestinal humana en la aparición de diversas enfermedades.

ENFERMEDAD	DISBIOSIS	REFERENCIA
Psoriasis	Aumentan miembros de los filos Firmicutes y Actinobacteria	(Gao et al. 2008)
Reflujo esofágico	La microbiota esofágica se ve dominada por bacterias anaerobias gram-negativas, mientras que la microbiota gástrica tiene una baja concentración de <i>Helicobacter pylori</i>	(Peek and Blaser 2002; Islami and Kamangar 2008)
Obesidad	Disminuye <i>Bacteroidetes</i> y aumenta <i>Firmicutes</i> .	(Ley et al. 2005; Turnbaugh et al. 2006)
Asma en la infancia	Ausencia de <i>H. pylori</i> en el estómago (especialmente la citotoxina asociada al gen A)	(Chen and Blaser 2007)
Enfermedad inflamatoria intestinal (colitis)	Mayor población de <i>Enterobacteriaceae</i> .	(Garrett et al. 2010; Machiels et al. 2014; Seksik et al. 2003)
Colitis ulcerativa	<i>R. hominis</i> y <i>F. prausnitzii</i> disminuyen	
Enfermedad de Chron	Bacteroides y Bifidobacteria disminuyen	
Enfermedades funcionales intestinales	Mayor cantidad de <i>Veillonella</i> y <i>Lactobacillus</i>	(Tana et al. 2010)
Carcinoma colorectal	Mayor cantidad de <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Acidaminobacter</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> , <i>Citrobacter farmer</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i> y menor cantidad de <i>Prevotella</i> , <i>Ruminococcus</i> spp	(Kostic et al. 2012; Weir et al. 2013)
Enfermedad cardiovascular	Metabolismo intestinal dependiente de microbiota de fosfatidilcolina. <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> produce TMA. Los filos Firmicutes y Proteobacteria y seis géneros que consumen colina y acumulan TMA significativamente: <i>Anaerococcus hydrogenalis</i> , <i>Clostridium asparagiforme</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Escherichia fergusonii</i> , <i>Clostridium hathewayi</i> , <i>Proteus penneri</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , y <i>Edwardsiella tarda</i>	(Wang et al. 2010; Koeth et al. 2013; Romano et al. 2015)
Diabetes tipo I	Disminuye el número de <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Blautia coccoides</i> , <i>Eubacterium rectal</i> , <i>Prevotella</i> y aumenta el número de <i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Veillonella</i>	(Murri et al. 2013; Zhang et al. 2015)
Diabetes tipo II	Disminuye <i>Clostridia</i> , Firmicutes. La tasa de <i>Bacteroides</i> a <i>Firmicutes</i> es significativamente positiva	(Murri et al. 2013; Zhang et al. 2015)
Artritis reumatoide	Baja concentración de Bifidobacteria y <i>Bacteroides fragilis</i> .	(Yeoh et al. 2013)
Autismo	Crecimiento excesivo de <i>Clostridia</i> y disminución de Bifidobacteria	(Heberling et al. 2013)
Esteatohepatitis no alcohólica	Aumento excesivo de <i>E. coli</i>	(Chu et al. 2004)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Aumenta Proteobacterias; en vías respiratorias asmáticas incrementan Firmicutes, disminuye Bacteroidetes	

Adaptado de: Yadav *et al.*, 2017.

2.3.3 Uso del gen *16S rRNA* para el estudio de la microbiota

El uso de técnicas moleculares ha permitido demostrar que los cambios en la microbiota intestinal están asociados al desarrollo de enfermedades o procesos inflamatorios (National Academies *et al.*, 2017). El método cultivo - independiente para el estudio del microbioma tiene como objetivo realizar análisis bioinformáticos para determinar diversidad y abundancia relativa de las poblaciones microbianas intestinales (Franzosa *et al.*, 2015).

El gen *16S rRNA* es un gen constitutivo empleado como estándar de oro para establecer la taxonomía bacteriana en todo tipo de muestras; es un componente de la subunidad menor *30S* presente en los ribosomas de procariontes, tiene un tamaño de ~1,500 pb y está constituido por nueve regiones conservadas y variables (V1 – V9) que permiten realizar asignaciones taxonómicas mediante la amplificación y secuenciación de la región variable seleccionada; las variaciones encontradas en su secuencia únicamente indican divergencia filogenética (Cox *et al.*, 2013; Weinroth *et al.*, 2022).

La secuenciación del gen *16S rRNA* requiere de iniciadores específicos que se unen a las regiones conservadas y amplifican las regiones variables para la discriminación taxonómica; pueden existir diferencias significativas en las poblaciones detectadas de acuerdo a la región hipervariable amplificada (Ames *et al.*, 2017). El tipo de muestra determina la región hipervariable de preferencia a secuenciar; por ejemplo, para la caracterización de la microbiota en agua se prefiere la amplificación de la región hipervariable V4 (Zhang *et al.*, 2018). Para el análisis de la microbiota intestinal, la región V3-V4 es la más utilizada debido a que permite una mayor uniformidad en la diversidad alfa y una detección precisa de la familia *Enterobacteriaceae* (Darwish *et al.*, 2021).

2.4 Análisis de la microbiota intestinal en el modelo *Gallus gallus*

En la producción avícola se estudian los cambios en la microbiota intestinal con la finalidad de incrementar la productividad y el bienestar animal; la presencia de familias específicas como *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* se relacionan con una mejor tasa de conversión alimenticia en aves (Liu *et al.*, 2021) y en cerdos (Gardiner *et al.*, 2020); en humanos, estas familias se asocian a efectos antiinflamatorios intestinales y regulación de peso corporal (Vacca *et al.*, 2020).

Además, otros conceptos y mecanismos que aplican para la salud del humano han surgido gracias al análisis de la microbiota en aves de corral; por ejemplo, el brote de *Salmonella infantis* en pollitos de engorda en el año 1971, además de la mejora de los estándares de higiene en la producción avícola, fue necesario determinar el rol de la microbiota intestinal como un factor de protección del hospedador ante enteropatógenos, por lo que Nurmi y Rantala (1973) realizaron un trasplante fecal de pollos adultos a pollitos, observando la resistencia de colonización ante *Salmonella* y describieron el concepto de exclusión competitiva (Nurmi & Rantala, 1973). Asimismo, existen bacterias no patógenas para las aves pero sí para los humanos (Tabla 7); por ejemplo, la mayoría de los casos de infección por *Campylobacter* en humanos se debe a la manipulación y consumo de productos aviares crudos o mal cocidos (Kaakoush *et al.*, 2014).

Tabla 7 Miembros de la microbiota intestinal del pollo que pueden impactar en la salud humana

Patógeno bacteriano	Filo bacteriano	Enfermedad	Síntomas	Antibióticos utilizados en tratamiento
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> <i>C. upsaliensis</i> <i>C. concisus</i>	Proteobacteria	Campylobacteriosis	Diarrea sanguinolenta, cólico estomacal, náusea, vómito y fiebre	Levofloxacina, azitromicina, ciprofloxacina
<i>Salmonella enterica</i> serotipos Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, y Kentucky	Proteobacteria	Salmonellosis	Fiebre, diarrea sanguinolenta, dolor de cabeza, cólico estomacal, náusea y vómito	Fluidos intravenosos, loperamida
<i>Listeria monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i> <i>L. grayi</i> <i>L. ivanovii</i>	Firmicutes	Listeriosis	Aparición repentina de fiebre, dolor de cabeza y espalda, náusea, vómito, rigidez de cuello y aparición gradual de confusión	Ampicilina, gentamicina, trimetoprima / sulfametoxazol, eritromicina, vancomicina y las fluoroquinolonas
<i>Clostridium perfringens</i>	Firmicutes	Intoxicación alimentaria	Deshidratación, diarrea y cólico estomacal	Penicilina G, cloranfenicol, clindamicina
<i>Aeromonas caviae</i> <i>A. hydrophila</i> <i>A. salmonicidasoucida</i> <i>A. schuberti</i>	Proteobacteria	Diarrea del viajero	Diarrea y vómito	Cloranfenicol, ciprofloxacina, cotrimoxazol y el aminoglucósidos
Cepas <i>E. coli</i> productoras de toxina Shiga	Proteobacteria	Intoxicación alimentaria	Diarrea acuosa y sanguinolenta, náusea, vómito y fiebre	Ciprofloxacina, kanamicina, cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes	Staphylococcosis	Náusea, vómito, cólico estomacal y diarrea	Penicilina, eritromicina, lincomicina y espectinomocina

Adaptado de: Sood *et al.*, 2019.

2.4.1 Anatomía y fisiología aviar

El sistema gastrointestinal aviar consiste en boca, esófago, ingluvis (buche), proventrículo, ventrículo o molleja, intestino delgado, ciegos, recto y cloaca; el alimento pasa a través de estos órganos y se lleva a cabo la molienda, acidificación, hidrólisis, emulsificación y transporte de los productos finales (Figura 8) (Klasing, 1999).

En la entrada torácica, el esófago se caracteriza por ser expandible debido a la presencia de pliegues longitudinales y un epitelio recubierto con una capa de moco gruesa para la protección contra daños mecánicos consecuentes por el ingreso de alimentos enteros; el esófago superior se ensancha para formar el ingluvis (buche), después continúa el esófago inferior y pasa por la parte dorsal de la tráquea (a lo largo de la cara ventral de los pulmones y sobre la base del corazón); a nivel del tercero o cuarto espacio intercostal, el esófago se abre hacia el proventrículo (Klasing, 1999). El ingluvis permite el almacenamiento temporal del alimento hasta por 20 horas y aquí se lleva a cabo una pre digestión; las contracciones musculares del ingluvis permiten la propulsión del alimento hacia el estómago (König *et al*, 2016). El ingluvis es capaz de producir una respuesta inmune innata por la presencia de tejido inmune y beta defensinas (BD-1, BD-6, BD-7 y BD – 9) (König *et al*, 2016).

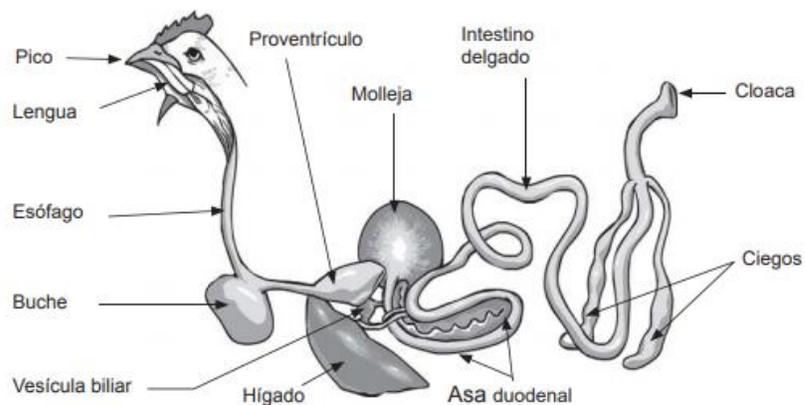


Figura 8. Esquema del sistema gastrointestinal del pollo. Tomado de: Agencia de Cooperación Internacional del Japón, 2017.

El estómago glandular o proventrículo se encuentra en una bolsa del saco peritoneal intestinal y, específicamente en el pollo, la mucosa de este órgano se distribuye en forma de papilas prominentes y no en pliegues; las paredes de las glándulas del proventrículo consisten en células secretoras de pepsinogenos y ácido hidrociorídrico que inician la digestión de proteínas; por lo tanto, la digestión inicia desde este órgano (Scanes y Pierzchala-Koziec, 2014; König *et al.*, 2016).

Posteriormente, el alimento es transportado hacia el ventrículo o molleja (conocido como el órgano de trituración) localizado en la cavidad izquierda del peritoneo intestinal; aquí ocurre la mezcla y digestión química del alimento (Klasing, 1999).

Similar al intestino delgado de mamíferos, el intestino delgado aviar se divide en duodeno, yeyuno e íleon; el intestino grueso incluye el colon, los ciegos y el recto (Tabla 8) (Klasing, 1999). El intestino delgado en aves lleva a cabo parte de la digestión química y la absorción de nutrientes, los ciegos se encargan de la degradación de celulosa, mientras que el recto y la cloaca pueden reabsorber el agua; el sistema inmune del tracto digestivo en aves prevalece en el yeyuno distal y el inicio del ciego debido a una mayor abundancia de placas de Peyer (König *et al.*, 2016).

Los ciegos están conectados con el íleon terminal mediante el ligamento ileocecal y cada ciego se comunica con el recto mediante el *caeci ostium*; debido a que son un sitio de digestión de polisacáridos como la celulosa presentan abundante tejido linfoide; tienen la función de absorber sodio, cloro y agua, así como de secretar o excretar remanentes nitrogenados y fermentar polisacáridos no digeribles para aumentar la disponibilidad de nutrientes como vitaminas y ácidos grasos volátiles (Scanes y Pierzchala-Koziec, 2014; König *et al.*, 2016).

El recto es el segmento final que pasa a la cloaca, anteriormente era conocido como el colon; la cloaca es el esfínter de excreción para los sistemas digestivo-urinario, y sirve como área de almacenamiento de heces y orina (Klasing, 1999; König *et al.*, 2016).

La mucosa intestinal de las aves contiene aproximadamente 10⁵ microvellosidades por mm en todos los segmentos del intestino; a su vez, las microvellosidades están cubiertas por una capa de moco compuesta principalmente por mucina 2 y es particularmente gruesa a través del duodeno anterior (Klasing, 1999; Scanes y Pierzchala-Koziec, 2014).

Tabla 8. Dimensiones del sistema digestivo del pollo

Estirpe de pollo	Peso coronal	Esófago		Proventrículo y molleja		Intestino delgado		Ciego		Recto	
		Largo (mm)	Peso (g)	Largo (mm)	Peso (g)	Largo (mm)	Peso (g)	Largo (mm)	Peso (g)	Largo (mm)	Peso (g)
Leghorn	1.2	136	8.2	86	26.7	1082	29.5	127	5.2	68	2.3
Broiler	3.0	140	16.8	101	43.5	1796	73.6	188	10.7	134	5.1

Adaptado de: Deaton *et al.*, 1985

2.4.2 Comparativa del sistema digestivo humano y aviar

Al igual que en mamíferos, el intestino delgado de las aves es el principal sitio de digestión y absorción de carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, minerales y electrolitos (Lavin *et al.*, 2008). Estructuralmente, el sistema gastrointestinal de las aves es similar al presente en mamíferos (Tabla 9); por ejemplo, ambos poseen un esófago que conecta la boca con el estómago, el intestino delgado se divide en duodeno, yeyuno e íleon, y presentan un colon como intestino grueso; asimismo, el hígado y páncreas de aves y mamíferos desempeñan la función de secretar sales biliares y jugos pancreáticos, respectivamente (Scanes, 2020).

Sin embargo, existen diferencias considerables en la morfología gastrointestinal de especies vertebrados debido a la naturaleza de su alimento y la frecuencia de consumo (Kararli, 1995). La anatomía digestiva aviar se diferencia de la presente en mamíferos por (König *et al.*, 2016):

- Presencia de pico
- No existe separación entre las cavidades orales y faríngeas
- Ausencia de dientes, labios y mejillas
- Presencia de ingluvis
- División del estómago en componentes glandulares y musculares
- Presencia de dos ciegos y cloaca

Tabla 9. Comparación entre el sistema digestivo humano y del modelo *G. gallus*.

Región gastrointestinal	Humano	Modelo <i>G. gallus</i>
Estómago	Cuatro regiones: cardia, fundus, cuerpo y piloro pH 1.5 a 3.5	Un estómago glandular o proventrículo (pH 4.8), y molleja (pH 2.5 – 4.74).
Intestino delgado	5.5 – 6.4 m de longitud pH 6.4 a 7.3	Promedio de 1.3 m pH 5.7 a 6.4
Ciego	Más corto que el colon No hay fermentación pH 5.7	Presencia de doble ciego. Cada uno mide de 15 – 18cm Elevada fermentación pH 5.5 a 7.0
Apéndice	Presente	Ausente
Colon	Dividido en ascendente, trascendente y descendente Principal sitio de fermentación Capa de moco gruesa pH 6.7	No presenta colon, únicamente recto. Capa de moco gruesa pH 6.3

Adaptado de: Kararli, 1995

2.4.3 Similitud genética entre el modelo *G. gallus* y el humano

El pollo es considerado como un animal sinapsido, es decir, comparte un ancestro común con los mamíferos (~ 310 millones de años atrás); es la primera especie de producción que cuenta con la secuencia completa de su genoma y se considera un modelo viable para estudios con aplicaciones en agricultura y medicina (Ireland *et al.*, 2008). El pollo tiene un genoma haploide con aproximadamente 1.2×10^9 pares de bases (pb) y 39 cromosomas (Warren *et al.*, 2016); 40% del tamaño de los mamíferos y se ha postulado que la sintenia (conservación de bloques de orden dentro de dos conjuntos de cromosomas que se comparan entre sí) es mayor entre la relación humano - pollo que en la humano – ratón, lo que sugiere una estabilidad del genoma del pollo (Furlong, 2005).

El genoma del pollo contiene menos ADN en comparación con el genoma humano, sin embargo, el pollo contiene una cantidad similar de genes al humano (20,000 – 23,000 genes en 1 millón de pares de bases de ADN y 20,000-25,000 genes en 2.8 millones de pares de bases de ADN, respectivamente) (Furlong, 2005); cerca del 60% de la genética del pollo corresponde a genes similares en el humano; la similitud de genomas entre el pollo y el humano con respecto a los genes involucrados en la función y estructura básica celular apoya el uso de esta ave como un organismo modelo para la investigación de genética humana, enfermedades, nutrición, inmunología y desarrollo (Figura 9) (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

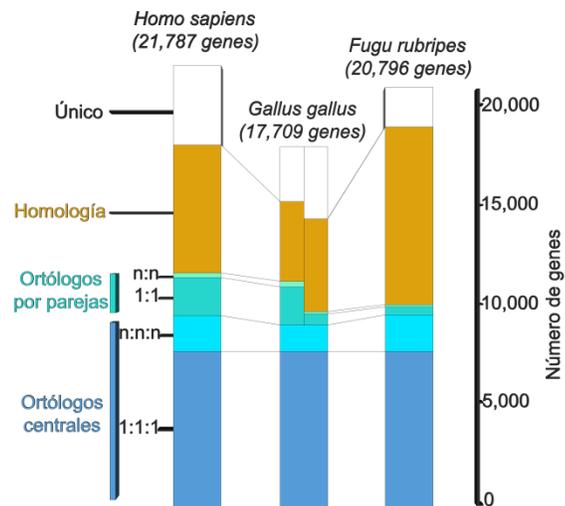


Figura 9. Genes del pollo clasificados de acuerdo a su relación de evolución predecida con genes de dos modelos vertebrados (Fugu y humano). Adaptado de: International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004.

2.4.4 Microbiota intestinal del modelo aviar

La microbiota intestinal del pollo incluye principalmente bacterias pertenecientes a los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria; su abundancia relativa difiere de acuerdo a la región intestinal analizada (Tabla 10) (Oakley *et al.*, 2014). El establecimiento de la microbiota intestinal del pollo comienza desde antes de eclosionar, a través de los poros del cascarón del huevo; sin embargo, sucede una mayor colonización una vez que eclosiona (Shehata *et al.*, 2021). Se ha propuesto que la familia *Enterobacteriaceae* es el primer colonizador del tracto gastrointestinal de las aves; posteriormente, miembros del filo Firmicutes colonizan el sistema intestinal (Ballou *et al.*, 2016).

Se ha propuesto que la colonización bacteriana temprana del intestino influye en la salud y producción de las aves debido a que las poblaciones bacterianas pueden regular la fisiología intestinal y consecuentemente, la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Kers *et al.*, 2018). Se ha observado una estabilización y maduración de la microbiota a las tres semanas de edad en pollos (Shang *et al.*, 2018). El cambio abrupto de la microbiota como un aumento del filo Proteobacteria conlleva a un estado proinflamatorio, mientras que un aumento de Firmicutes se asocia a un estado antiinflamatorio (Oakley y Kogut, 2016).

Tabla 10. Distribución espacial de la taxonomía bacteriana más común y abundante (filo, orden (o), familia (f), género) en el sistema gastrointestinal del pollo, sin tomar en cuenta edad, dieta o diferencias en técnicas de identificación.

Parte del sistema gastrointestinal (g/contenido)	Filo bacteriano	Género bacteriano	Técnica utilizada	Referencia
Ingluvís (10^8 - 10^9 /g)	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	Secuenciación del gen 16S rRNA	Gong et al. (2007)
Molleja (10^7 - 10^8 /g)	Actinobacteria Proteobacteria Firmicutes	<i>Bifidobacterium</i> <i>Enterobacter</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i>		
Intestino delgado (la mayor parte de los estudios se realizaron con el íleon; 10^8 – 10^9 /g)	Firmicutes/ Bacterias Gram positivas con baja cantidad genómica de GC	<i>Enterococcaceae</i> (f.), <i>Enterococcus</i> , <i>Clostridiaceae</i> (f.), <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillaceae</i> (f.) <i>Lactobacillus</i> , <i>Candidatus Arthomitus</i> , <i>Weisella</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Stapylococcaceae</i> (f.), <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Turicibacter</i> , <i>Methylobacterium</i>	Finger printing: T-RFLP, 16S rRNA qPCR, clonación y Secuenciación de Nueva Generación	Kumar et al. (2018) Lu et al. (2003)
	Cytophaga/ Flexibacter/ Bacteroides/ Bacterias Gram positivas con alto contenido de GC	<i>Bacteroidaceae</i> (f.), <i>Bacteroidetes</i> , <i>Flavibacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i>		
	Protobacteria	<i>Ochrobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Shigella</i>		
	Actinobacteria/ Cyanobacteria	<i>Corynebacterium</i>		
Ciegos (10^{10} – 10^{11} /g)	Archaea Metanogénica (0.81%)	<i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanothermobacter</i> , <i>Methanosphaera</i> , <i>Methanopyrus</i> , <i>Methanothermus</i> , <i>Methanococc</i>	Finger printing: T-RFLP, 16S rRNA qPCR, clonación y Secuenciación de Nueva Generación	Kumar et al., 2018 Lu et al., 2003 Xiao et al., 2017
	Firmicutes/ Bacterias Gram positive bacteria, con baja concentración genómica de GC (44–56%)	<i>Anaerotruncus</i> , <i>Ruminococcaceae</i> (f) <i>Ruminococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridiales</i> (o), <i>Clostridium</i> , <i>Megamonas</i> ,		

		<i>Lactobacillus, Enterococcus, Weisella, Eubacterium, Staphylococcus, Streptococcus,</i>		Saengkerdsub <i>et al.</i> , 2007
	Bacteroides/ Cytophaga/ Flexibacter/ Bacterias Gram positivas con alta concentración de GC (23– 46%)	<i>Rikenellaceae (f), Bacteroidetes, Alistipes, Fusobacterium, Bifidobacterium, Flavibacterium, Odoribacter</i>		
	Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>		
	Proteobacteria (1–16%)	<i>Ochrobaterium, Alcaligenes, Escherichia, Campylobacter</i>		
Intestino grueso	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	16 S rRNA sequencing and cloning	Gong <i>et al.</i> , 2007
	Proteobacteria	<i>Escherichia</i>		

Adaptado de: Shang *et al.*, 2018.

La microbiota del ingluvis, proventrículo y molleja esta dominada por *Lactobacillus*, mientras que en el ambiente hostil del estómago se encuentran especies de los filos Cyanobacteria y Proteobacteria que aun no se caracterizan a detalle (Wang *et al.*, 2016). En el intestino delgado del pollo, la diversidad y abundancia de la microbiota es relativamente baja, aproximadamente 10^5 CFU por gramo de contenido; el filo Firmicutes es el más abundante e incluye bacterias como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto* y géneros pertenecientes a familia *Peptostreptococcaceae* (Rychlik, 2020); también se encuentran *Escherichia coli* o *Helicobacter* del filo Proteobacteria, los cuales se han asociado a un rendimiento bajo del pollo (Kollarcikova *et al.*, 2019).

La microbiota de los ciegos incrementa hasta 10^{10} CFU por gramo digerido y presenta hasta 1,000 especies bacterianas diferentes, principalmente pertenecientes a los filos Firmicutes y Bacteroidetes, cada uno conforma hasta el 45% del total de la microbiota, mientras que los filos Actinobacteria y Proteobacteria representan del 2 – 3%; estos porcentajes pueden variar según

las características individuales de cada estirpe (Oakley *et al.*, 2014; Rychlik, 2020).

Por otro lado, la mayoría de los estudios utilizan muestras fecales para caracterizar la microbiota intestinal; sin embargo, se destacan limitaciones que pueden modificar la microbiota real, por ejemplo, las heces son colectadas del piso, donde se han expuesto al aire y otros contaminantes, afectando a la cantidad de bacterias anaerobias, las cuales son los principales colonizadores colónicos; además, en comparación con el colon humano, el colon de pollo es corto (hasta de 10 cm), y no es posible una retención mayor de heces en este, siendo el tiempo de ingestión – excreción tan sólo de 2 h (Rychlik, 2020).

2.4.4.2 Características de los principales filos asociados a la microbiota intestinal del modelo aviar

El filo Actinobacteria cuyas familias más comunes de este filo son *Coriobacteriaceae* (géneros *Olsenella* y *Collinsella*), y la familia *Bifidobacteriaceae* (género *Bifidobacterium*); son bacterias Gram positivas, anaerobias estrictas, con alto contenido de guanina – citosina, no formadoras de esporas y no móviles (Rychlik, 2020).

El filo Proteobacteria son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, mesófilicas y móviles (Kersters *et al.*, 2006); la presencia de miembros de este filo en el intestino se ha correlacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias en humanos y ratones pero no en aves (Rizzatti *et al.*, 2017) ; en aves se encuentra en gran concentración en ciegos, tanto bacterias facultativas (*E. coli*) y anaerobias estrictas (*Desulfovibrio*, *Sutterrella*, *Parasutterrella*, *Anaerobiospirillum* y *Succinatomona*) (Rychlik, 2020).

El filo Firmicutes incluye a las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Veillonellaceae* y *Erysipelotrichaceae*; son familias anaerobias estrictas, formadora de esporas, con un contenido genómico de GC de hasta 45% (Crhanova *et al.*, 2019). La familia *Ruminococcaceae* agrupa

los géneros *Faecalibacterium*, *Anaerotruncus*, *Butyricoccus*, *Oscillibacter*, *Flavonifractor* y *Pseudoflavinoifractor*, que son bacterias formadoras de esporas, con un contenido genómico de GC de hasta 60%; específicamente, el género *Faecalibacterium* no forma esporas pero ha desarrollado otras formas de adaptarse a su ambiente, tal como consumir oxígeno en bajas concentraciones (Khan *et al.*, 2012). Las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* se caracterizan por ser los productores más importantes de butirato; sin embargo, su sensibilidad ante el oxígeno los hace propensas a desaparecer durante las enfermedades inflamatorias por la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) liberados por los macrófagos y granulocitos, por lo que se ha propuesto que la disminución de estas familias no es la causa de inflamación, sino una consecuencia (Rychlik, 2020).

Los Bacteroidetes incluyen a las familias *Rikenellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* y *Porphyromonadaceae*, las cuales se caracterizan por su capacidad de expresar la enzima epimerasa metilmalonil, mutasa y descarboxilasa, lo que permite producir propionato a partir de succinato (Kubasova *et al.*, 2019).

2.4.4.3 Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota del modelo aviar

El desarrollo de las aves provoca cambios en la composición de la microbiota; en los primeros días de vida de los pollitos, la microbiota proveniente del oviducto de la madre o bien, proveniente del cascarón colonizan el tracto gastrointestinal (Ballou *et al.*, 2016). Una vez eclosionado, el pollito obtiene otros miembros bacterianos a partir del ambiente y equipo de transporte (Roto *et al.*, 2016). Asimismo, la colonización de poblaciones bacterianas se puede ver afectada por la presencia de anticuerpos maternos, los cuales protegen al pollito hasta 2 semanas después de la eclosión (Hamal *et al.*, 2006). La riqueza de la microbiota bacteriana, aumenta conforme avanza la edad de los animales (Ballou *et al.*, 2016; Crhanova *et al.*, 2011).

Los antecedentes genéticos del hospedador también influyen en el establecimiento de la microbiota intestinal; por ejemplo, en el modelo aviar existen dos estirpes importantes: aves ligeras, enfocadas a la producción de huevo para plato y aves pesadas para la producción de carne (Wen *et al.*, 2021). La estirpe ligera llega a pesar hasta 450 g mientras que los pollos de engorde pesan hasta 2,800 g en 6 semanas de edad; estas diferencias provocan diferencias fisiológicas e inmunológicas considerables (Shalev y Pasternak, 1995). La morfología del intestino entre estas dos estirpes difiere en la longitud de las vellosidades y la profundidad de la cripta para lograr estas características, los programas a los que las aves son sometidas afectan la fisiología intestinal y la función inmune (Simon *et al.*, 2014), provocando efectos negativos en el área de absorción (Uni *et al.*, 1996). La microbiota intestinal de diferentes estirpes de pollo de engorde criadas bajo las mismas condiciones ambientales presentan una microbiota del íleon diferente a la edad de 20 días (Kim *et al.*, 2015). Se propone que la diferencia de microbiota entre estirpes se debe a su manada de origen (genética parental) y a las diferentes respuestas inmunes también afectadas por la genética (Emam *et al.*, 2014; Schokker *et al.*, 2015).

El nivel de higiene en los criaderos puede afectar el desarrollo del sistema gastrointestinal y el sistema inmune, además de retrasar la exposición a una microbiota “saludable”; la formación de la microbiota se ve afectada por las fuentes ambientales a las cuales se exponen las aves después de su eclosión, tales como personas, transportes, el primer alimento y agua (Bailey, 2010). Forder *et al.*, (2007) observaron diferencias en la morfología intestinal (vellosidades más pequeñas y reducción de la producción de mucinas) en pollos de engorde criados en aislamiento (Forder *et al.*, 2007).

El tipo de alojamiento; se ha reportado que los animales que viven en el mismo lugar tienden a una menor variación de su microbiota intestinal, fenómeno que se conoce como “efecto de jaula” (Laukens *et al.*, 2016). Además, existen

diferencias en la microbiota de pollos criados en granjas orgánicas en comparación con granjas convencionales, encontrando *C. perfringens* en íleon y colon, aumento de *Lactobacilli* y menor cantidad de *Enterobacteriaceae* en pollos criados en granjas orgánicas (Bjerrum *et al.*, 2006).

La cama, ya sea de aserrín de madera blanda o paja picada, así como su calidad y manejo, influye en las variaciones de la microbiota del pollo; estos animales picotean y se alimentan sobre esta y se ha demostrado que su composición microbiana concuerda con la microbiota de muestras cecales (Mancabelli *et al.*, 2016).

La alimentación a libre demanda estimula el crecimiento y generación de vellosidades y células en criptas, si existe un retraso en la alimentación en polluelos, se puede afectar la superficie intestinal y la microbiota; por otro lado, el retiro temporal del alimento puede ocasionar un aumento de la colonización de patógenos (Kers *et al.*, 2018).

Por último, el clima y localización geográfica pueden provocar estrés por calor, alterando la composición microbiana intestinal principalmente del íleon, provocando una susceptibilidad a *E. coli* y *Salmonella* para colonizar el tracto intestinal; por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar los efectos de la localización geográfica – clima – microbiota intestinal del pollo (Laudadio *et al.*, 2012).

2.4.6 Importancia del modelo aviar en Ciencia y Tecnología de Alimentos

El modelo aviar es un modelo óptimo para estudios fisiológicos, ya que las aves se pueden alojar por grupos abundantes (9 aves/m²) y presentan un comportamiento definido, existen dietas estándares, comerciales y hay numerosas publicaciones que detallan sus constantes fisiológicas. Recientemente, el uso del modelo aviar se ha incrementado en la industria farmacéutica debido a su corto tiempo de crianza, manipulación sencilla y su alta productividad, por lo que este modelo ha sido utilizado para la producción terapéutica de anticuerpos, creación de vacunas y proteínas recombinantes (Nassar, 2018).

En el área de alimentos, este modelo permitirá evaluar la toxicidad, funcionalidad o impacto de nutrientes y aditivos alimenticios sobre la microbiota intestinal (Broderick *et al.*, 2021). Por ejemplo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) utilizó el pollo como modelo para la investigación de efectos secundarios, toxicidad y tolerancia del consumo de plantas genéticamente modificadas (GM) y sus subproductos (European Food Safety Authority, s. f.).

Antes de comercializar un nuevo alimento funcional, es necesario determinar los efectos a corto plazo y la variación de la sensibilidad entre individuos; por ejemplo, los alimentos fortificados con fitoquímicos pueden ser una fuente natural de tóxicos como metales pesados (arsénico, cadmio, plomo) y/o productos oxidados producidos durante el procesamiento y almacenamiento (óxidos de fitoesterol) (Gimenez y Laparra, 2017). Por lo tanto, los estudios con modelos de animales son una herramienta válida para valorar la bioacumulación de componentes o ingredientes de los alimentos, su absorción, distribución, metabolismo y excreción; por ejemplo, en el modelo de pollo se realizó la primera purificación ha sido utilizado para el estudio del metabolismo de la vitamina D para la absorción de calcio y fosforo debido a la

presencia y purificación del receptor citoplasmático intestinal 1,25-(OH)₂D (DeVries y Silvera, 2000).

El uso de animales vertebrados o invertebrados como modelos de experimentación ha aumentado debido a su homología en genes involucrados en el desarrollo, respuesta inmune, cáncer u otros procesos relacionados con el humano (Gosslau, 2016).

La evaluación de cepas probióticas requiere de modelos animales que permitan el análisis de seguridad de consumo y análisis de eficacia (Sorokulova, 2008). Además, es necesario evaluar la dosis y frecuencia de consumo, por lo que debe estudiarse la viabilidad de la bacteria en el sistema gastrointestinal; por otro lado, la evaluación de la influencia del probiótico en el sistema inmune en sistemas *in vivo* (modelos animales) de la influencia del probiótico en el sistema inmune es relevante y más preciso (Pavan et al., 2003). En el caso de animales de granja, los probióticos se utilizan para la prevención de diarrea, mejora de la conversión alimentaria y crecimiento; y de igual forma, su evaluación debe ser extensa, ya que cuando se administra a un animal de granja, este ya es parte de la cadena alimenticia, por lo que también debe ser seguro para los humanos (Gueimonde et al., 2004).

Entre las ventajas que destacan a *G. gallus* como modelo de estudio se encuentra su bajo costo, fácil manipulación, permite tomar muestras de los diferentes sitios intestinales y por ende, se obtiene una mayor significancia estadística para el análisis de la microbiota; asimismo, es posible replicar las condiciones de producción y la promoción de crecimiento industrial (Lin, 2011).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar las poblaciones bacterianas autóctonas asociadas a la mucosa intestinal y su relación en la fisiología del epitelio intestinal en un modelo animal monogástrico *Gallus gallus*.

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer un protocolo de microbiología molecular para la identificación de las poblaciones bacterianas asociadas a la mucosa intestinal en un modelo monogástrico *Gallus gallus*.
2. Establecer un ensayo molecular para cuantificar los niveles de transcripción de los genes *MUC2* (mucina 2), *GLUT2* (transportador de glucosa 2), *SGLT1* (transportador sodio-glucosa 1), *PepT1* (transportador de péptidos 1), *EAAT3* (transportador 3 de aminoácidos excitatorios) y *FABP2* (proteína de unión a ácidos grasos 2) en el epitelio intestinal, responsables de la interacción microbioma-hospedador.
3. Identificar el efecto de los cambios en las poblaciones bacterianas autóctonas asociadas a la mucosa intestinal sobre la transcripción de genes responsables de la interacción microbioma-hospedador.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental

Se utilizó un modelo monogástrico *G. gallus*, estirpe Cobb 500 ($n = 228$; 50% hembras y 50% machos), de 1 día de edad y obtenidos de una incubadora comercial en la zona centro del país. La crianza se llevo a cabo en corrales en piso siguiendo las recomendaciones de las Normas Oficiales Mexicanas y las Guías de Bienestar Animal correspondientes. Se utilizaron seis réplicas, cada una de ellas representada por un corral experimental de 4 m² de superficie y ubicados en una unidad de aislamiento con condiciones de temperatura y humedad relativa óptimas para el desarrollo de las aves. Los muestreos se llevaron a cabo los días 1, 7, 15 y 35 para evaluar la dinámica de la microbita y transcripción genética durante el desarrollo de los animales (Tabla 11). En cada día de muestreo se registró el peso corporal, consumo de alimento e índice de conversión alimenticia. Las aves fueron sacrificadas por el método de dislocación cervical (Anexo 3). Se obtuvieron 48 muestras de mucosa intestinal para la extracción de DNA y 48 muestras para la extracción de RNA; cada muestra estuvo compuesta por un *pool* de mucosa de 5 aves para evitar variaciones entre individuos. Además, se llevaron a cabo 3 repeticiones por región intestinal y día de muestreo.

Tabla 11. División de muestreo

Muestreo	Día posteclosión de sacrificio	No. De muestra
1	Día 1	36
2	Día 7	36
3	Día 15	36
4	Día 35	100
Total de pollos		208

5.2 Bienestar animal, Normas Oficiales Mexicanas y aprobación ética

Todos los experimentos, manejo y nutrición de los animales fueron realizados bajo el cuidado y supervisión de un médico veterinario especialista en producción animal. Se tomaron medidas para asegurar el bienestar animal de acuerdo a las siguientes regulaciones:

- NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.
- NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-060-ZOO-1999, Especificaciones zoonosanitarias para la transformación de despojos animales y su empleo en la alimentación animal.

Asimismo, el presente proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro con el número de oficio CBQ20/053, y por el Consejo de Investigación y Posgrado de la misma facultad y con número de oficio JFQ-OFIC. 99/2020.

5.3 Recepción de aves, lugar y condiciones de mantenimiento

La crianza y toma de muestras se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicadas en el municipio de Colón, Querétaro con clima seco templado. El día 18 de mayo de 2021, se recibió la cantidad de 228 pollitos (50% hembras y 50% machos), los cuales se colocaron en seis corrales previamente montados, cada uno con 38 pollitos, con la misma cantidad de hembras y machos. Se utilizó una campana de gas para obtener una temperatura de 30 – 32 °C del día 1 al día 14 de edad, de 27 °C del día 14 al 21 y

de 24 °C del día 21 al 35. La ventilación de la caseta fue a través de ventiladores y cortinas.

El día de recepción, se mantuvo un periodo de 24 horas de iluminación y a partir del día 1 de vida, la iluminación fue por un periodo de 20 horas. Los corrales contaron con una superficie de 4 m² cada uno, con una densidad inicial de 9 aves/m² y una cama de aserrín con 5 cm de espesor (Choi *et al.*, 2014). Las medidas de instalación de criadero, de limpieza, de bioseguridad, recepción de pollitos y de crianza, tales como densidad, iluminación, ventilación, temperatura y humedad relativa se encuentran descritas en el Anexo 1.

5.4 Alimentación e hidratación

Durante la recepción y acomodo de los pollitos en sus corrales se verificó la toma inmediata de agua. El alimento y agua fueron administrados *ad libitum.*; se utilizaron bebederos de campana, comederos de tolva colgantes con capacidad de 10 kg y se reguló su altura de acuerdo al crecimiento de las aves. Se registró el consumo de alimento y rechazo cada semana.

Durante los primeros 20 días de vida, se proporcionó un alimento de iniciación (24% de proteína) y a partir del día 21 de edad hasta el final del muestreo, las aves consumieron alimento de fase de crecimiento (20% de proteína). El alimento proporcionado fue producido en el INIFAP, sin antibióticos promotores de crecimiento, a base de maíz, en forma de harina y siguiendo las recomendaciones de “National Research Council (U.S.). Committee on Animal Nutrition” (Council *et al.*, 1994).

5.5 Cálculo de parámetros de productividad

Los parámetros de crecimiento fueron calculados con las siguientes fórmulas (Ojediran *et al.*, 2017; Tandoğan y Çiçek, 2016):

$$\text{Ganancia de Peso Promedio/Ave} = \text{Peso promedio final} - \text{Peso promedio inicial}$$

$$\text{Ganancia Media Diaria de Peso} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Edad (días)}}$$

$$\text{Ganancia de peso} = \frac{\text{Ganancia total de peso}}{\text{Peso inicial}}$$

$$\text{Consumo de alimento total} = \text{Alimento disponible} - \text{Rechazo}$$

$$\text{Consumo diario de alimento (g/ave/día)} = \frac{\text{Consumo de alimento acumulado}}{(\text{Número de aves})(\text{Número de días})}$$

$$\text{Índice de conversión alimenticia} = \frac{\text{Consumo de alimento}}{\text{Ganancia de peso}}$$

$$\text{Eficiencia alimentaria} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Consumo total de alimento}}$$

El consumo de alimento total refiere a la cantidad de alimento servido para el total de aves menos el rechazo de alimento calculado en el periodo de tiempo descrito; por otro lado, el índice de conversión alimenticia representa la proporción de alimento que se convierte en carne, es decir, la cantidad de alimento en kilogramos (kg) requerido para obtener 1 kg de peso del ave (Nobo *et al.*, 2012).

5.6 Sacrificio y desecho de restos

El sacrificio se realizó por dislocación cervical de acuerdo con lo descrito por Jones *et al.*, 2013; y se llevó a cabo únicamente por personal capacitado y con previo manejo y experiencia en esta técnica. El anexo 3 describe el correcto agarre de los pollos para no generar estrés y los pasos a seguir para una dislocación cervical exitosa. Los restos biológicos no utilizados para el estudio fueron desechados en una fosa común en las instalaciones de INIFAP.

5.7 Muestreo de la mucosa intestinal

Todas las muestras fueron colectadas en el área de necropsias de la granja experimental. En los días de muestreo 1, 7, 15 y 35 se colectaron de 5 a 6 aves al azar por réplica para un total de 32 aves por día de muestreo ($n = 32$), de las cuales 16 aves fueron destinadas a la toma de contenido y mucosa intestinal para extracción de DNA genómico y otras 16 aves para la toma de mucosa intestinal para extracción de RNA total.

Después del sacrificio por dislocación cervical, se procedió a la apertura torácica para remoción de vísceras e identificación de las regiones intestinales de interés. Las muestras de contenido y mucosa se colectaron en el primer tercio proximal del duodeno, yeyuno e íleon. Para los ciegos, las muestras se colectaron a partir de un saco (Figura 10).

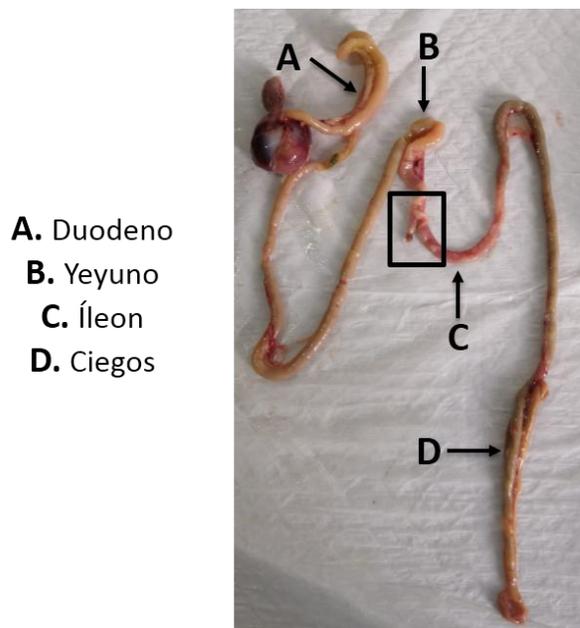


Figura 10. Identificación de regiones intestinales para toma de muestras.

Una vez identificadas las secciones, en las aves para la extracción de DNA, se tomaron dos trozos de cada región, uno para obtener el contenido luminal y otro para la obtención de la mucosa intestinal. Para esta última, se realizó un corte

longitudinal y se procedió a dos lavados con solución salina estéril (SSE) para remover completamente la materia orgánica y, mediante un cepillo citológico estéril, se realizó un barrido de la microbiota asociada a la mucosa intestinal (Figura 11).



Figura 11. Toma de mucosa intestinal para extracción de DNA.

Las secciones intestinales para la extracción de RNA, también fueron sometidas a dos lavados con SSE para la remoción de contenido luminal; sin embargo, la mucosa intestinal se obtuvo mediante el raspado con un portaobjeto de vidrio estéril.

Todas las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf estériles previamente rotulados e inmediatamente almacenadas en hielo seco (-70°C) para su conservación hasta su congelación en laboratorio. Específicamente, las muestras de mucosa intestinal para extracción de RNA total se colectaron en 500 μ L de DNA/RNA Shield para la conservación íntegra del RNA.

5.8 Determinación de la diversidad microbiana

5.8.1 Extracción y evaluación de la calidad del DNA genómico

La extracción de DNA genómico de las muestras de contenido y mucosa intestinal se llevó a cabo a través del kit ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep (Catálogo R2002) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones.

Se colectaron 250 uL de mucosa o contenido intestinal y se colocó en un tubo de lisis (ZR Bashing Bead Lysis Tubes) conteniendo 750 uL de DNA/RNA Shield y se homogenizó la muestra en un MO BIO PowerLyser 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer a 4,000 rpm durante 45 segundos. Posteriormente, se centrifugó el ZR Bashing Bead Lysis Tubes a 11,000 RPM durante 1 minuto, se transfirió 400 uL del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se añadió 400 uL de DNA/RNA Lysis Buffer. Se sometió a vórtex y se transfirió la muestra (800 uL) a la columna Spin Away Filter en un tubo de colección y se centrifugó a 11,000 RPM por 30 segundos.

Se transfirió la columna Spin Away Filter a un nuevo tubo de colección y se añadió 400 uL de DNA/RNA Prep Buffer. Se centrifugó la muestra a 11,000 rpm por 30 segundos y se desechó el fluido. Posteriormente, se añadió 700 uL de DNA/RNA Wash Buffer y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos y se desechó el fluido. Se añadió 400 uL de DNA/RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 11,000 rpm por 2 minutos y se desechó el fluido. Se transfirió la columna Spin Away Filter a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se añadió a la columna 100 uL DNase/RNase Free Water directamente a la columna, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos para eluir el DNA de cada columna. Se preparó la columna Zymo Spin III-HRC Filter colocándola en un nuevo tubo de colección, agregándole 600 uL de ZymoBIOMICS HRC Prep Solution y centrifugándola a 10,000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el DNA eluido (100 uL) a la Zymo Spin III HRC Filter en un nuevo tubo Eppendorf estéril y se

centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Se almacenó el DNA inmediatamente a -20°C.

5.8.2 Cuantificación de DNA genómico

Se cuantificó y evaluó la pureza del DNA eluido con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Solo se utilizaron las extracciones que alcanzaron una concentración mínima de 5 mg/dL de DNA y una pureza de entre 1.8 – 2.0.

5.8.3 Secuenciación masiva en paralelo del gen *16S rRNA*

Para obtener la diversidad biológica presente en las muestras de la mucosa intestinal, el DNA obtenido fue utilizado para la secuenciación metagenómica de las poblaciones bacterianas a través de la amplificación masiva de la región hipervariable V3-V4 del gen *16S rRNA*, utilizando un secuenciador Illumina MiSeq (San Diego, CA). Esta tecnología fue realizada por la empresa Zymo Research Corp. (Irvine, CA).

5.8.4 Análisis bioinformático: asignación taxonómica, selección de genes homólogos implicados en la absorción de nutrientes y evaluación de iniciadores

Se infirieron secuencias de amplicones únicas a partir de lecturas sin procesar, también se eliminaron las secuencias quiméricas utilizando el pipeline *Dada2* (Callahan *et al.*, 2016). La asignación taxonómica se realizó utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1 y la taxonomía se asignó con la base de datos de Zymo Research, una base de datos del gen *16S rRNA* que está diseñada y curada internamente, como referencia.

Para la selección de genes de funcionalidad del enterocito, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura y se proponen transportadores asociados a la función de absorción debido a su importancia para el crecimiento y productividad de las aves. Posteriormente se identificó la presencia de genes homólogos en el genoma del modelo *G. gallus*, obteniendo la anotación genética, la proteína que codifica y su

dominio principal. Se evaluó la similitud entre secuencias proteicas candidatas en los modelos experimentales *G. gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio* y como secuencias de referencia se utilizaron las de *Homo sapiens*, todas anotadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Después, se buscó la secuencia de referencia de *Homo sapiens* en el genoma de los modelos animales mediante la herramienta de NCBI, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Las secuencias con mayor porcentaje de identidad y de cobertura fueron seleccionadas como secuencias candidatas.

Por último, se para la anotación genética se utilizó la herramienta bioinformática *Pfam*, la cual es una base de datos de familias proteicas que permite la identificación del dominio conservado específico encargado de describir la funcionalidad característica de la proteína de interés (Finn *et al.*, 2014). Asimismo, se buscaron los genes de interés en la base de datos de Chickspres (disponible en <https://geneatlas.arl.arizona.edu/>, fecha de visita: febrero 2021), el cual es un recurso donde se anotan, a partir de artículos científicos, la expresión de genes en distintos tejidos del pollo; nos permite buscar rápidamente, visualizar y descargar secuencias de genes de acuerdo al tejido o etapa de desarrollo (McCarthy *et al.*, 2019). Además, se buscaron referencias en la literatura para sustentar y reportar los distintos tejidos donde se pueden expresar estas proteínas.

Los iniciadores seleccionados fueron identificados en las secuencias del mRNA obtenida de la base de datos del NCBI, mediante el programa de visualización y alineación MEGA X. Al corroborar su alineación y presencia en la secuencia, se llevó a cabo un análisis bioinformático final mediante las herramientas PrimerBLAST e *in silico* PCR para identificar los exones donde transcriben.

5.9 Cuantificación de expresión de genes en la mucosa intestinal

5.9.1 Extracción y purificación de RNA total

La obtención y purificación del RNA se llevó a cabo mediante el kit ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep (catálogo R2002), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con anterioridad a la extracción de RNA, fue necesario realizar un tratamiento con DNasa en la columna de filtración para asegurar la elusión exclusiva de RNA total.

Para matrices sólidas (heces, sólidos, suelos, raíces) o tejidos animales se emplearon 250 mg (0.250 g) de tejido y para muestras líquidas se emplean 250 uL. Se pesó la muestra y se añadió al tubo de lisis (ZR Bashing Bead Lysis Tubes) previamente rotulado, se adicionaron 750 uL de DNA/RNA Shield y se homogenizó la muestra en un "Bead Beater" a 4,000 RPM durante 45 segundos. Posteriormente, se centrifugó el ZR Bashing Bead Lysis Tubes a 11,000 rpm durante 1 minuto, se transfirió 400 uL del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se añadió 400 uL de DNA/RNA Lysis Buffer. Se sometió a vórtex y se transfirió la muestra (800 uL) a la columna Spin Away Filter en un tubo de colección y se centrifugó a 11,000 RPM por 30 segundos. Se añadió 800 uL de etanol (95 – 100%) al fluido sobrenadante presente en el tubo de colección (<https://www.zymoresearch.com/products/zymbiomics-dna-rna-miniprep-kit>).

Se realizó un tratamiento de la columna Zymo-Spin™ IIICG, lavando la columna con 400 uL del reactivo DNA/RNA Wash Buffer y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos y se desechó el fluido del tubo de colección. Después, se agregó directamente sobre la columna 80 uL de DNase I Reaction Mix (5 uL de DNase I + 75 uL DNA Digestion Buffer) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se agregó los 800 uL de la mezcla del fluido sobrenadante con etanol a la columna Zymo-Spin™ IIICG preparada y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos. Se desechó el fluido.

Se transfirió la columna Zymo-Spin™ IIICG a un nuevo tubo de colección y se añadió 400 uL de DNA/RNA Prep Buffer. Se centrifugó la muestra a 11,000 rpm por 30 segundos y se desechó el fluido. Posteriormente, se añadió 700 uL de DNA/RNA Wash Buffer y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos y se desechó el fluido. Se añadió 400 uL de DNA/RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 11,000 rpm por 2 minutos y se desechó el fluido. Se transfirió la columna Zymo-Spin™ IIICG a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se añadió a la columna 100 uL DNase/RNase Free Water directamente a la columna, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 segundos para eluir el DNA de cada columna. Se preparó la columna Zymo Spin III-HRC Filter colocándola en un nuevo tubo de colección, agregándole 600 uL de ZymoBIOMICS HRC Prep Solution y centrifugándola a 10,000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el DNA eluido (100 uL) a la Zymo Spin III HRC Filter en un nuevo tubo Eppendorf estéril y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Se almacenó el RNA inmediatamente a -20°C.

5.9.2 Cuantificación de RNA total

Se cuantificó y evaluó la pureza del RNA total eluido con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Se espera una concentración mínima de 200 ng/μL de RNA y una pureza de entre 1.8 – 2.0.

5.9.3 Limpieza de RNA total y evaluación de integridad

Para evaluar la transcripción de los genes involucrados en la función del epitelio intestinal, es necesaria la formación de DNA complementario (cDNA) a partir del RNA total extraído; sin embargo, se debe llevar a cabo un proceso de purificación y limpieza del RNA con el fin de remover DNA contaminante y otros cationes divalentes. Por lo tanto, se utilizó el kit TURBO DNA *free* de Invitrogen® de acuerdo a las especificaciones del fabricante para un tratamiento riguroso y con una dilución previa para obtener una concentración final de 200 μl/ng en cada muestra. Se añadió 5 μL de 10X TURBO DNase Buffer a cada muestra, seguido de 0.75 μL de

TURBO DNase Enzyme y se incubó a 37 °C/30min en termociclador. Se repitió la administración de 0.75 µL de TURBO DNase Enzyme y la incubación a 37 °C/30min en termociclador; después, se añadió 10 µL de DNase Inactivation Reagent, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos agitando 2 – 3 veces durante este tiempo y se centrifugó a 10, 000 RFC/1.5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril.

5.9.4 Evaluación de integridad del RNA total con tratamiento TURBO DNA free

La evaluación de la integridad de las muestras de RNA total se llevó a cabo mediante un gel de electroforesis con el protocolo descrito por Aranda *et al.*, (2012), quienes utilizan hipoclorito de sodio como compuesto desnaturizante de las estructuras secundarias del RNA. El gel de agarosa se preparó al 1% con 100 µL de hipoclorito de sodio al 6% por cada 0.1 g de agarosa. En cada pozo se colocó 5 µL de muestra para una concentración de 1,000 ng/µL de RNA total. El RNA íntegro presenta bandas visibles y claras de los genes *28S rRNA* (4.8kb) y *18S rRNA* (2.0kb).

5.9.5 Cuantificación de la transcripción de genes por RT-qPCR

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit de transcripción reversa de alta capacidad Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Catálogo: #K1621) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se usaron 2,200 ng de template de RNA (11 µL del RNA con tratamiento TURBO DNA free a una concentración de 200 ng/µL), se añadió a cada muestra 1 µL de oligo (dT)18 primer, 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de RiboLock Rnase Inhibitor, 2 µL de 10mM dNTP Mix y 1 µL Revert Aid MMuLV RT, para obtener un volumen final de 20 µL. Se procedió a la incubación en termociclador a 42 °C/60 min, y una última incubación a 70 °C/5 min. Los 20 µL de cDNA resultantes tuvieron una concentración final de 110 ng/µl. Se contemplaron

dos controles negativos, uno con template de RNA sin enzima transcriptasa y otro con todos los reactivos sin template de RNA.

Para la PCR de amplificación control, usamos una dilución 1:500 (3 μ L de cDNA con 1497 μ L de agua libre de nucleasas) para llevar a cabo el protocolo con la enzima polimerasa Phire Hot Start II de Thermo Scientific™ y obtener un volumen final de 17 μ L; se usaron los iniciadores del gen de referencia gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) del modelo *G. gallus*. El protocolo de PCR fue el reportado por Gilbert et al., 2007, con los siguientes ciclos: 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y 1 ciclo final de 73 °C por 10 minutos. Después, se realizó un gel de electroforesis al 2% y se identificó el gen *GAPDH* con un peso molecular esperado de 73 pb.

La construcción de las curvas estándar para la cuantificación relativa se llevó a cabo con muestras de cDNA de pruebas piloto a una concentración original de 110 ng/ μ L. Se realizaron 8 diluciones quíntuples seriadas del cDNA utilizando agua libre de nucleasas como diluyente; la concentración de la muestra original fue de 110ng/ μ L, la primera dilución tuvo una concentración de 22 ng/ μ L de cDNA en un volumen de 150 μ L y la última dilución fue de 0.042 ng/ μ L. Cada reacción de 17 μ L de qPCR contenía: 5 μ L de Takara SYBR® Premix Ex Taq™, 0.68 μ M de los iniciadores *forward* y *reverse* (Tabla 12), 8.64 μ L de agua grado PCR y 2 μ L de cDNA (diluciones 1:5). Las reacciones se realizaron por duplicado en el termociclador CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) con las siguientes condiciones: 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 54 °C para los genes *GADPH* y *MUC2* y 60 °C para genes restantes por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos, 72 °C por 5 minutos y una curva de disociación de 50 – 95 °C por 0.05 segundos.

Se realizó una cuantificación relativa al gen Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*) para medir la expresión de transportadores de glucosa (*GLUT2* y *SGLT1*), di y tri péptidos (*PepT1*), aminoácidos excitatorios como

glutamato (*EAAT3*), ácidos grasos de cadena corta (*FAPB2*) y la secreción de mucinas mediante la expresión de *MUC2*. Se pretende establecer patrones de expresión a lo largo del intestino delgado y ciegos.

Tabla 12. Función molecular de proteínas intestinales y secuencias de iniciadores usados para RT-qPCR

Gen	Nombre	Función en la mucosa intestinal	Secuencia de iniciadores (forward/reverse)	Tamaño de amplicon	Referencia
<i>MUC2</i>	Mucina 2	Formadora de gel de moco	F: GCTGATTGTCACACTCAGCCTT R: ATCTGCCTGAATCACAGGTGC	442	Paraskeuas <i>et al.</i> , 2019
<i>GLUT 2</i>	Transportador de glucosa 2	Na(+)/cotransportador de glucosa en el intestino delgado	F: CACACTATGGGCGCATGCT R: ATTGTCCCTGGAGGTGTTGGTG	68	Gilbert <i>et al.</i> , 2007
<i>SGLT1</i>	Transportador de sodio-glucosa 1	Transporta bajas concentraciones de D-glucosa	F: GCCGTGGCCAGGGCTTA R: CAATAACCTGATCTGTGCACCAGTA	71	Gilbert <i>et al.</i> , 2007
<i>PepT1</i>	Transportador de péptidos 1	Transporta dipéptidos y tripéptidos	F: CCCCTGAGGAGGATCACTGTT R: CAAAAGAGCAGCAGCAACGA	66	Gilbert <i>et al.</i> , 2007
<i>EAAT3</i>	Transportador excitatorio de aminoácidos 3	Transporta aspartato, glutamato y cisteína	F: TGCTGCTTTGGATTCCAGTGT R: AGCAATGACTGTAGTGCAGAAGTAATATATG	79	Gilbert <i>et al.</i> , 2007
<i>FAPB2</i>	Proteína de unión a ácidos grasos 2	Transporte de Ácidos Grasos de Cadena Larga y triglicéridos	F: AAAGATAATGGAAAAGTACTCACAGCAT R: CCTTCGTACACGTAGGTCTGTATGA	77	Chen <i>et al.</i> , 2015
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	Gen de referencia (housekeeping gene)	F: GCCGTCCTCTCTGGCAAAG R: TGTAACCATGTAGTTCA	73	Gilbert <i>et al.</i> , 2007

5.10 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de ANOVA y posthoc Tukey utilizando el paquete estadístico StatView (Sidel, 1986). Se consideraron diferencias significativas cuando un valor de $p \geq 0.05$ (Oliveira et al., 2013). Todos los datos fueron expresados como las medias \pm el error estándar (SE).

Para los análisis de correlación, se utilizó la prueba de Pearson con el paquete estadístico de PAST. Únicamente se consideraron coeficientes con $R^2 \geq 0.6$ para correlaciones positivas y $R^2 \leq -0.6$ para correlaciones negativas. En el entendido que $R^2 = 0$ significa una correlación nula y $R^2 = +1$ o -1 es una correlación perfecta, se utilizaron los siguientes rangos de clasificación para la fuerza de correlación: moderada a fuerte cuando $R^2 0.6 \geq 0.79$ o $-0.6 \leq -0.79$, y correlación fuerte a muy fuerte cuando $R^2 0.8 \geq 1$ o $R^2 -0.8 \leq -1$ (Akoglu, 2018).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue establecer un modelo animal que permita estudiar la biología de la mucosa intestinal y las interacciones microbiota – hospedador. Para cumplir con esta meta se realizaron análisis bioinformáticos para la identificación de genes homólogos implicados en la absorción de nutrientes; de la microbiota asociada a la mucosa intestinal; de transcripción de genes del enterocito y de correlación entre poblaciones bacterianas y transcripción genética.

6.1 Genes homólogos implicados en la absorción de nutrientes, anotación genética, evidencia de expresión en el modelo *G. gallus*

Después de una búsqueda exhaustiva en la literatura, se proponen los principales transportadores asociados a la absorción de hidratos de carbono (SGLT1 y GLUT2), absorción de pequeños péptidos (PepT1), absorción de aminoácidos excitatorios como glutamato (EAAT3) y de ácidos grasos libres (FABP2) para evaluar la funcionalidad del enterocito (Figura 12); estos transportadores han sido estudiados y establecidos previamente en mamíferos y aves (Garriga *et al.*, 1999; Pinca *et al.*, 2019).

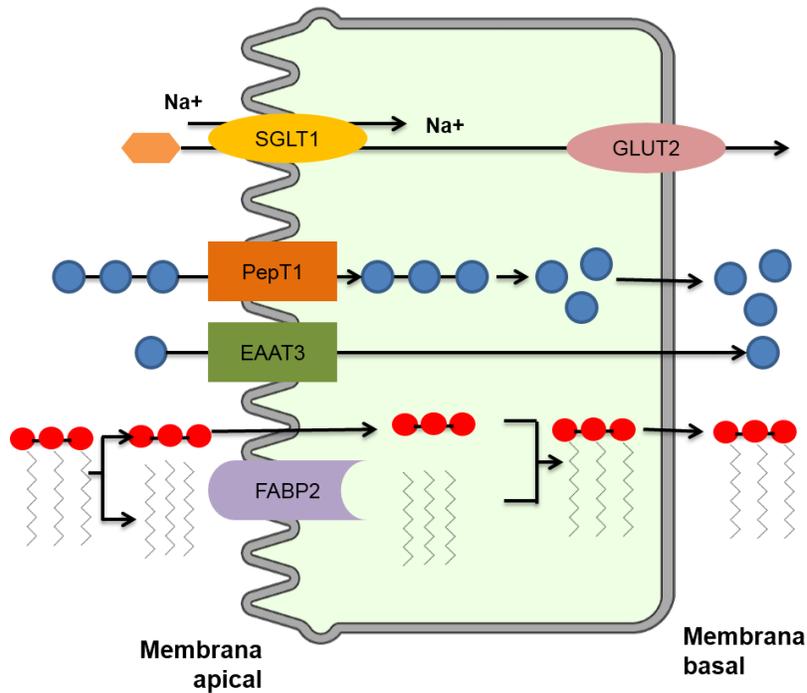


Figura 12. Representación de proteínas transportadoras expresadas en el enterocito.

Los genes seleccionados han sido estudiados y validados en distintos modelos animales (Cedernaes *et al.*, 2011); la alineación entre sus secuencias proteicas muestra una homología entre 60% y 90% con respecto a las proteínas encontradas en el humano (Tabla 13). La cercanía entre porcentajes nos indica que estos mecanismos moleculares están conservados en el modelo aviar. Específicamente para este modelo, definimos un rango de porcentaje de identidad entre 65 - 85%, lo que sustenta la presencia de genes homólogos en el genoma de este modelo.

Tabla 13. Niveles de homología entre especies

Modelo animal	<i>SLC5A1</i> (SGLT1)	<i>SLC2A2</i> (GLUT2)	<i>SLC2A5</i> (GLUT5)	<i>SLC15A1</i> (PepT1)	<i>SLC1A1</i> (EAAT3)	<i>FABP2</i>
 <i>Homo Sapiens</i> (referencia)	100%	100%	100%	100%	100%	100%
 <i>Mus musculus</i>	80.93%	81.87%	82.67%	85.05%	90.08%	78.03%
 <i>Rattus norvegicus</i>	80.62%	82.06%	81.31%	84.08%	91.03%	81.82%
 <i>Gallus gallus</i>	79.81%	64.52%	65.06%	65.35%	83.68%	70.45%
 <i>Danio rerio</i>	75.85%	58.17%	68.65%	60.46%	73.3%	67.94%

Se obtuvo anotación genética, la proteína que codifica y su dominio principal, lo que permitió llevar a cabo una predicción certera y necesaria para estudios de genómica comparativa (Tabla 14) (Nava *et al.*, 2009). La herramienta bioinformática *Pfam* identificó dominios relacionados con la función esperada en *Homo sapiens*, por lo que estructuralmente, el modelo *G. gallus* presenta dominios del humano, lo que aporta sustento a estas proteínas para ser utilizados en estudios con este modelo.

Tabla 14. Anotación genética y dominios conservados en las secuencias de aminoácidos de *G. gallus*

Símbolo gen/proteína	Función	No. Acceso Protein NCBI	Dominio Pfam	No. Acceso Pfam/Descripción
<i>Slc2a2/</i> GLUT2	Transporte de glucosa, fructosa y galactosa del citosol hacia circulación portal.	NP_997061.1	Sugar tr	PF00083/ Sugar (or other) transporter
<i>Slc5a1/</i> SGLT1	Transporte de glucosa del lumen hacia dentro del enterocito	NP_001280169.1	SSF	PF00474/ Sodium:solute symporter family
<i>Slc15a1/Pe</i> pT1	Transporta di y tripéptidos.	NP_989696.1	PTR2	PF00854/ Proton-dependent oligopeptide transporter
<i>Slc1a1/</i> EAAT3	Afinidad a aminoácidos aniónicos (aspartato y glutamato)	XP_424930.4	SDF	PF00375/ Sodium:dicarboxylate symporter family
<i>FABP2</i>	Transporta Ác. Grasos de Cadena Larga y triglicéridos. Su reducción se ha correlacionado con la pérdida de función barrera.	NP_001007924.1	Lipocalin	PF00061/ Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family

En la base de datos Chickspress hay evidencia de estudios transcriptómicos donde se ha reportado la presencia del mRNA de los genes propuestos. Además, se buscaron referencias en la literatura para sustentar y reportar los distintos tejidos donde se pueden expresar estas proteínas (Tabla 15).

Tabla 15. Evidencia de expresión de RNA

Gen/ Proteína	Chickspress (Presencia/Ausencia)	Referencia	Tejidos donde se expresan
<i>Slc2a2/</i> GLUT2	Presente	Byers et al., 2017; Byers et al., 2018	Hígado, páncreas, intestino delgado y riñones
<i>Slc5a1/</i> SGLT1	Presente	Ferrer et al., 1994; Zhang et al., 2019	Intestino delgado (duodeno y yeyuno) y ciegos
<i>Slc15a1/</i> PepT1	Presente	Zwarycz y Wong, 2013; Hussar et al.,2017	Intestino delgado (parte proximal), riñón e hígado.
<i>Slc1a1/</i> EAAT3	Presente	Weintraut et al., 2016; Kaminski y Wong, 2018	Intestino delgado
<i>FABP2</i>	Presente	Hughes y Piontkivska, 2011; Chen et al., 2015	Intestino delgado

Esta evidencia sugiere que las rutas moleculares de absorción de interés están presentes en *G. gallus*, pero es necesario demostrar su transcripción en la mucosa y evaluar su dinámica transcriptómica a través del desarrollo del ave y en diferentes regiones del intestino delgado.

6.1.1 Selección y evaluación bioinformática de iniciadores

Después de una búsqueda exhaustiva en la literatura, se eligieron iniciadores que estuviesen previamente validados y ampliamente utilizados en otras referencias (Tabla 16); únicamente se necesitó una ambigüedad para el iniciador forward del gen *slc5a1*.

Tabla 16. Secuencias de iniciadores seleccionados

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicon (pb)	Referencia
<i>Slc5a1/SGLT1</i>	Sodium-glucose linked transporter 1	F: CCGTGGCCAGGGCTTA	71	Gilbert et al., 2007
		R: CAATAACCTGATCTGTGCACCAGTA		
<i>Slc2a2/GLUT2</i>	Glucose transporter 2	F: CACACTATGGGCGCATGCT	68	Gilbert et al., 2007
		R: ATTGTCCCTGGAGGTGTTGGTG		
<i>Slc15a1/PepT1</i>	Peptide transporter 1	F: CCCCTGAGGAGGATCACTGTT	66	Gilbert et al., 2007
		R: CAAAAGAGCAGCAGCAACGA		
<i>Slc1a1/EAAT3</i>	Excitatory amino acid transporter 3	F: TGCTGCTTTGGATTCCAGTGT	79	Gilbert et al., 2007
		R: AGCAATGACTGTAGTGCAGAAGTAATATATG		
<i>FABP2</i>	Fatty acid binding protein 2	F: AAAGATAATGGAAAAGTACTCACAGCAT	77	Chen et al., 2015
		R: CCTTCGTACACGTAGGTCTGTATGA		
<i>GAPDH</i>	D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: GCCGTCCTCTCTGGCAAAG	73	Gilbert et al., 2007
		R: TGTAACCATGTAGTTCA		

6.2 Productividad y mortalidad

Se realizó un pesaje de todas las aves antes de su sacrificio en cada día de muestreo (1, 7, 15 y 30) y se registró el consumo de alimento total (Tabla 17).

Tabla 17. Rendimiento de crecimiento en los diferentes días de muestreo.

Edad inicial (días)	Edad final (días)	No. días	No. aves	Peso promedio inicial/ave (g)	Peso promedio final/ave (g)	Ganancia promedio total de peso/ave (g)	Ganancia diaria de peso/ave (g)	Consumo de alimento total (g)	Consumo diario de alimento/ave (g)	Conversión alimenticia
1	7	6	189	42.23	130.11	87.88	14.65	19,800	17.46	1.19
7	15	8	150	130.11	404.66	274.55	34.32	75,000	62.5	1.82
15	35	20	107	404.66	2,003.18	1,598.52	79.92	83,190	155.50	1.51

En el presente estudio, el peso promedio final por ave al día 1, 7, 15 y 35 de edad fue de 42 g, 130 g, 404 g y 2000 g, respectivamente; y al final del estudio, el índice de conversión alimenticia fue de 1.51. El manual de Cobb-Vantress (2018) menciona que los pesos promedio para las edades evaluadas en el presente estudio son los siguientes: al día 1, 63 g; día 7, 193 g; día 15, 589 g y día 35, 2273 g. Además, reporta que el índice de conversión alimenticia acumulada ideal es de 1.5 con un consumo de alimento acumulado de 3.39 kg al día 35 de edad. Sin embargo, este mismo manual destaca que el desempeño de pollos de engorde varía de un país a otro. Además del genotipo, los factores ambientales de producción influyen en el crecimiento y bienestar de las aves; un buen manejo de los sistemas de producción de las aves permitirá la expresión total de su potencial genético y por lo tanto, una mayor productividad en un periodo corto de tiempo (Baracho *et al.*, 2019).

En México, Ayala Lopez, 2020 estudió el efecto de programas de alimentación con distintos periodos de restricción alimenticia en dos estirpes de pollos de engorde y evaluó los parámetros zootécnicos. Las condiciones de crianza y alimentación fueron similares al presente estudio; ofreció alimento de iniciación del día 1 al 21 y de crecimiento del día 22 al 35, en una presentación física de harina. Respecto al peso vivo para la estirpe Cobb500 en el grupo control

(alimentación *ad libitum*), Ayala López obtuvo resultados similares a los observados en el presente trabajo respecto al peso vivo para el grupo control de la estirpe Cobb 500, reportando un peso inicial de 43 g; 149 g al día 7; 451 g al día 14; y 2,049 g al día 35. Asimismo, reporta un índice de conversión alimenticia de 1.62 al día 35, mientras que en el presente estudio se obtuvo un índice de conversión alimenticio de 1.51 en ese mismo día (Ayala López, 2020).

6.2.1 Mortalidad

Los porcentajes de mortalidad aumentaron conforme a la edad y la mortalidad general acumulada durante el ciclo productivo fue de 5.7% (Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje de mortalidad

Día	No. Aves inicial	Mortalidad (No. Aves)	Aves sacrificadas para muestreo	No. Aves. final	Mortalidad (%)
0	228	1	0	227	0.44
1	227	2	36	189	0.88
7	189	3	36	150	1.59
15	150	3	36	111	2
35	111	4	68	39	3.60
TOTAL		13			5.70

Las causas de muerte identificadas fueron síndrome ascítico y problemas en el sistema locomotor.

6.3 Identificación de las poblaciones bacterianas asociadas a la mucosa intestinal en un modelo monogástrico *Gallus gallus*.

La secuenciación masiva del gen *16S rRNA* (V3-V4) mediante la tecnología Illumina MiSeq produjo un total de 1, 879,350 secuencias agrupadas en 1,464 *Amplicon Sequence Variants* (ASVs); la cantidad de filos y familias detectadas fue dependiente de la región intestinal analizada (Tabla 19).

Tabla 19. Número total de secuencias, filos y familias en intestino delgado y ciegos.

Región intestinal	Número de secuencias	Filos	Familias
Duodeno	426,790	4	15
Yeyuno	467,795	4	13
Íleon	449,721	2	9
Ciegos	535,044	5	17

Actualmente, esta tecnología es la más utilizada para el estudio de la microbiota ya que existen diversas plataformas bioinformáticas que permiten una clasificación taxonómica precisa (Cao *et al.*, 2017; Sm *et al.*, 2015). Debido a que la agrupación a nivel de familia involucra un menor margen de error en la clasificación por las herramientas bioinformáticas, el presente trabajo describe la microbiota intestinal del modelo *G. gallus* a este nivel taxonómico (Ngunjiri *et al.*, 2019; Sekirov *et al.*, 2010).

Respecto a la diversidad alfa, las curvas de rarefacción con el índice de *chao1* demuestran que la cantidad de muestras analizadas fue suficiente para la descripción del total de la microbiota de la mucosa intestinal en todas las regiones y días analizados. Asimismo, se observa que la diversidad aumenta conforme avanza la edad del ave; al día 35 se observó la mayor diversidad en todas las regiones intestinales (Figura 13). En el íleon se observa un patrón distinto a las demás secciones, ya que la diversidad disminuye considerablemente del día 1 al día 7, sin embargo, para el día 15 sucede un aumento exponencial en la diversidad.

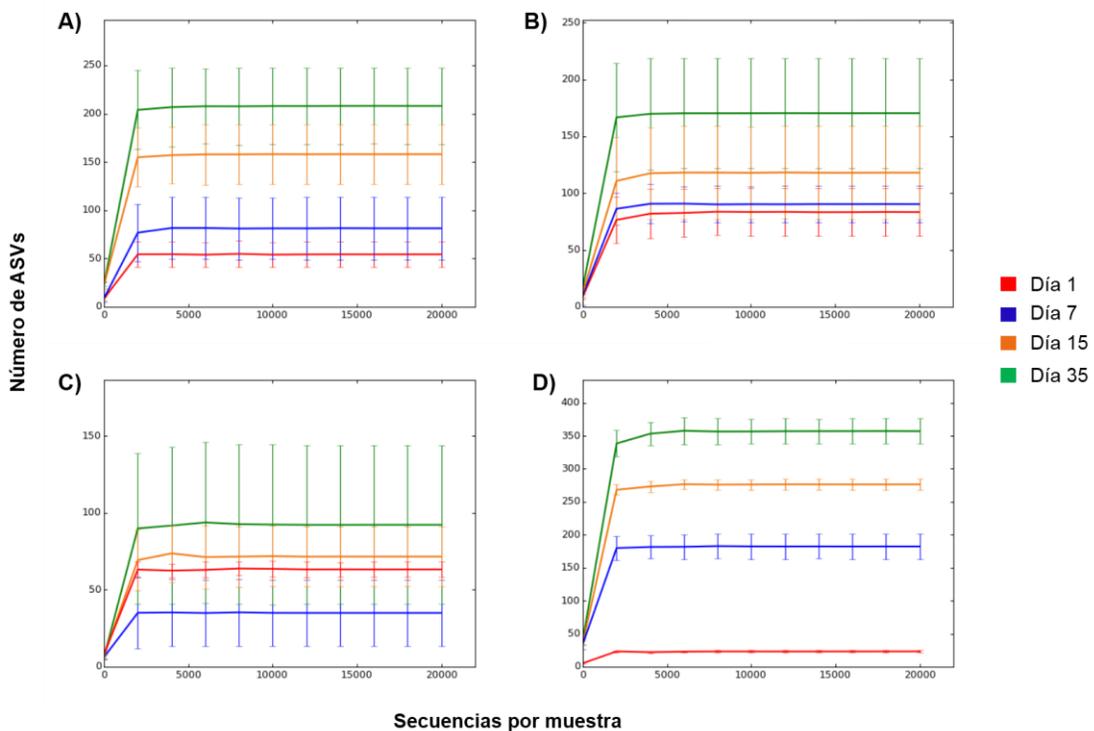


Figura 13. Curvas de rarefacción de la diversidad alfa (*chao1*) con respecto a la acumulación de secuencias en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos a los diferentes días de muestreo.

También se analizaron las medias de abundancia de ASVs en cada segmento intestinal en los distintos días de muestreo (Figura 14). El análisis del gen *16S rRNA* por el método de ASVs infiere la secuencia biológica exacta en la muestra antes de la amplificación y determinación de secuencias erróneas; distingue variaciones en la secuencia si difieren por 1 nucleótido, lo que

permite una mayor precisión al 97% de identidad entre secuencias utilizado en el método de asignación por *Operational Taxonomic Unit* (OTU) (Chiarello *et al.*, 2022).

En duodeno, la abundancia inicial al día 1 tuvo un cambio significativo hasta el día 15, aumentando de 54 a 158 ASVs ($p=0.038$); sin embargo, no se observa un aumento significativo entre el día 15 y 35. En yeyuno e íleon, se aprecia un aumento estable y no significativo entre todos los días de muestreo. Lo contrario sucede en ciegos, donde cada día de muestreo se observa un aumento representativo de ASVs (d1 = 23 ASVs, d7 = 182 ASVs, d15 = 276 ASVs y d35 = 357 ASVs; $p= 0.002$).

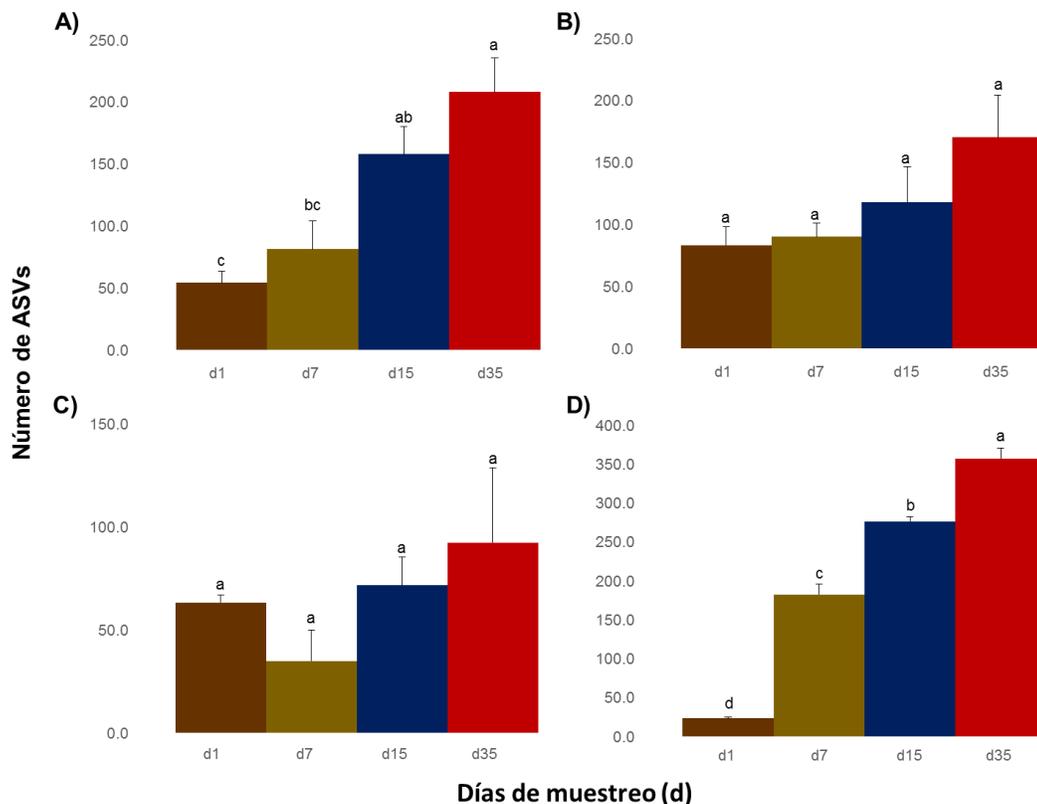


Figura 14. Comparación de medias de ASVs en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos a los días (d) 1, 7, 15 y 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey (nivel de significancia a 0.05).

De igual forma, Ranjitkar *et al.*, 2016, reportan que la diversidad alfa aumenta conforme a la edad de las aves. Asimismo, un número menor de ASVs en el intestino delgado puede deberse al rápido tránsito intestinal de las aves cuyo tiempo promedio es de 2.5h, ya que un periodo corto de retención permite la adherencia de una cantidad menor de bacterias, además de provocar una selectividad en la diversidad de microorganismos (Pan y Yu, 2014). El duodeno se caracteriza por presentar la menor riqueza bacteriana debido al limitado tiempo de exposición al tránsito intestinal y a la dilución de la digesta por los ácidos biliares (Shang *et al.*, 2018). Por otro lado, los sacos ciegos presentan una mayor riqueza microbiana, ya que además de ser el principal sitio de fermentación, la digesta puede durar en estos de 12 – 20 horas (Sergeant *et al.*, 2014).

Hasta este momento, existe limitada evidencia de la microbiota en el intestino delgado, a pesar de que el proceso de absorción sucede en esta región y su microbiota podría afectar el rendimiento de las aves; sin embargo, se ha observado que la microbiota del intestino delgado tiende a ser similar en duodeno, yeyuno e íleon, presentando una diversidad pobre y la presencia únicamente de hasta 5 filos bacterianos (Kollarcikova *et al.*, 2019). En el presente trabajo, se observa una diversidad limitada a 6 filos bacterianos, siendo los ciegos la región con mayor diversidad.

En cuanto a la composición a nivel taxonómico de filo, en el presente estudio predominaron cinco filos bacterianos a través del intestino delgado y ciegos, siendo Firmicutes y Proteobacteria los más abundantes (Figura 15); específicamente, Proteobacteria tuvo una mayor abundancia al día 1 en el intestino delgado y ciegos, disminuyendo considerablemente en los días posteriores. Asimismo, se observa una mayor diversidad de filos al día 35.

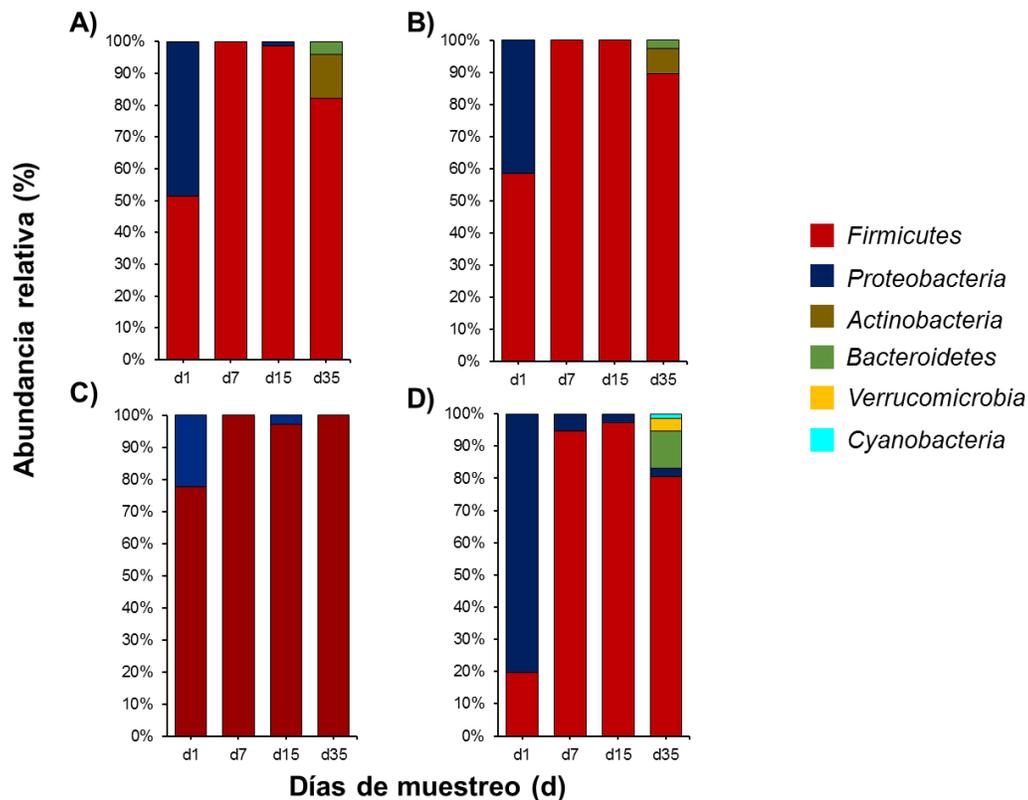


Figura 15. Abundancia relativa a nivel taxonómico de filos en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos a diferentes días de muestreo.

Asimismo, a nivel taxonómico de familia, se identificaron las diez familias más abundantes de la mucosa intestinal en todas las secciones analizadas (Figura 16), siendo la familia *Lactobacillaceae* del filo Firmicutes la más abundante (32.5%).

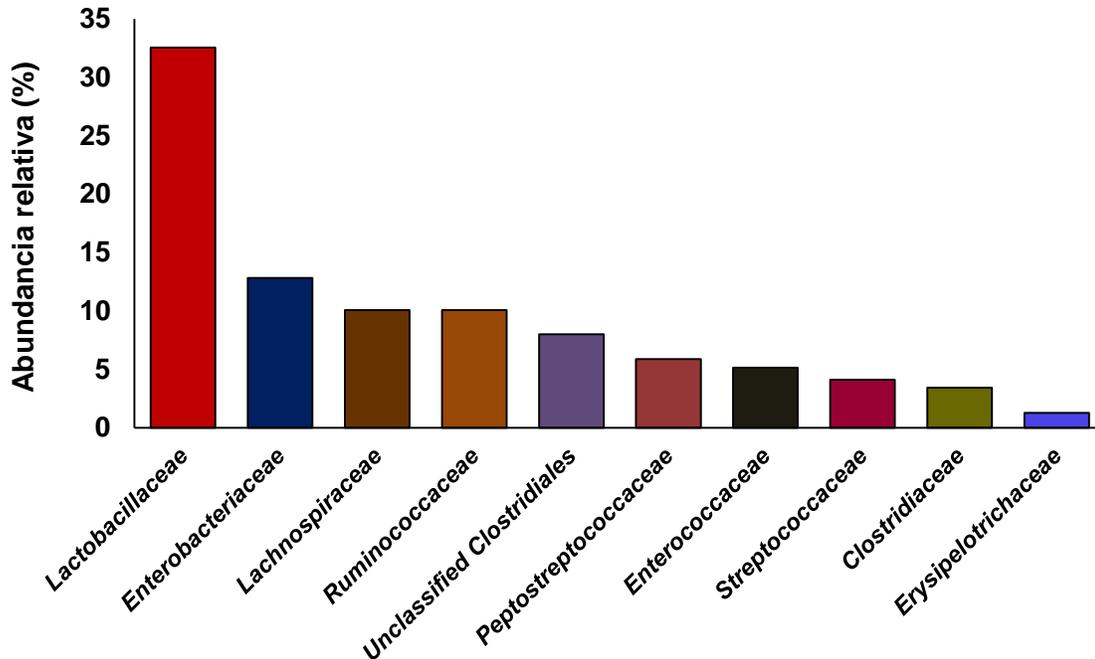


Figura 16. Principales familias encontradas en la microbiota de la mucosa intestinal en el modelo aviar monogástrico *Gallus gallus*.

La abundancia relativa a nivel de familia fue distinta de acuerdo a la región intestinal y edad de las aves. Al día 1 de edad, las tres familias más abundantes de la mucosa del duodeno fueron *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, y *Enterococcaceae*; en yeyuno fueron *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* y *Streptococcaceae*; en íleon, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* y *Enterobacteriaceae*; y en ciegos, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* y *Clostridiaceae*. A partir del día 7, y en las tres regiones del intestino delgado, la familia *Lactobacillaceae* domina y aparecen las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*; en ciegos, se establecen como dominantes las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. Al día 15, en la mucosa de duodeno y yeyuno dominan las familias *Lactobacillaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*; de íleon, domina el orden Clostridiales y *Lactobacillaceae*; y en ciegos, continua la dominancia de *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* hasta el final del estudio (Anexo 6). Al día 35, existe una mayor diversidad en todas las regiones intestinales, siendo *Lactobacillaceae* la familia dominante en la mucosa de

duodeno y yeyuno, mientras que en íleon continúa la superioridad del orden *Clostridiales* (Figura 17).

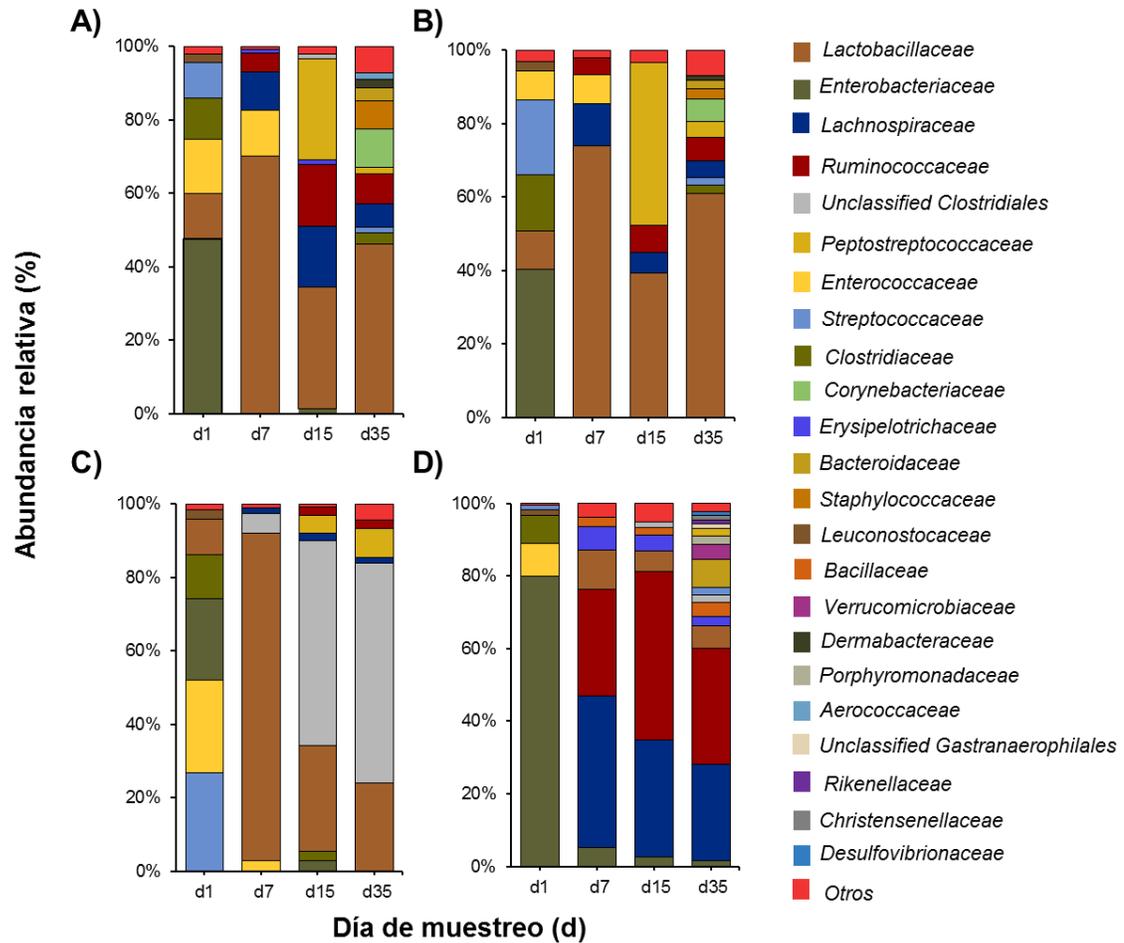


Figura 17. Abundancia relativa a nivel taxonómico de familia en la mucosa intestinal de **(A)** duodeno, **(B)** yeyuno, **(C)** íleon y **(D)** ciegos en los días 1, 7, 15 y 35.

En concordancia con los resultados obtenidos en el presente proyecto, Awad y cols. (2016) analizaron la microbiota asociada a la mucosa intestinal en el modelo *G. gallus* tomando muestras de yeyuno y ciegos a los días 1, 7, 14 y 28, reportan que Firmicutes y Proteobacteria fueron los filos predominantes, siendo este último significativamente mayor al día 1 de edad, mientras que Firmicutes fue el filo más abundante en aves mayores; asimismo, presentaron menores proporciones de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Awad et al., 2016).

Las bacterias del filo Firmicutes cumplen con una función importante en la digestión y salud de las aves; específicamente, para la creación de un perfil microbiano que permita una extracción mayor de energía a partir de la producción de ácidos grasos de cadena corta (Li *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que los miembros del filo Firmicutes pueden inhibir el crecimiento de patógenos oportunistas (Brown *et al.*, 2012). Por lo anterior, se sugiere que la diversidad limitada al día 1 de edad permite la colonización de bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Campylobacter jejuni*; sin embargo, conforme aumenta la exposición a factores ambientales como alimentación y cama, aumenta la diversidad, permitiendo la exclusión competitiva y el establecimiento de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, como *Lactobacillus*. La mayoría de las bacterias del filo Proteobacteria se caracterizan por ser de naturaleza patógena, por lo que su presencia se relaciona con un estado pro inflamatorio y estimulador de la producción de citocinas (Diaz Carrasco *et al.*, 2019). Kubasova *et al.*, 2019, estudiaron este fenómeno y concluyeron que los ciegos de pollitos recién eclosionados únicamente pueden ser colonizados por bacterias Gram negativas pertenecientes a los filos Bacteroidetes, Proteobacteria, Synergistetes o Verrucomicrobia; además postularon que a esta edad no es posible la colonización por miembros de los filos Actinobacteria y Firmicutes, cuyas bacterias son utilizadas como probióticos, se establezcan en el intestino de dichos pollitos (Kubasova *et al.*, 2019). Se necesitan más estudios para determinar el mecanismo de este patrón de interacción.

Se ha reportado que existen pocos estudios que caractericen la microbiota de la mucosa en las diferentes regiones intestinales mediante técnicas de secuenciación de DNA; sin embargo, se distinguen diferencias entre los microambientes de la mucosa intestinal y el lumen; por lo tanto, son capaces de albergar diferentes perfiles microbianos con funciones metabólicas e inmunológicas distintas (Ringel *et al.*, 2015).

El análisis a nivel taxonómico de familia reveló una mayor diversidad en duodeno y yeyuno, así como la presencia de otras familias no presentes en íleon, tales como *Erysipelotrichaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae* y *Dermabacteraceae*. Por lo tanto, son necesarios futuros estudios donde se consideren todas las secciones del intestino delgado, ya que se observa la presencia de familias específicas en cada región, y buscar su función o influencia sobre el epitelio intestinal.

El primer reporte de la microbiota asociada a la mucosa intestinal a través de todo el tracto gastrointestinal del modelo *G. gallus* al día 35 y mediante secuenciación del gen *16S rRNA* fue el descrito por Gong *et al.*, 2007; sin embargo, en este estudio se emplearon aves de la estirpe Ross y administraron bacitracina zinc en la dieta como promotor de crecimiento, factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal (Gong *et al.*, 2007). A pesar de esto, se presentaron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, la clase Clostridia, al cual pertenecen las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, fue la más abundante en ciegos; asimismo, se coincide en que el intestino delgado alberga una microbiota dominada por *Lactobacillus* y que la microbiota asociada a la mucosa intestinal del duodeno es más diversa que en la mucosa del íleon. Específicamente en íleon, mencionan que la familia *Enterococcaceae* del orden Lactobacillales fue la segunda más abundante; sin embargo, el presente estudio revela que el orden Clostridiales tuvo mayor presencia al día 35.

También se ha reportado que la composición de la microbiota en el intestino delgado es similar, siendo la familia *Lactobacillaceae* la más abundante; sin embargo, la densidad es menor en la parte proximal del intestino en comparación con el íleon, es por esto que diversos artículos se enfocan particularmente a la caracterización de la microbiota del íleon. Richards-Ríos

et al., 2020, caracterizaron la microbiota del lumen y mucosa intestinal del íleon en tres estirpes distintas. El perfil microbiano de la mucosa del día 1 al 14 en la estirpe Cobb, se caracteriza por la dominancia de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual continuó su abundancia al día 21, siguiéndole las familias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Erysipelotrichaceae* y la nueva presencia de *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. Al día 42, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Candidatus Arthromitus*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* estuvieron presentes en lumen y mucosa intestinal del íleon.

Los sacos ciegos son los segmentos más estudiados debido a su alta densidad microbiana y por ser un sitio importante para el reciclaje de urea, regulación de agua y fermentación de carbohidratos que contribuyen a la salud intestinal, así como ser el principal reservorio de patógenos para aves (Ngunjiri *et al.*, 2019). La función de la microbiota de los ciegos en pollos de engorde comercial no es clara y, en algunos experimentos, los ciegos se han removido sin afectar el desarrollo del pollo. Richards *et al.*, 2019 reporta en cambio de la microbiota de la mucosa en ciegos a través del tiempo en distintas estirpes de pollos de engorde y reporta que al día 0 de vida posteclosión prevalecen las familias *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Enterococcaceae*, mientras que al día 3, dominan las familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Enterococcaceae*. A los días 7 y 14, continúa la predominancia de *Lachnospiraceae* y *Ruminococcocaceae*, mientras que entre los días 28 y 42, la familia más abundante fue *Ruminococcaceae*, seguida de *Clostridiales* y *Lachnospiraceae*. Estos resultados fueron replicables en el presente estudio, siendo *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* y *Clostridiaceae* las más abundantes al día 1, y *Lachnospiraecae* y *Ruminococcaceae* al día 7, 15 y 35.

La familia *Lactobacillaceae* del filo Firmicutes fue la más abundante (32.5%). La dominancia de esta familia en la microbiota intestinal puede deberse a su

resistencia a un pH ácido, aerotolerancia y una multiplicación apresurada gracias a su capacidad fermentadora de carbohidratos para la obtención de energía (Kubasova *et al.*, 2021). Interesantemente, la familia *Lactobacillaceae* podría presentar cepas con potencial probiótico, capaces de expresar una actividad antimicrobiana y de defensa del hospedador (Zhou *et al.*, 2021). Por ejemplo, se ha observado que varias cepas de *Lactobacillus salivarius* pueden producir bacteriocinas con efecto inhibitorio de bacterias Gram negativas y Gram positivas, como *Salmonella enterica* y *C. jejuni* en pollos (Sureshkumar *et al.*, 2021; Svetoch *et al.*, 2011). Además, las bacterias del género *Lactobacillus* son capaces de producir ácido láctico, lo que permite disminuir rápidamente el pH intestinal hasta por debajo de cinco, evitando la colonización por algunos patógenos oportunistas, como *E. coli*, *S. enterica* y *Clostridium perfringens* (Kubasova *et al.*, 2021). Asimismo, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por *Lactobacillus* pueden penetrar la membrana celular bacteriana, disminuyendo el pH intracelular e inhibiendo algunas enzimas esenciales o el metabolismo de otras bacterias (Pan y Yu, 2014).

La familia *Enterobacteriaceae*, la cual fue la familia dominante al día 1 de vida, se caracteriza por presentar una gran cantidad de especies patógenas para mamíferos y aves, siendo estos últimos un reservorio importante y una fuente de contaminación para los humanos (Linton, 1977). Asimismo, algunos miembros de esta familia son un reservorio de genes para la resistencia antimicrobiana, como *S. enterica* y *E. coli* que causa infecciones extra intestinales (ExPEC, por sus siglas en inglés), siendo capaces de transmitir dichos genes a otras bacterias comensales o patógenas mediante plásmidos, ocasionando el surgimiento de patógenos resistentes a antimicrobianos (Redweik, 2021). Por otro lado, una exposición prolongada a esta familia en los primeros días de vida del pollito puede resultar en una inflamación gastrointestinal, un pobre desarrollo inmune y fisiológico del intestino,

alterando la ganancia de peso y provocando problemas de infección en el saco vitelino (Chasser *et al.*, 2021).

La familia *Lachnospiraceae*, perteneciente al filo Firmicutes, se presenta abundantemente en el sistema gastrointestinal de mamíferos (Meehan y Beiko, 2014). Las especies pertenecientes a esta familia son anaerobias estrictas, no formadoras de esporas; específicamente, la especie *Ruminococcus gnavus* se ha asociado al desarrollo de obesidad o enfermedad de Chron (Hall *et al.*, 2017), mientras que otros géneros, como *Roseburia* y *Blautia* son indicadores de salud intestinal, ya que son productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato y acetato, lo que coadyuva al control de procesos inflamatorios intestinales, a la prevención de la colonización por patógenos resistentes a antibióticos mediante la conversión de ácidos biliares primarios a secundarios y la producción de lantibióticos (Sorbara *et al.*, 2020). Por lo anterior y debido a su proximidad con la mucosa intestinal, la familia *Lachnospiraceae* ejerce efectos en el metabolismo y regulación inmune del hospedador, como la estimulación para la diferenciación de células T reguladoras (Nava y Stappenbeck, 2011). En el modelo *G. gallus*, Stanley *et al.*, 2016 observaron que las aves con la mejor tasa de conversión alimenticia presentaban una mayor abundancia de las familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Erysipelotrichaceae* en la microbiota cecal, por lo que proponen la creación de nuevos probióticos con cepas pertenecientes a estas familias para mejorar el rendimiento de las aves. La especie *Clostridium lactatifermentans* perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* ha sido relacionada con un aumento de la tasa de conversión alimenticia en aves y con la inhibición del crecimiento de *S. enterica* gracias a su capacidad de producción de AGCC (van der Wielen *et al.*, 2002).

La familia *Ruminococcaceae* es una de las principales productoras de butirato, además de que, junto con la familia *Lachnospiraceae*, son capaces de degradar celulosa y otros polisacáridos no digeribles, por lo que su gran

abundancia en el intestino del modelo aviar puede deberse a que su dieta es rica en polisacáridos resistentes (Liu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016). Específicamente, el género *Faecalibacterium* se ha relacionado con la integridad del epitelio intestinal, no solo por la producción de butirato, el cual es la principal fuente de energía para el enterocito; también se ha relacionado con el aumento de la tasa vellosidad - cripta en duodeno, además de que regula la expresión de genes inflamatorios y de apoptosis (Gangadoo *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2013). Asimismo, Pedroso *et al.*, 2021 mencionan que *Faecalibacterium*, junto con *Turicibacter* y otras bacterias pertenecientes a filo Firmicutes son capaces de excluir a *Salmonella* de la mucosa intestinal. A nivel de especie, se ha observado que *Faecalibacterium prausnitzii* tiene un efecto antiinflamatorio y refuerzo de la función barrera de la mucosa intestinal, y aunque se ha propuesto que es debido a su capacidad productora de butirato, no se debe descartar el efecto de alguna otra molécula (Carlsson *et al.*, 2013; Sokol *et al.*, 2008).

En el presente trabajo también se observó, independientemente de la edad, que miembros del orden Clostridiales fueron los más abundantes en la mucosa intestinal; sin embargo, estas bacterias no pudieron ser clasificadas a nivel de familia o niveles taxonómicos inferiores. Familias pertenecientes al orden Clostridiales (ejemplo: *Clostridiaceae*), se han considerado como bacterias comensales o patógenos, y pueden establecerse en la mucosa intestinal, desempeñando una función importante en la estructura y fisiología intestinal debido a su capacidad productora de butirato (Lopetuso *et al.*, 2013). Al igual que los miembros de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, la familia *Clostridiaceae* es capaz de degradar polímeros como celulosa y xilano (Sergeant *et al.*, 2014). Uno de los principales patógenos de la familia *Clostridiaceae* es *Clostridium perfringens*, el cual causa enteritis necrótica y daños a la mucosa intestinal, disminuyendo la capacidad de digestión y absorción de las aves y por lo tanto, puede causar problemas de mortalidad,

rendimiento de carne en la canal o bien, puede ser un foco de transmisión para los humanos (Immerseel *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2021).

La distribución y abundancia de las familias anteriormente descritas, pueden presentar variaciones significativas de acuerdo a la región del intestino analizada; cada sección presenta una función metabólica distinta y puede estimular el establecimiento selectivo de poblaciones bacterianas; por lo tanto, es importante caracterizar la diversidad microbiana de cada una de las regiones intestinales (Shang *et al.*, 2018). La distribución espacial (contenido vs. mucosa) también es un factor importante a considerar; diversos estudios se han enfocado en analizar la composición de la microbiota utilizando principalmente muestras fecales o lumbales (Choi *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2003).

6.4 Cuantificación de la transcripción de genes asociados a la absorción de nutrientes en el enterocito

La absorción de nutrientes y agua sucede a través del sistema intestinal; en mamíferos, parte de la digestión ocurre en el duodeno mediante la incorporación de bilis y jugos pancreáticos al quimo; en yeyuno, sucede la absorción de agua, carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos, mientras que en íleon se absorben productos de la digestión como la vitamina B12 y los nutrientes remanentes del quimo (Kiela y Ghishan, 2016). Simultáneamente al proceso de absorción, el epitelio intestinal evita el paso de antígenos y bacterias presentes en el lumen hacia los tejidos internos del hospedador, por lo que se considera a este tejido como “selectivo” (Farré *et al.*, 2020).

Las células que conforman el epitelio intestinal desempeñan tres funciones principales: i) digestión y absorción de nutrientes, ii) protección contra patógenos y iii) renovación continua y apoptosis celular (Kraehenbuhl *et al.*, 1997). El presente trabajo se enfoca a la función de absorción de nutrientes llevada a cabo por el enterocito, una célula columnar que ocupa un aproximado del 90% del epitelio intestinal (Kong *et al.*, 1998). Evaluamos la transcripción de genes que codifican para proteínas transportadoras encargadas de regular el paso transcelular de glucosa, pequeños péptidos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta. Es importante resaltar que el modelo *G. gallus* se caracteriza por el desarrollo precoz de su sistema digestivo, presentando enterocitos maduros al primer día de vida (Zhang *et al.*, 2019).

6.4.1 Transportadores de glucosa: *GLUT2* y *SGLT1*

Los carbohidratos y en particular la glucosa, son la fuente más rápida de obtención de energía en aves y mamíferos; la glucosa se absorbe por la proteína de transporte sodio – glucosa 1 o *SGLT1* y transportada al interior del enterocito donde puede ser metabolizada o bien, pasar hacia el torrente sanguíneo mediante el transportador de glucosa 2 (*GLUT2*) presente en la membrana basolateral (Shirazi-Beechey *et al.*, 2011). Se ha reportado que este mecanismo prevalece en aves; sin embargo, mientras que en humanos

se han caracterizado 12 isoformas de transportadores de glucosa (GLUT1 – 12), en el genoma del modelo *Gallus gallus* se han identificado los genes para expresar los transportadores GLUTs 1, 2, 3, 5, 8, 9 y 12 (Byers *et al.*, 2017; Kono *et al.*, 2005). Diversos autores han establecido que los transportadores de glucosa en el modelo aviar se encuentran a lo largo de todo el tracto intestinal, incluyendo ciegos y recto, tanto en la cara apical como en la basolateral del epitelio intestinal y, presentan propiedades funcionales similares a los descritos en mamíferos (Garriga *et al.*, 1999).

El presente trabajo reveló que la expresión de *SGLT1* aumentó de forma lineal del día 1 al 35 de edad en duodeno y yeyuno, mientras que en íleon no se observaron diferencias en los niveles de transcripción; la transcripción de este gen en ciegos fue mínima y sin cambios aparentes durante todos los días evaluados (Figura 18). Además, en general que independientemente de la edad, la mayor transcripción de *SGLT1* se observó en duodeno, yeyuno e íleon.

El análisis temporal y regional de *GLUT2*, muestra que en duodeno y yeyuno aumentó de forma lineal del día 1 al 35 de edad. Sin embargo, estas tendencias no fueron observadas en íleon y ciegos; donde la expresión de *GLUT2* fue mínima (Figura 19).

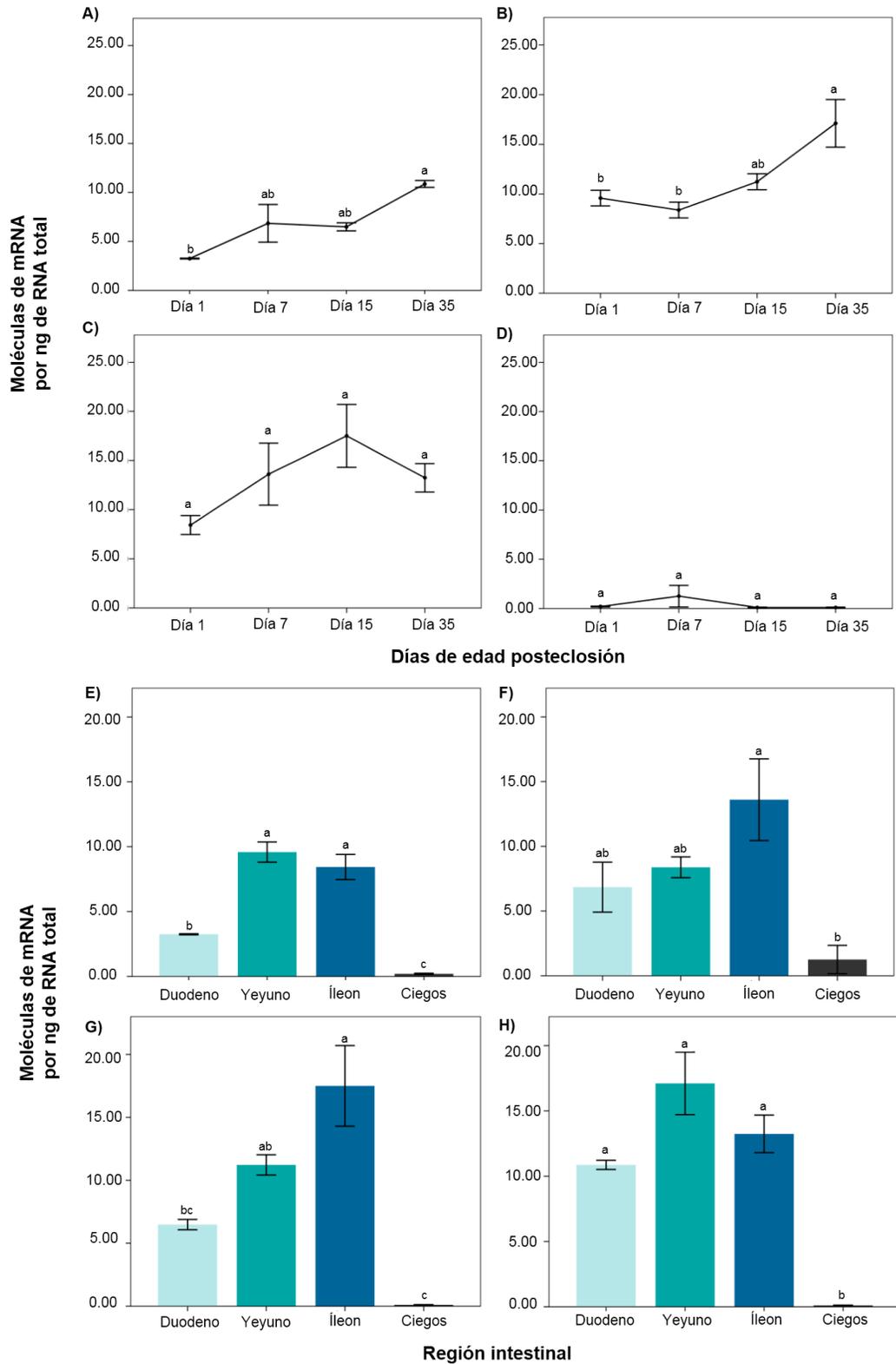


Figura 18. Expresión temporal y regional de *SGLT1* en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos y a los días **E)** Día 1, **F)** Día 7, **G)** Día 15 y **H)** Día 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

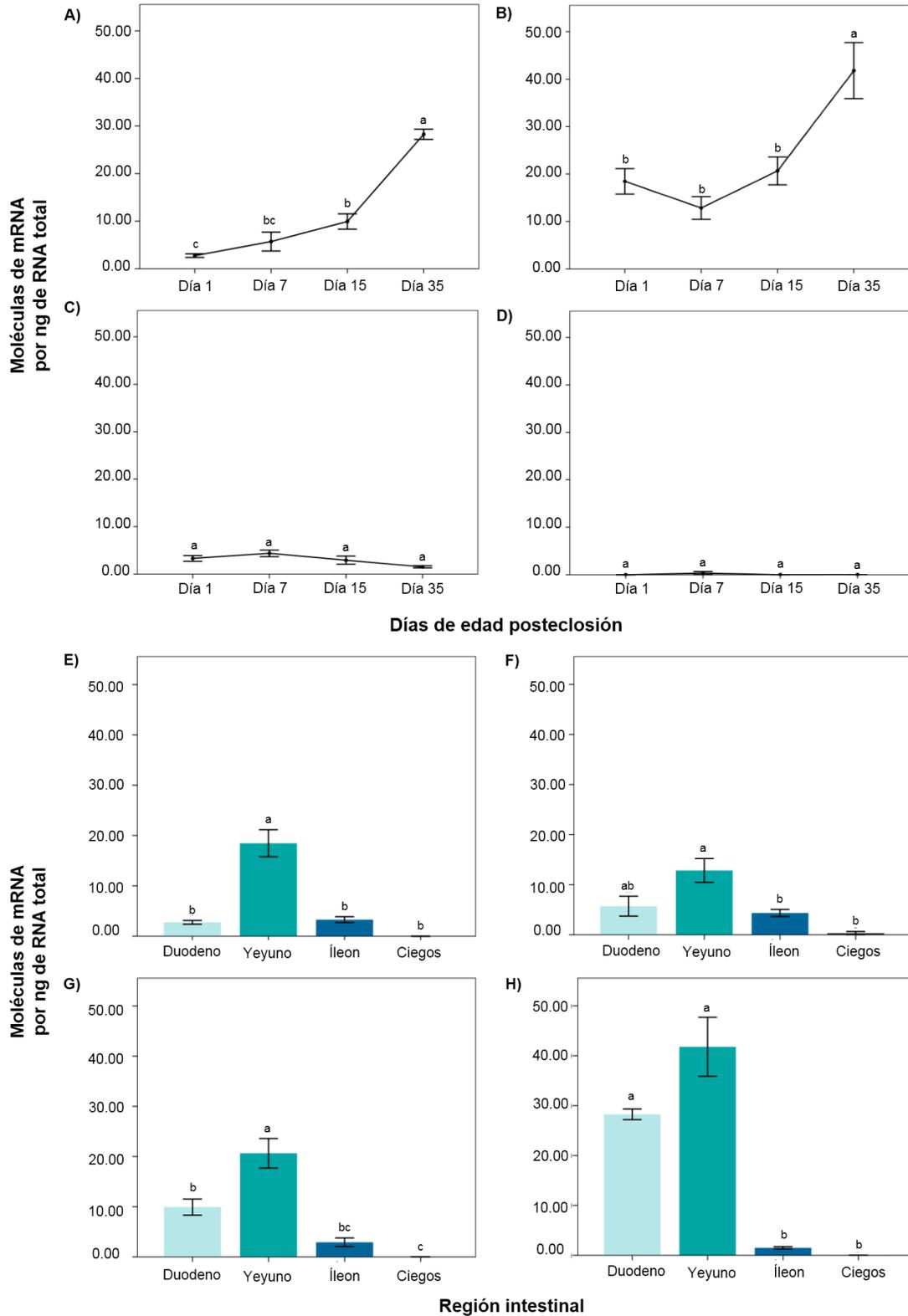


Figura 19. Expresión temporal y regional de *GLUT2* en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos y a los días **E)** Día 1, **F)** Día 7, **G)** Día 15 y **H)** Día 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El aumento en la transcripción de *SGLT1* en duodeno y yeyuno y los cambios parciales en íleon observados en el presente trabajo, también fueron evidenciados por Li *et al.*, (2008) en pollos analizados desde la fase embrionaria y hasta el día 14 de edad, sugiriendo la maduración gradual del sistema de transporte de glucosa dependiente de Na⁺. Además, Amat *et al.*, (1996), Yoshikawa *et al.*, (2011) y Gilbert *et al.*, (2007) evidenciaron el aumento de la transcripción de *SGLT1* de manera dependiente de la edad, mostrando la mayor expresión a partir de la segunda semana de edad. Asimismo, Amat *et al.*, (1996) mediante la técnica de intestino invertido, determinaron que el yeyuno es el segmento intestinal con mayor captación de iones dependiente de Na⁺ y que la capacidad de absorción aumenta en la parte proximal del intestino (duodeno y yeyuno) disminuyendo en las áreas distales (íleon, ciegos y recto). Estas observaciones concuerdan con los niveles de expresión de *SGLT1*, transportador dependiente de Na⁺, observados en el presente estudio.

El aumento lineal de la transcripción de *SGLT1* y *GLUT2* conforme incrementa la edad del ave podría deberse a la presencia física del alimento en el lumen intestinal; donde aves de 1 día de edad sobreviven mediante la absorción de nutrientes provenientes del saco vitelino y el consumo gradual de alimento. Esta idea se sustenta con los resultados publicados por Shimizu *et al.*, (2018), que revelan que la presencia física del alimento es el principal estimulador de la expresión de *SGLT1* y *GLUT2* (Shimizu *et al.*, 2018).

Interesantemente, la mayor transcripción de *GLUT2* se presentó en duodeno y yeyuno, comparado con el íleon, este patrón también fue evidenciado por Gilbert *et al.* (2007), indicando que en el íleon podrían existir mecanismos adicionales para el transporte de glucosa en la membrana basolateral (Gilbert *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2011).

6.4.2 Transportador de di- y tri- péptidos (PepT1) y aminoácidos excitatorios (EAAT3)

PepT1 es un transportador ligado al transporte de protones; un protón es captado en conjunto con el sustrato y pasan a través de la membrana apical, una vez en el interior, el proton es dirigido al intercambio de Na⁺/H⁺; este transportador necesita de un *pH* intestinal menor a 6 para su óptimo funcionamiento y, específicamente en el humano, únicamente se ha detectado en el intestino delgado (Wolf *et al.*, 2010). La selección de *PepT1* como indicador de funcionalidad intestinal en el presente trabajo, se debe a su homología entre secuencias con otros vertebrados, su importancia para la captación de pequeños péptidos, medicamentos peptidomiméticos como antibióticos β -lactámicos y antivirales, y su capacidad de regular las deficiencias de algunos aminoácidos en aves (Madsen y Wong, 2011).

El transportador EAAT3 tiene una afinidad específica para aspartato y glutamato; este último aminoácido actúa como la principal fuente de energía para el enterocito y desempeña un papel metabólico importante para otras células; EAAT3 y PepT1 afectan la disponibilidad de nutrientes y energía para el crecimiento y desarrollo de las aves (Mott *et al.*, 2008).

La dinámica de transcripción de PepT1 durante el crecimiento de las aves no presentó cambios significativos en ninguna de las regiones analizadas (Figura 20). Además, la transcripción de este gen en ciego fue mínima independientemente de la edad. La transcripción de *EAAT3* en intestino delgado y ciegos fue estable conforme avanza la edad de las aves. En el ciego, la transcripción de este gen fue mínima independientemente de la edad del ave. Interesantemente, se observa una tendencia lineal en la transcripción de *EAAT3* de la región proximal a distal del intestino delgado, observándose una; específicamente, mayor expresión en íleon (Figura 21).

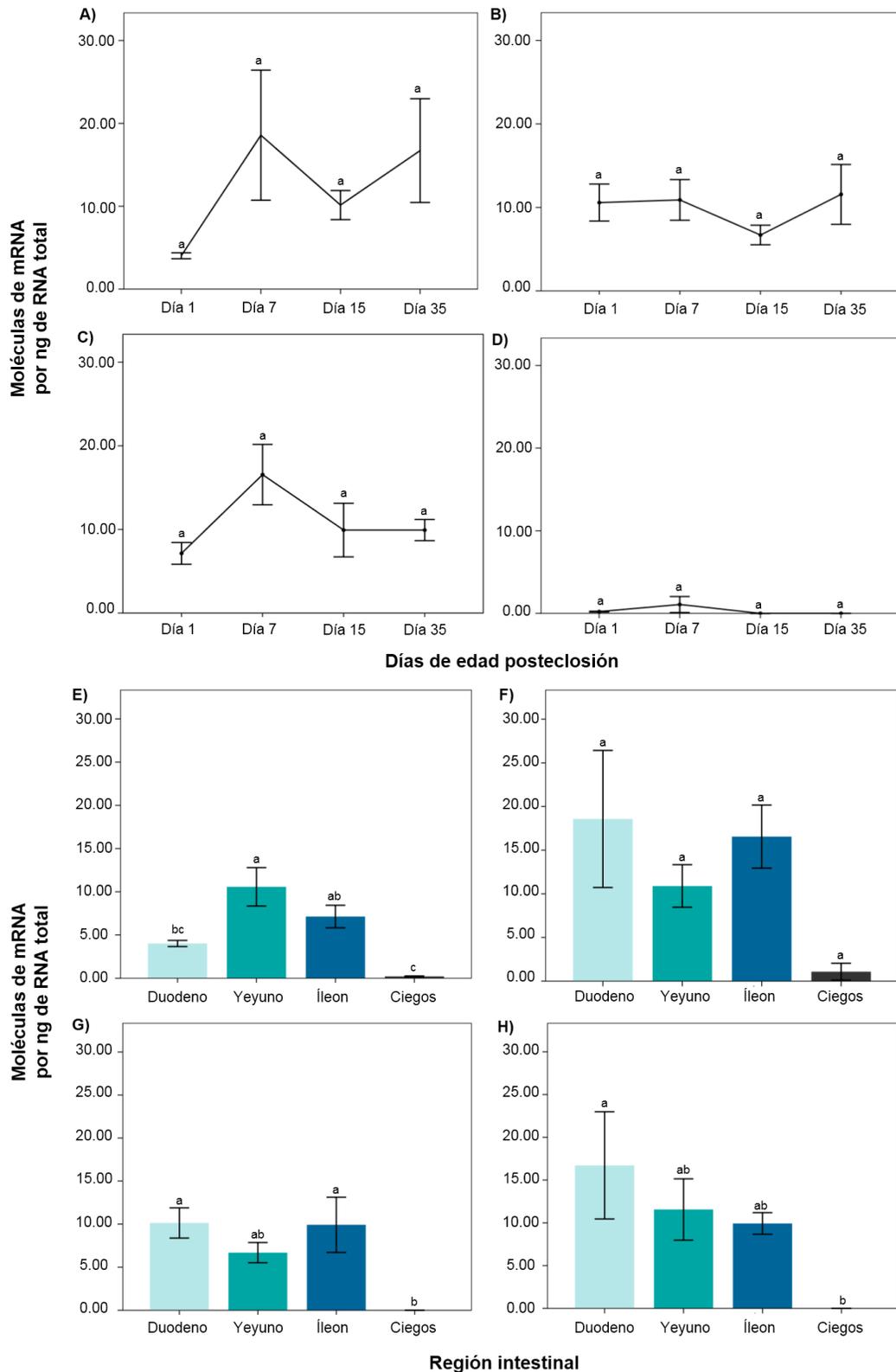


Figura 20. Expresión temporal y regional de *PepT1* en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos y a los días **E)** Día 1, **F)** Día 7, **G)** Día 15 y **H)** Día 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

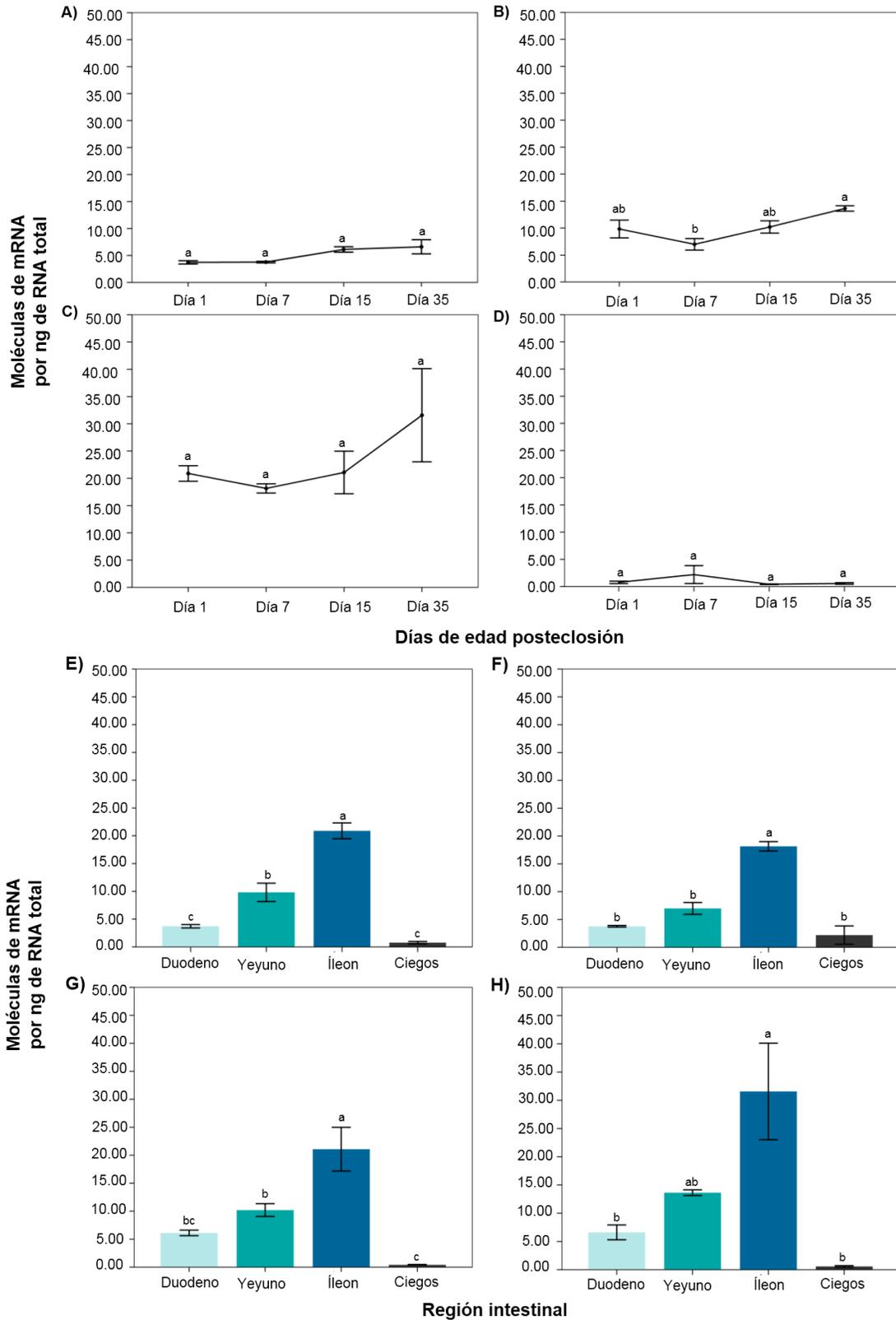


Figura 21. Expresión temporal y regional de *EAAT3* en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos y a los días **E)** Día 1, **F)** Día 7, **G)** Día 15 y **H)** Día 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Estudios previos han evidenciado que la transcripción de *PepT1* en la mucosa intestinal esta conservada en ratón, ratas, humanos (Kim *et al.*, 2007); y en el presente trabajo evidenciamos que esta función también esta conservada en el modelo aviar. El patrón de transcripción no diferenciado entre las diferentes secciones del intestino delgado y la edad también fue evidenciado por Gilbert *et al.*, (2007); sin embargo, se ha demostrado que la calidad de la proteína de la dieta es un factor que estimula el aumento de la transcripción de *PepT1* (Gilbert *et al.*, 2007).

La transcripción de *EAAT3* también se ha observado en el intestino delgado de ratón, rata y humano (Kim *et al.*, 2007). El trabajo de Gilbert *et al.*, (2007) y el presente estudio evidencian la transcripción de este gen en duodeno, yeyuno e íleon del modelo aviar, sugiriendo que esta función esta conservada en mamíferos y aves. Además, el presente estudio corrobora que la mayor transcripción de este gen se lleva a cabo en la parte distal del intestino (íleon); patrón de expresión previamente reportado (Gilbert *et al.*, 2007; Iwanaga *et al.*, 2005).

La expresión de *PepT1* puede regularse de acuerdo a la dieta, desarrollo, hormonas, medicamentos y enfermedad. Gilbert *et al.*, (2008) demostró que la calidad de la proteína de la dieta en pollos es un factor importante para una mayor captación y uso de este macronutriente (Gilbert *et al.*, 2008). En concordancia, Frazier *et al.*, (2008) midieron la abundancia de *PepT1* en duodeno, yeyuno e íleon en aves desde el día embrionario 18 hasta el día de eclosión; después, ofrecieron dietas con diferentes cantidades de proteína cruda y como resultado al día 35 de edad posteclosión, este transportador disminuyó su expresión con la administración limitada de proteína cruda al 12%, mientras que aumentó cuando se ofrecieron cantidades del 18% al 24%.

En concordancia con lo reportado por Iwanaga *et al.*, (2005) y Gilbert *et al.*, (2007), la expresión de *EAAT3* es mayor en el íleon, por lo que el transporte de glutamato sucede principalmente en esta sección del intestino delgado.

Contrario a los autores antes mencionados, Corzo *et al.*, (2011) estudiaron el efecto de las proteínas de la dieta sobre parámetros de crecimiento y la expresión de transportadores de péptidos y aminoácidos en pollos de engorda; observaron que una reducción de proteína cruda en la dieta resulta en un incremento de la transcripción de *PepT1*; sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo. Además, la transcripción de *EAAT3* aumenta en el grupo con reducción de proteína cruda en la dieta (Corzo *et al.*, 2011). Este mecanismo de compensación puede deberse a una adaptación fisiológica de las aves a pesar de la reducida cantidad de glutamato y aspartato presente.

En ciegos, se presenta una absorción de péptidos y glutamato casi nula, se observa una mayor expresión de estos transportadores al día 7 de edad (Figura 21 y 22). Se ha propuesto que la absorción de aminoácidos puede extenderse hasta los sacos ciegos ya que estos desempeñan una función de reciclaje de nitrógeno, donde la urea es metabolizada a amonio, el cual es utilizado por la microbiota para la producción de aminoácidos (Miska *et al.*, 2015). Moretó y Planas, (1989) mencionan que las aves más jóvenes pueden absorber aminoácidos en la parte proximal de los ciegos; sin embargo, la pérdida de esta capacidad con la edad y en la parte media y distal se debe a un cambio morfológico de las vellosidades, las cuales se convierten en montículos o rieles después del día 7 de edad de las aves (Moretó y Planas, 1989). Este cambio morfológico en ciegos explicaría la baja expresión genética observada a los días 15 y 35 en el presente estudio.

6.4.3 Proteína de unión a ácidos grasos 2 (FABP2)

Los ácidos grasos son una fuente importante de energía celular y son precursores para sintetizar lípidos que desempeñan funciones estructurales o de señalización celular; estimulan la transcripción de genes como *FoxO1*, importante para la adaptación a la escasez de nutrientes (Su y Abumrad, 2009). Los ácidos grasos pueden pasar rápidamente a través de las bicapas de fosfolípidos de las membranas celulares, pero su captación es facilitada por las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) asociadas a estas membranas (Ockner y Manning, 1974). Estudios previos ha reportado la transcripción de este gen en el intestino de *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, de ratones, ratas y humanos (Kim et al., 2007; Smathers y Petersen, 2011). El presente trabajo representaría una de las primeras evidencias de la transcripción de *FABP2* en las diferentes regiones intestinales y durante el desarrollo de las aves.

Las FABPs cumplen funciones específicas como: i) asimilación, metabolismo y almacenamiento de lípidos dietarios, ii) transportan ácidos grasos desde la membrana apical hacia el interior de la célula (mitocondria, núcleo, peroxisoma) para ser transformados u oxidados, iii) regulación de la β -oxidación de AG, iv) secreción de lípidos hacia el torrente sanguíneo, v) regulan la secreción y síntesis de citocinas proinflamatorias y vi) proliferación y diferenciación celular (Bottasso Arias, 2019).

En mamíferos, *FABP2* se expresa únicamente en el intestino delgado, primordialmente en yeyuno, donde sucede la mayor absorción de lípidos; este patrón de expresión también sucede en el modelo aviar indicando la conservación de esta función entre aves y mamíferos (Gajda y Storch, 2015). Interesantemente, se ha sugerido que la transcripción de este gen podría disminuir en animales adultos (Woudstra *et al.*, 2004), por lo tanto, se requieren estudios adicionales para evidenciar el efecto de la edad, en animales adultos, en los niveles de transcripción de este gen.

La transcripción temporal y regional de *FABP2* en duodeno presenta un patrón exponencial de acuerdo a la edad, mientras que en yeyuno disminuye abruptamente para el día 15 y vuelve a aumentar para el día 35; en íleon y ciegos sucede un efecto negativo con la edad, presentando una mayor abundancia a los días 1 y 7 y disminuyendo en los días posteriores (Figura 22).

Asimismo, se muestra que al día 1 y 7, yeyuno e íleon fueron los principales sitios de absorción de ácidos grasos. Al día 15, duodeno expresa mayor cantidad de *FABP2*, aunque el cambio no es significativo en comparación con yeyuno e íleon. Para el día 35, duodeno y yeyuno presentan una cantidad similar de mRNA de *FABP2*.

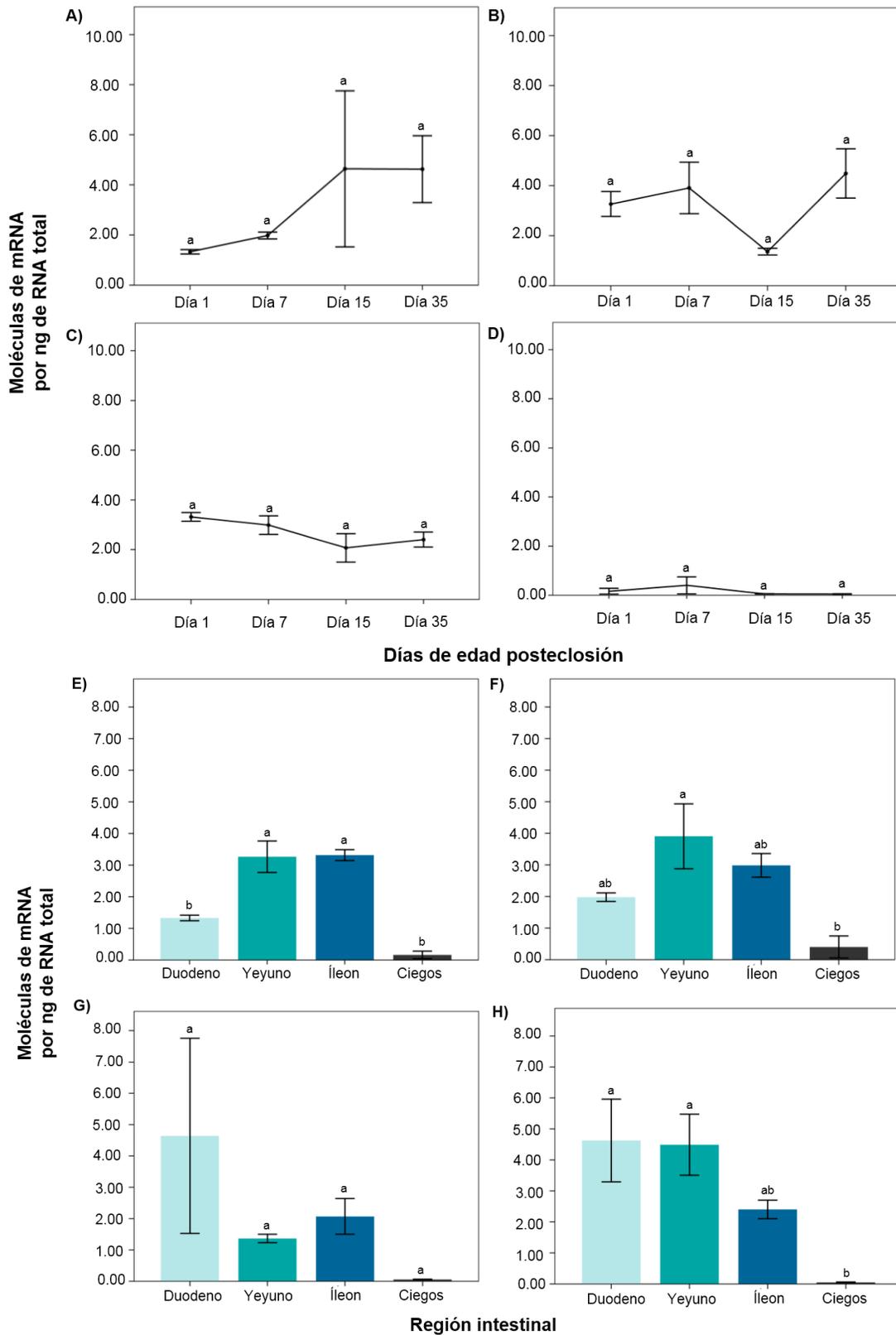


Figura 22. Expresión temporal y regional de *FABP2* en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos y a los días **E)** Día 1, **F)** Día 7, **G)** Día 15 y **H)** Día 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Katongole y March, (1979), mediante el método de cromatografía, reportaron que FABP se encuentra en mayor cantidad en la parte proximal del intestino y disminuye hacia la sección distal a la semana número 12 de edad en pollos (Katongole y March, 1979). Dentro de nuestro conocimiento, no existe un reporte que utilice métodos moleculares para determinar la expresión temporal y regional de *FABP2* en pollos de engorda. Sin embargo, Chen *et al.*, (2015) propusieron a esta proteína como un biomarcador de la función de barrera intestinal en pollos, ya que observaron que la inducción de daño a esta barrera mediante una dieta a base de trigo, cebada y centeno en conjunto con un desafío con coccidia, provocó la disminución de expresión de *FABP2* hasta un 34% en comparación con el grupo control en la mucosa del yeyuno (Chen *et al.*, 2015). Este resultado indica la pérdida de células epiteliales.

Diferentes porcentajes de lípidos en la dieta estimulan la cantidad de *FABP2* en el intestino; asimismo, se ha evaluado este gen en estudios del efecto de aditivos en la salud intestinal de las aves. Por ejemplo, Hansen *et al.*, (2021) examinaron el efecto de la suplementación de butirato en el crecimiento y transcripción genética de las aves durante una infección por *Eimeria maxima*; observaron una disminución de la transcripción de *FABP2* en el grupo infectado, indicando un daño al epitelio intestinal de las aves (Hansen *et al.*, 2021).

6.4.4 Mucina 2 (MUC2)

Las mucinas secretadas por las células caliciformes forman la capa de moco que cubre el epitelio intestinal y funge una función de barrera física e inmunológica, con propiedades antimicrobianas por su contenido de β -defensina, lisozimas, avidina e inmunoglobulina A que coadyuva a la inhibición de patógenos; la presencia de esta capa debe permitir la permeabilidad selectiva de pequeñas moléculas y de nutrientes especialmente en el intestino delgado, donde sucede el 90% de la absorción (Zhang *et al.*, 2015).

MUC2 es la principal mucina formadora de gel, además de su función de protección y lubricación, desempeña un papel importante para la tolerancia oral mediante su influencia a las células dendríticas, suprimiendo su respuesta inflamatoria; además, la mucina 2 es el principal elemento del moco intestinal, siendo una fuente de nutrientes y sitio de adhesión para la microbiota (Pelaseyed *et al.*, 2014). Además, se ha descrito la influencia de comunidades bacterianas en la producción de mucina 2 en ratones axénicos que presentan una capa de moco delgada e inestable en comparación con murinos ordinarios (Liu *et al.*, 2020). Por lo anterior, MUC2 representa un componente crítico para la homeostasis intestinal y se considera un biomarcador de salud en el intestino en diversas especies (Chen *et al.*, 2015; Paone y Cani, 2020).

En el presente estudio, la transcripción de *MUC2* tuvo un aumento exponencial conforme avanza la edad del animal y hacia la parte distal del intestino delgado, siendo el íleon la región con mayor presencia de mucina 2, seguido de duodeno y yeyuno. La transcripción de *MUC2* en ciegos es mínima comparada con el intestino delgado (Figura 23). Los patrones de transcripción en el intestino delgado concuerdan con lo publicado por Reynolds *et al.*, quienes reportan un aumento de *MUC2* conforme avanza la edad de los animales en todas las regiones intestinales (Reynolds *et al.*, 2020).

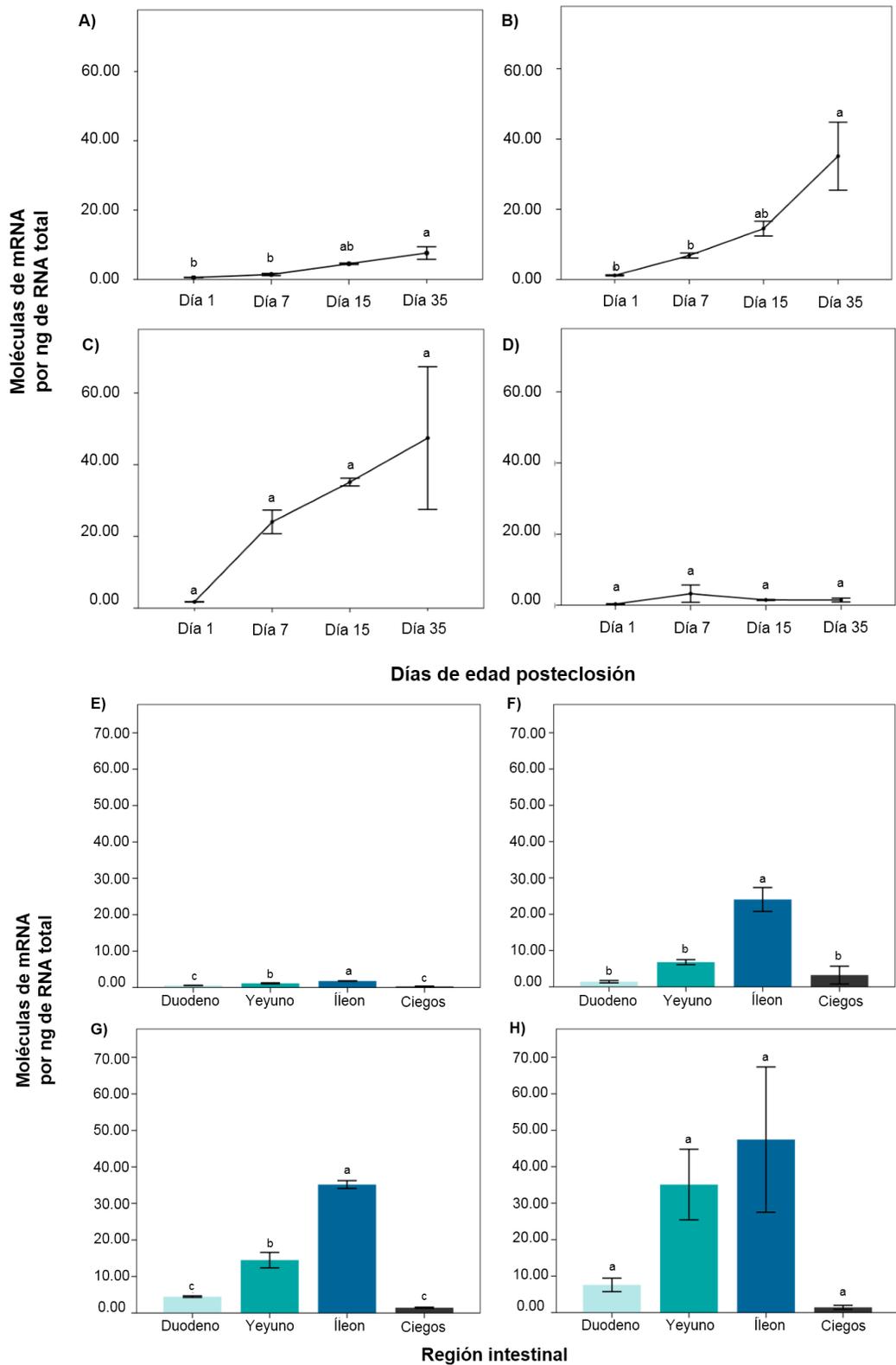


Figura 23. Expresión temporal y regional de *MUC2* en **A)** Duodeno, **B)** Yeyuno, **C)** Íleon y **D)** Ciegos y a los días **E)** Día 1, **F)** Día 7, **G)** Día 15 y **H)** Día 35. Diferencia de medias mediante prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Jiang *et al.*, (2013) reportaron la expresión temporal y regional de *MUC2* en pollos. Observaron un aumento del mRNA de *MUC2* en duodeno, yeyuno e íleon desde el día embrionario 14.5 hasta el día 7 de edad posteclosión, con una mayor abundancia en íleon y menor en duodeno (Jiang *et al.*, 2013). Este patrón de expresión coincide con los resultados del presente trabajo y con lo descrito por Uni *et al.*, (2003) respecto a la densidad de células caliciformes, las cuales mantuvieron una proliferación constante del día 1 al 7 en duodeno y aumentaron conforme avanza la edad de las aves en yeyuno e íleon (Uni *et al.*, 2003). Este aumento en la densidad de células caliciformes también ha sido evidenciado por Duangnumsawang *et al.*, 2021.

El estudio de la transcripción de *MUC2* es fundamental para entender la biología de la mucosa intestinal y las interacciones mucosa – bacteria; por ejemplo, se ha evidenciado que algunos microorganismos patógenos pueden afectar la función de las células caliciformes, como *Clostridium perfringens* que ocasiona una disminución en la transcripción de *MUC2*, desencadenando problemas en la función barrera de la mucosa intestinal (Criado-Mesas *et al.*, 2021).

6.5 Asociación del efecto de los cambios en las poblaciones bacterianas autóctonas asociadas a la mucosa intestinal sobre la transcripción de genes responsables de la interacción microbioma-hospedador

La microbiota intestinal puede regular la capacidad funcional, digestiva y absorbente del enterocito (Kogut, 2017). Con la meta de identificar asociaciones entre poblaciones bacterianas asociadas a la mucosa intestinal y desarrollo funcional del enterocito, se realizaron análisis de correlación entre estas variables.

En el presente trabajo, se identificó una correlación positiva entre la abundancia relativa de los miembros de la familia *Brevibacteriaceae* ($R^2 = 0.6665$, $P = 0.000$), *Carnobacteriaceae* ($R^2 = 0.6617$; $P = 0.000$) y la transcripción del gen *GLUT2* en duodeno y yeyuno. También se observó una correlación positiva entre la abundancia relativa de miembros del orden Clostridiales y la transcripción de los genes *EAAT3* ($R^2 = 0.6565$; $P = 0.000$) y *MUC2* ($R^2 = 0.6659$; $P = 0.000$) (Figura 24).

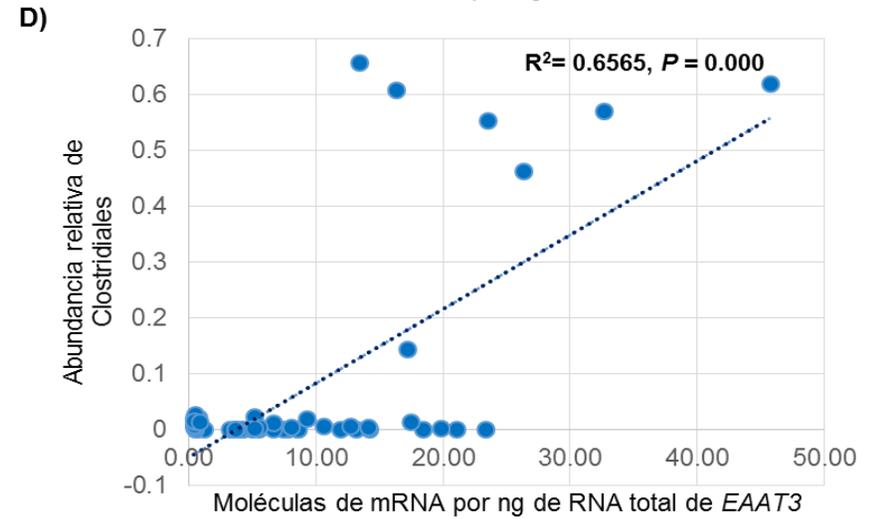
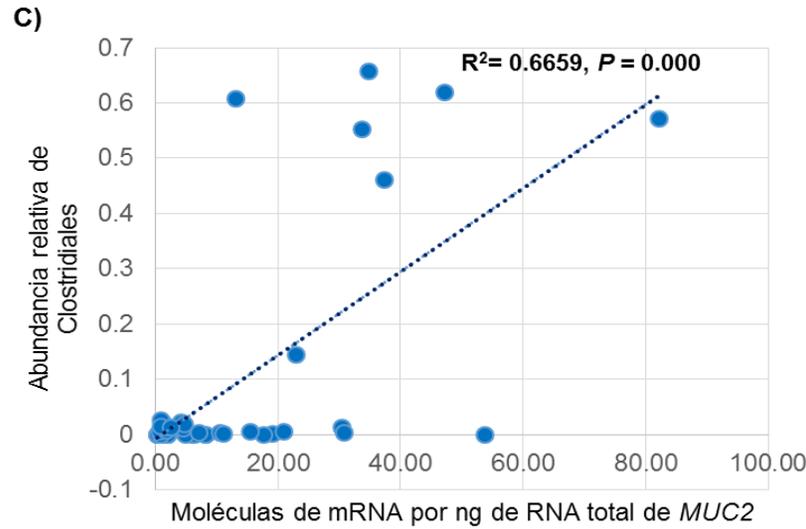
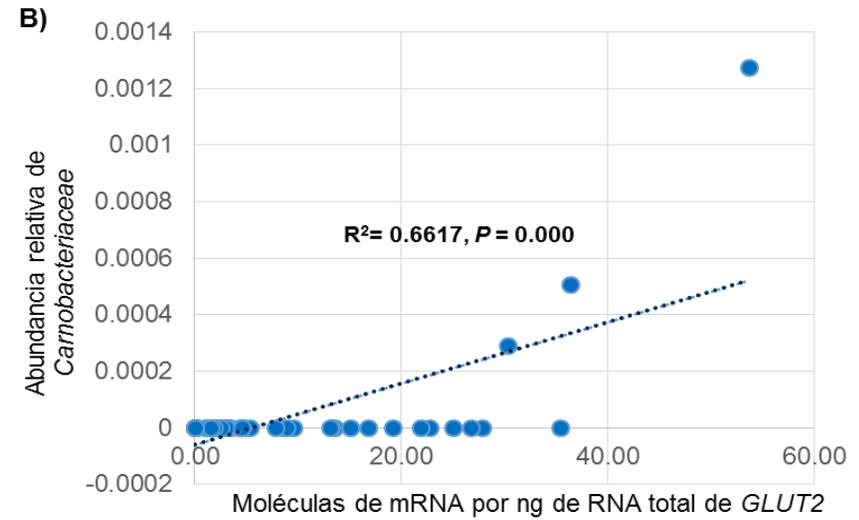
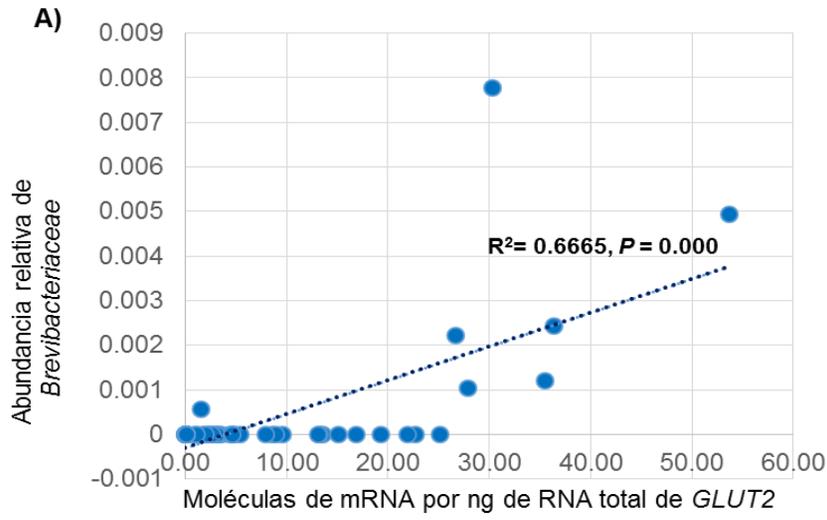


Figura 24. Correlaciones positivas entre **A)** *Brevibacteriaceae* – *GLUT2*, **B)** *Carnobacteriaceae* – *GLUT2*, **C)** Orden Clostridiales – *MUC2* y **D)** Orden Clostridiales – *EAAT3*.

La familia *Brevibacteriaceae* (orden *Micrococcales*, clase *Actinobacteria*), son bacterias gram positivas, corineformes, aerobias estrictas, no formadoras de esporas y presenta únicamente el género *Brevibacterium* (Weimer, 1999). De acuerdo a su anotación genética, la familia *Brevibacteriaceae* presenta funciones de metabolismo de aminoácidos, transcripción y metabolismo de carbohidratos (Forquin-Gomez *et al.*, 2014). La familia *Brevibacteriaceae* es un habitante de la mucosa intestinal de roedores, aves y mamíferos (Boukerb *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2014; Sfanos *et al.*, 2018; Vuik *et al.*, 2019); por lo tanto, es una familia bacteriana que ha adaptado su genoma para proliferar en este nicho ecológico.

Se ha reportado que el género *Brevibacterium* puede sobrevivir en ambientes con limitado flujo de nutrientes, por lo que presenta un metabolismo basal bajo; es capaz de metabolizar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento, utilizando principalmente acetato y lactato, pero también es capaz de utilizar glucosa y galactosa como fuente de carbono, resultando en la producción de ácido como el ácido glutámico; cuando el amonio es escaso en el ambiente, *Brevibacteriaceae* utiliza aminoácidos como fenilalanina, tirosina, arginina, prolina e histidina como fuente de nitrógeno (Forquin y Weimer, 2014; Weimer, 1999). El metabolismo basal bajo descrito anteriormente sugiere que *Brevibacteriaceae* podría ser un microorganismo simbiote o que podría depender metabólicamente de la interacción con otros grupos bacterianos o células eucarióticas; esta idea se respalda por el tamaño del genoma que puede variar desde 2.3 hasta 4.5 mbp, indicando que hay especies de *Brevibacteriaceae* con un genoma reducido que posiblemente complemente sus rutas metabólicas en asociación con el enterocito (Pham *et al.*, 2017).

Carnobacteriaceae (orden *Lactobacillales*), es una familia de bacterias ácido lácticas comúnmente encontradas en productos de origen animal, el género representativo de esta familia es *Carnobacterium* y se caracteriza por presentar actividades antibacterianas por su producción de bacteriocinas (Ludwig *et al.*, 2015). Esta familia puede ser homofermentativa, es decir,

produce ácido láctico a partir de glucosa o heterofermentativa, liberando CO₂ y ácido láctico; por lo tanto, es capaz de catabolizar carbohidratos, utilizando principalmente hexosas y pentosas para producir lactato y dependiendo del nivel de oxígeno, producir acetato, etanol, CO₂ y ácido fórmico (Cailliez-Grimal *et al.*, 2014).

La familia *Carnobacteriaceae* es un habitante de la mucosa intestinal de aves, cerdos y humanos (Jayasinghe *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2020; Mulder *et al.*, 2009; Rojo *et al.*, 2017); al igual que *Brevibacteriaceae*, especies de *Carnobacteriaceae* tiene un genoma pequeño que va de 2.35 a 3.65 Mpb; sugiriendo una estrecha relación con el hospedador (Iskandar *et al.*, 2017). Asimismo, la habilidad de las bacterias ácido lácticas de producir ácidos orgánicos, bacteriocinas, entre otros compuestos, puede conllevar un beneficio para la salud intestinal del hospedador; específicamente, la familia *Carnobacteriaceae* es capaz de producir lactato, acetato y ácido fórmico a partir de glucosa, y a su vez, estos ácidos orgánicos se han relacionado con propiedades antimicrobianas e inhibición de patógenos (Pessione, 2012).

Interesantemente, miembros de la familia *Carnobacteriaceae* poseen uno de los secretomas más complejos, grandes y diversos; este sistema codifica para proteínas de función extracelular, principalmente asociadas al transporte de carbohidratos y proteínas de superficie que podrían estar asociadas a regular la interacción bacteria – hospedador (Iskandar *et al.*, 2017).

El orden Clostridiales presenta diecinueve familias de acuerdo al manual Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, varias encontradas en la mucosa intestinal de las aves analizadas en el presente trabajo, tales como *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaeae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* y *Lachnospiraceae*; estas dos últimas son las familias con más géneros bacterianos (Vos *et al.*, 2011).

Se reconoce que la microbiota intestinal es un factor determinante para la capa de moco que cubre el epitelio, ya que se ha observado en el modelo murino que la falta de microbiota en la mucosa intestinal provoca una capa de moco delgada y la penetración de bacterias a través de esta (Johansson *et al.*, 2015); por lo tanto, existe una interacción entre la microbiota y la producción de mucinas. Diversos estudios explican que la microbiota es capaz de estimular la proliferación de células secretoras como las células caliciformes mediante la mera presencia de las bacterias en el epitelio, el reconocimiento de sus lipopolisacáridos por los receptores de reconocimiento o mediante los productos de la fermentación; asimismo, se piensa que algunas bacterias son capaces de estimular la secreción de mucinas mediante la producción de prostanglandinas (Smirnov *et al.*, 2005). A su vez, la mucosa intestinal es capaz de influir en el desarrollo de las comunidades bacterianas mediante la distribución de señales químicas mediante el flujo y renovación de la mucosa, por ejemplo se ha observado que el *quorum sensing* disminuye cuando en las áreas donde el flujo del moco que cubre el epitelio es mayor (Wang *et al.*, 2021).

Miembros del orden Clostridiales, como *Oscillospiraceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* son capaces de degradar la estructura proteica de las mucinas. Sin embargo, también existen especies que estimulan la transcripción de *MUC2* y la secreción de mucinas, tales como *Clostridium butyricum* y *Clostridium tyrobutyricum* (Lili *et al.*, 2021; Raimondi *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2021). La mayoría de las familias del orden Clostridiales son productoras de ácidos grasos de cadena corta (Lopetuso *et al.*, 2013), los

cuales estimulan la transcripción de *MUC2* y la secreción de mucinas mediante la metilación/acetilación de histonas en el promotor de *MUC2* y la señalización de receptores de la proteína G acoplada, siendo esta una posible vía de acción que explique la correlación encontrada; asimismo, se ha reportado que algunas especies de *Peptostreptococcus* (orden *Clostridiales*) son capaces de producir ácido indolacrílico a partir de triptófano, lo cual estimula la diferenciación celular de las células caliciformes (Melhem *et al.*, 2021).

Algunas especies de *Clostridium* (*C. sticklandii* y *C. thermocellum*) son capaces de utilizar treonina, serina, prolina y arginina como fuente energética y de carbono, secretando glutamato, aspartato y alanina (Fonknechten *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2018). Glutamato y aspartato son los principales ligandos del transportador de aminoácidos excitatorios 3 (EAAT3); por lo tanto, los resultados del presente estudio sugieren que el efecto que ejerce el orden *Clostridiales* sobre la transcripción de EAAT3 podría relacionarse a la producción *in situ* de aminoácidos excitatorios.

7. CONCLUSIÓN

En el presente estudio describe la composición y desarrollo de la microbiota asociada a la mucosa intestinal en el intestino delgado y sacos ciegos de aves, así como la transcripción de genes asociados a la función de absorción intestinal. La microbiota asociada a la mucosa intestinal aumenta su diversidad con el tiempo y predominan los filos Proteobacteria al día 1 y Firmicutes en los días 7, 15 y 35. Las familias encontradas en este nicho ecológico, como *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, se han adaptado para ser capaces de utilizar mucinas como fuente de carbono y nitrógeno y sobrevivir en presencia de sustancias y péptidos antimicrobianos secretados por las células epiteliales y del sistema inmune; y debido a su proximidad con la mucosa intestinal, esta microbiota puede ser importante para el intercambio de nutrientes con el epitelio debido a que son productoras de ácidos grasos de cadena corta, estimulan el sistema inmune y protegen el epitelio contra la colonización de patógenos debido a su capacidad de adhesión y competencia de nutrientes (Ouwerkerk *et al.*, 2013).

En las primeras 5 semanas de vida del modelo *G. gallus*, el transporte de hexosas mediante los transportadores SGLT1 y GLUT2 ocurre primordialmente en duodeno y yeyuno, mientras que la absorción de lípidos y di- y tri- péptidos a través de FABP2 y PepT1 respectivamente, se lleva a cabo en las tres secciones del intestino delgado independientemente de la edad; el transporte de aminoácidos excitatorios mediante EAAT3 ocurre principalmente en íleon independientemente de la edad.

La síntesis de mucinas evaluada a través de la transcripción de *MUC2* se lleva a cabo principalmente en yeyuno e íleon. Por lo tanto, existen diferencias importantes en la capacidad de absorción de nutrientes y secreción de mucinas en las distintas secciones del intestino delgado, por lo que es necesario caracterizar la microbiota específica de cada región e indagar sobre su impacto en la fisiología del intestino.

Interesantemente, en el presente trabajo se identificó que miembros de las familias *Brevibacteriaceae*, *Carnobacteriaceae* y del orden Clostridiales, podrían estar involucradas en la regulación de la transcripción de genes funcionales del enterocito; específicamente de *GLUT2*, *MUC2* y *EAAT3*. El mecanismo específico que promueve el aumento de transcripción de estos genes se desconoce hasta el momento; sin embargo, en el presente trabajo se presenta una de las primeras evidencias que respaldan la interacción microbiota – enterocito. Estos resultados refuerzan la idea de utilizar el modelo *G. gallus* como modelo de estudio de las interacciones microbiota – hospedador.

8. REFERENCIAS

Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., y Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: Maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(11), 1185-1193. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1349173>

Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 18(3), 91-93. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>

Alali, W. Q., y Hofacre, C. L. (2016). Preharvest Food Safety in Broiler Chicken Production. *Microbiology Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PFS-0002-2014>

Ali, A., Tan, H., y Kaiko, G. E. (2020). Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604054>

Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., y Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, 39(9), 677-696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>

Amat, C., Planas, J. M., y Moreto, M. (1996). Kinetics of hexose uptake by the small and large intestine of the chicken. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(4), R1085-R1089. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.4.R1085>

Ames, N. J., Ranucci, A., Moriyama, B., & Wallen, G. R. (2017). The Human Microbiome and Understanding the 16S rRNA Gene in Translational Nursing Science. *Nursing research*, 66(2), 184-197. <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000212>

Antão, E.-M., Glodde, S., Li, G., Sharifi, R., Homeier, T., Laturnus, C., Diehl, I., Bethe, A., Philipp, H.-C., Preisinger, R., Wieler, L. H., y Ewers, C. (2008). The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microbial Pathogenesis*, 45(5-6), 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.08.005>

Aranda, P. S., LaJoie, D. M., y Jorcyk, C. L. (2012). Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>

Awad, W. A., Mann, E., Dzieciol, M., Hess, C., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., & Hess, M. (2016). Age-Related Differences in the Luminal and Mucosa-Associated Gut Microbiome of Broiler Chickens and Shifts Associated with *Campylobacter jejuni* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 154. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00154>

Ayala Lopez, M. S. (2020). *Evaluación de parámetros zootécnicos y sistema digestivo utilizando programas de alimentación modulada en pollo de engorda*. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1919

Bahr, J. M. (2008). The Chicken as a Model Organism. En P. M. Conn (Ed.), *Sourcebook of Models for Biomedical Research* (pp. 161-167). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-285-4_18

Bailey, R. (2010). *Intestinal microbiota and the pathogenesis of dysbacteriosis in broiler chickens*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14492.59525>

Ballou, A. L., Ali, R. A., Mendoza, M. A., Ellis, J. C., Hassan, H. M., Croom, W. J., y Koci, M. D. (2016). Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 2. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00002>

Baracho, M. S., Nääs, I. A., Lima, N. D. S., Cordeiro, A. F. S., y Moura, D. J. (2019). Factors Affecting Broiler Production: A Meta-Analysis. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1052>

Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., y Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9-25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>

Bergstrom, K., Fu, J., Johansson, M. E. V., Liu, X., Gao, N., Wu, Q., Song, J., McDaniel, J. M., McGee, S., Chen, W., Braun, J., Hansson, G. C., y Xia, L. (2017). Core 1- and 3-derived O-glycans collectively maintain the colonic mucus barrier and protect against spontaneous colitis in mice. *Mucosal Immunology*, 10(1), 91-103. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.45>

Bjerrum, L., Engberg, R. M., Leser, T. D., Jensen, B. B., Finster, K., y Pedersen, K. (2006). Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science*, 85(7), 1151-1164. <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1151>

Bjørn-Yoshimoto, W., y Underhill, S. M. (2016). The Importance of the Excitatory Amino Acid Transporter 3 (EAAT3). *Neurochemistry international*, 98, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.007>

Blachier, F., Boutry, C., Bos, C., y Tomé, D. (2009). Metabolism and functions of l-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 814S-821S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462S>

Bottasso Arias, N. M. (2019). *Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs): Interacción proteica e inmunopatología de intestino* [Tesis, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/78724>

Boudry, G., Yang, P.-C., y Perdue, M. H. (2004). Small Intestine, Anatomy. En L. R. Johnson (Ed.), *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 404-409). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00648-1>

Boukerb, A. M., Noël, C., Quenot, E., Cadiou, B., Chev e, J., Quintric, L., Cormier, A., Dantan, L., & Gourmelon, M. (2021). Comparative Analysis of Fecal Microbiomes From Wild Waterbirds to Poultry, Cattle, Pigs, and Wastewater Treatment Plants for a

Microbial Source Tracking Approach. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.697553>

Broderick, T. J., Gutierrez, O., Lee, J. T., & Duong, T. (2021). Evaluation of functional feed additive administration in broiler chickens to 21 d. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(2), 100121. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.100121>

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

Byers, M. S., Howard, C., y Wang, X. (2017). Avian and Mammalian Facilitative Glucose Transporters. *Microarrays*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/microarrays6020007>

Cai, Rui, Chen Cheng, Jianwei Chen, Xiaoqiang Xu, Chao Ding, y Bing Gu. «Interactions of Commensal and Pathogenic Microorganisms with the Mucus Layer in the Colon». *Gut Microbes* 11, n.º 4 (3 de julio de 2020): 680-90. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1735606>.

Cailliez-Grimal, C., Afzal, M. I., y Revol-Junelles, A.-M. (2014). Carnobacterium. En C. A. Batt y M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 379-383). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00381-5>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., y Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>

Carlsson, A. H., Yakymenko, O., Olivier, I., Håkansson, F., Postma, E., Keita, A. V., y Söderholm, J. D. (2013). Faecalibacterium prausnitzii supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48(10), 1136-1144. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.828773>

Carreiro, A. L., y Buhman, K. K. (2019). Chapter 3—Absorption of Dietary Fat and Its Metabolism in Enterocytes. En V. B. Patel (Ed.), *The Molecular Nutrition of Fats* (pp. 33-48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00003-2>

Cedernaes, J., Olszewski, P. K., Almén, M. S., Stephansson, O., Levine, A. S., Fredriksson, R., Nylander, O., & Schiöth, H. B. (2011). Comprehensive analysis of localization of 78 solute carrier genes throughout the subsections of the rat gastrointestinal tract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(4), 702-707. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.005>

Chasser, K. M., McGovern, K., Duff, A. F., Graham, B. D., Briggs, W. N., Rodrigues, D. R., Trombetta, M., Winson, E., y Bielke, L. R. (2021). Evaluation of day of hatch exposure to various Enterobacteriaceae on inducing gastrointestinal inflammation in

chicks through two weeks of age. *Poultry Science*, 100(7), 101193. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101193>

Chen, C., Yin, Y., Tu, Q., y Yang, H. (2018). Glucose and amino acid in enterocyte: Absorption, metabolism and maturation. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23, 1721-1739. <https://doi.org/10.2741/4669>

Chen, H., Pan, Y., Wong, E. A., y Webb, K. E. (2005). Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. *The Journal of Nutrition*, 135(2), 193-198. <https://doi.org/10.1093/jn/135.2.193>

Chen, J., Tellez, G., Richards, J. D., y Escobar, J. (2015). Identification of Potential Biomarkers for Gut Barrier Failure in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00014>

Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., y Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLOS ONE*, 17(2), e0264443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>

Choi, J. H., Kim, G. B., y Cha, C. J. (2014). Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 93(8), 1942-1950. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03974>

Coates, M. E., Fuller, R., Harrison, G. F., Lev, M., y Suffolk, S. F. (1963). A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *The British Journal of Nutrition*, 17, 141-150. <https://doi.org/10.1079/bjn19630015>

Corzo, A., Loar, I. R., Kidd, M. T., y Burgess, S. C. (2011). Dietary protein effects on growth performance, carcass traits and expression of selected jejunal peptide and amino acid transporters in broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 13(2), 139-146. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2011000200008>

Council, N. R., Agriculture, B. on, & Nutrition, S. on P. (1994). *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994*. National Academies Press.

Cox, M. J., Cookson, W. O. C. M., y Moffatt, M. F. (2013). Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 22(R1), R88-94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398>

Crhanova, M., Hradecka, H., Faldynova, M., Matulova, M., Havlickova, H., Sisak, F., y Rychlik, I. (2011). Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infection and Immunity*, 79(7), 2755-2763. <https://doi.org/10.1128/IAI.01375-10>

Crhanova, M., Karasova, D., Juricova, H., Matiasovicova, J., Jahodarova, E., Kubasova, T., Seidlerova, Z., Cizek, A., y Rychlik, I. (2019). Systematic Culturomics Shows that Half of Chicken Caecal Microbiota Members can be Grown in Vitro Except

for Two Lineages of Clostridiales and a Single Lineage of Bacteroidetes. *Microorganisms*, 7(11), E496. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110496>

Criado-Mesas, L., Abdelli, N., Noce, A., Farré, M., Pérez, J. F., Solà-Oriol, D., Martín-Venegas, R., Forouzandeh, A., González-Solé, F., y Folch, J. M. (2021). Transversal gene expression panel to evaluate intestinal health in broiler chickens in different challenging conditions. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.

Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*, 7(5), 349-359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>

Darwish, N., Shao, J., Schreier, L. L., & Proszkowiec-Weglarz, M. (2021). Choice of 16S ribosomal RNA primers affects the microbiome analysis in chicken ceca. *Scientific Reports*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91387-w>

DeSesso, J. M., y Williams, A. L. (2008). Contrasting the Gastrointestinal Tracts of Mammals: Factors that Influence Absorption. En *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Vol. 43, pp. 353-371). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)00021-3)

Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A., y Seifert, J. (2015). News in livestock research—Use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.005>

DeVries, J.W., Silvera, K.,R. (2000). Measurements of Nutrients and Chemical Components and Their Bioavailability. En Schmidl, M.,K., Labuza, T.,P., Essentials of Functional Foods. (99-128). Maryland; USA: Aspen Publishers

Diaz Carrasco, J. M., Casanova, N. A., y Fernández Miyakawa, M. E. (2019). Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection? *Microorganisms*, 7(10), E374. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100374>

Dibner, J. J., y Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science*, 84(4), 634-643. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>

Duangnumswang, Y., Zentek, J., y Goodarzi Boroojeni, F. (2021). Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.745849>

Emam, M., Mehrabani-Yeganeh, H., Barjesteh, N., Nikbakht, G., Thompson-Crispi, K., Charkhkar, S., y Mallard, B. (2014). The influence of genetic background versus commercial breeding programs on chicken immunocompetence. *Poultry Science*, 93(1), 77-84. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03475>

Engevik, A. C., & Goldenring, J. R. (2018). Trafficking Ion Transporters to the Apical Membrane of Polarized Intestinal Enterocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), a027979. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027979>

Estudante, M., Soveral, G., Morais, J. G., y Benet, L. Z. (2016). Insights into solute carriers: Physiological functions and implications in disease and pharmacokinetics. *MedChemComm*, 7(8), 1462-1478. <https://doi.org/10.1039/C6MD00188B>

European Food Safety Authority. (s. f.); *Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed by the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)—Including draft document updated in 2008* | Recuperado 19 de septiembre de 2021, de <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/99>

Faderl, M., Noti, M., Corazza, N., y Mueller, C. (2015). Keeping bugs in check: The mucus layer as a critical component in maintaining intestinal homeostasis. *IUBMB Life*, 67(4), 275-285. <https://doi.org/10.1002/iub.1374>

Farré, R., Fiorani, M., Abdu Rahiman, S., y Matteoli, G. (2020). Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. *Nutrients*, 12(4), 1185. <https://doi.org/10.3390/nu12041185>

Faseleh Jahromi, M., Wesam Altaher, Y., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., Tufarelli, V., y Liang, J. B. (2016). Dietary supplementation of a mixture of Lactobacillus strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, 60(7), 1099-1110. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1103-x>

Ferraris, R. P. (2001). Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *The Biochemical Journal*, 360(Pt 2), 265-276. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600265>

Ferrufino, J. C., Taxa, L., y Angeles, G. (2013). Histología normal del intestino delgado. *Revista Medica Herediana*, 7(1). <https://doi.org/10.20453/rmh.v7i1.507>

Finn, Robert D., Alex Bateman, Jody Clements, Penelope Coggill, Ruth Y. Eberhardt, Sean R. Eddy, Andreas Heger, et al. «Pfam: The Protein Families Database». *Nucleic Acids Research* 42, n.º Database issue (enero de 2014): D222-230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>.

Flach, M., y Diefenbach, A. (2015). Chapter 3—Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues. En J. Mestecky, W. Strober, M. W. Russell, B. L. Kelsall, H. Cheroutre, y B. N. Lambrecht (Eds.), *Mucosal Immunology (Fourth Edition)* (pp. 31-42). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00003-3>

Fleige, S., y Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2), 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>

Fonknechten, N., Chaussonnerie, S., Tricot, S., Lajus, A., Andreesen, J. R., Perchat, N., Pelletier, E., Gouyvenoux, M., Barbe, V., Salanoubat, M., Le Paslier, D., Weissenbach, J., Cohen, G. N., & Kreimeyer, A. (2010). *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics*, 11(1), 555. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-555>

Forder, R. E. A., Howarth, G. S., Tivey, D. R., y Hughes, R. J. (2007). Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poultry Science*, 86(11), 2396-2403. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00222>

Forquin, M.-P., y Weimer, B. C. (2014). Brevibacterium. En C. A. Batt y M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 324-330). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00047-1>

Forquin-Gomez, M.-P., Weimer, B., Sorieul, L., Kalinowski, J., y Vallaey, T. (2014). The Family Brevibacteriaceae. En *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 141-154). https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_169

Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X. C., y Huttenhower, C. (2015). Sequencing and beyond: Integrating molecular «omics» for microbial community profiling. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(6), 360-372. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3451>

Frazier, S., Ajiboye, K., Olds, A., Wyatt, T., Luetkemeier, E. S., y Wong, E. A. (2008). Functional characterization of the chicken peptide transporter 1 (pept1, slc15a1) gene. *Animal Biotechnology*, 19(4), 201-210. <https://doi.org/10.1080/10495390802240206>

Furlong, R. F. (2005). Insights into vertebrate evolution from the chicken genome sequence. *Genome Biology*, 6(2), 207. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-207>

Gajda, A. M., y Storch, J. (2015). Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- FABPs in the Intestine. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 93, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.001>

Gal-Garber, O., Mabeesh, S. J., Sklan, D., y Uni, Z. (2000). Partial Sequence and Expression of the Gene for and Activity of the Sodium Glucose Transporter in the Small Intestine of Fed, Starved and Refed Chickens. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2174-2179. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2174>

Gangadoo, S., Dinev, I., Chapman, J., Hughes, R. J., Van, T. T. H., Moore, R. J., y Stanley, D. (2018). Selenium nanoparticles in poultry feed modify gut microbiota and increase abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1455-1466. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8688-4>

Gardiner, G. E., Metzler-Zebeli, B. U., & Lawlor, P. G. (2020). Impact of Intestinal Microbiota on Growth and Feed Efficiency in Pigs: A Review. *Microorganisms*, 8(12), 1886. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121886>

Garriga, C., Rovira, N., Moretó, M., y Planas, J. M. (1999). Expression of Na⁺-d-glucose cotransporter in brush-border membrane of the chicken intestine. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276(2), R627-R631. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.2.R627>

Garrote, G. L., Abraham, A. G., y Rumbo, M. (2015). Is lactate an undervalued functional component of fermented food products? *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00629>

Gilbert, E. R., Li, H., Emmerson, D. A., Webb, K. E., y Wong, E. A. (2007). Developmental Regulation of Nutrient Transporter and Enzyme mRNA Abundance in the Small Intestine of Broilers¹. *Poultry Science*, 86(8), 1739-1753. <https://doi.org/10.1093/ps/86.8.1739>

Gilbert, E. R., Li, H., Emmerson, D. A., Webb, K. E., y Wong, E. A. (2008). Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *The Journal of Nutrition*, 138(2), 262-271. <https://doi.org/10.1093/jn/138.2.262>

Gimenez, J.A., Laparra, J.M. (2017). Biomarkers in Food Toxicology. En Sachan, A., Hendrich, S. *Food Toxicology: Current Advances and Future Challenges*. (pp. 2-7). Oakville, ON, Canada: Apple Academic Press Inc.

Gong, J., Si, W., Forster, R. J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C., y Han, Y. (2007). 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1), 147-157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x>

Goran tek-en de la traducción Ortisa - Commons File:Layers of the GI Tract english.svg, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=90946919>

Gorkiewicz, G., y Moschen, A. (2018). Gut microbiome: A new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 472(1), 159-172. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2277-x>

Gosslau, A. (2016). Assessment of food toxicology. *Food Science and Human Wellness*, 5(3), 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.05.003>

Gueimonde, M., Ouwehand, A. C., y Salminen, S. (2004). Safety of probiotics. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 48(1), 42-48. <https://doi.org/10.1080/11026480410026447>

Guo, P., Zhang, K., Ma, X., y He, P. (2020). Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>

Hall, A. B., Yassour, M., Sauk, J., GRNAer, A., Jiang, X., Arthur, T., Lagoudas, G. K., Vatanen, T., Fornelos, N., Wilson, R., Bertha, M., Cohen, M., Garber, J., Khalili, H., Gevers, D., Ananthakrishnan, A. N., Kugathasan, S., Lander, E. S., Blainey, P., ... Huttenhower, C. (2017). A novel Ruminococcus gnavus clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Medicine*, 9(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0490-5>

Hamal, K. R., Burgess, S. C., Pevzner, I. Y., y Erf, G. F. (2006). Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poultry Science*, 85(8), 1364-1372. <https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1364>

Hansen, V. L., Kahl, S., Proszkowiec-Weglarz, M., Jiménez, S. C., Vaessen, S. F. C., Schreier, L. L., Jenkins, M. C., Russell, B., y Miska, K. B. (2021). The effects of tributyrin supplementation on weight gain and intestinal gene expression in broiler chickens during *Eimeria maxima*-induced coccidiosis. *Poultry Science*, 100(4), 100984. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.01.007>

Hediger, M. A., Cléménçon, B., Burrier, R. E., y Bruford, E. A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2), 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009>

Hill, E. F., y Hoffman, D. J. (1984). Avian Models for Toxicity Testing. *Journal of the American College of Toxicology*, 3(6), 357-376. <https://doi.org/10.3109/10915818409104398>

Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., y Nakatsu, C. H. (2017). Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, 32(4), 300-313. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17017>

Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

Immerseel, F. V., Buck, J. D., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., y Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, 33(6), 537-549. <https://doi.org/10.1080/03079450400013162>

International Chicken Genome Sequencing Consortium. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018), 695-716. <https://doi.org/10.1038/nature03154>

Ireland, J. J., Roberts, R. M., Palmer, G. H., Bauman, D. E., y Bazer, F. W. (2008). A commentary on domestic animals as dual-purpose models that benefit agricultural and biomedical research. *Journal of Animal Science*, 86(10), 2797-2805. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1088>

Iskandar, C. F., Borges, F., Taminiou, B., Daube, G., Zagorec, M., Remenant, B., Leisner, J. J., Hansen, M. A., Sørensen, S. J., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., & Revol-Junelles, A.-M. (2017). Comparative Genomic Analysis Reveals Ecological Differentiation in the Genus *Carnobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00357>

Iwanaga, T., Goto, M., y Watanabe, M. (2005). Cellular distribution of glutamate transporters in the gastrointestinal tract of mice: An immunohistochemical and in situ hybridization approach. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, 26(6), 271-278. <https://doi.org/10.2220/biomedres.26.271>

Jacobs, J., y Braun, J. (2015). Chapter 5 - The Mucosal Microbiome: Imprinting the Immune System of the Intestinal Tract. En J. Mestecky, W. Strober, M. W. Russell, B. L. Kelsall, H. Cheroutre, y B. N. Lambrecht (Eds.), *Mucosal Immunology (Fourth Edition)* (pp. 63-77). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00005-7>

Jacobsen, I. D., Grosse, K., y Hube, B. (2012). Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *845*, 487-496. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_34

Jayasinghe, T. N., Vatanen, T., Chiavaroli, V., Jayan, S., McKenzie, E. J., Adriaenssens, E., Derraik, J. G. B., Ekblad, C., Schierding, W., Battin, M. R., Thorstensen, E. B., Cameron-Smith, D., Forbes-Blom, E., Hofman, P. L., Roy, N. C., Tannock, G. W., Vickers, M. H., Cutfield, W. S., & O'Sullivan, J. M. (2020). Differences in Compositions of Gut Bacterial Populations and Bacteriophages in 5–11 Year-Olds Born Preterm Compared to Full Term. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00276>

Jiang, Z., Applegate, T. J., y Lossie, A. C. (2013). Cloning, Annotation and Developmental Expression of the Chicken Intestinal MUC2 Gene. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053781>

Jiao, N., Wu, Z., Ji, Y., Wang, B., Dai, Z., y Wu, G. (2015). L-Glutamate Enhances Barrier and Antioxidative Functions in Intestinal Porcine Epithelial Cells. *The Journal of Nutrition*, *145*(10), 2258-2264. <https://doi.org/10.3945/jn.115.217661>

Johansson, M. E. V., y Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(10), 639-649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>

Johansson, M. E. V., Jakobsson, H. E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F., y Hansson, G. C. (2015). Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell host y microbe*, *18*(5), 582-592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007>

Johnson, L. R., Barret, K. E., Gishan, F. K., Merchant, J. L., Said, H. M., y Wood, J. D. (2012). Physiology of the gastrointestinal tract. Vadivel Ganapathy Chapter 59

Johnson, L. R., y Gerwin, T. A. (Eds.). (2007). *Gastrointestinal physiology*. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier.

Jones, S., Lister, S. and Roberts, V. 2013. *Practical Slaughter of Poultry: A guide for the small producer*. Humane Slaughter Association. <https://www.hsa.org.uk/downloads/publications/hsa-practical-slaughter-of-poultry.pdf> Wheathampstead, Herts, United Kingdom. Fecha de consulta: 11 de mayo de 2020.

Kaakoush, N. O., Sodhi, N., Chenu, J. W., Cox, J. M., Riordan, S. M., & Mitchell, H. M. (2014). The interplay between *Campylobacter* and *Helicobacter* species and other

gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Gut Pathogens*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-18>

Kaiser, P. (2012). The long view: A bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post-genome. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 41(6), 511-518. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.735359>

Kaminski, N. A., y Wong, E. A. (2018). Differential mRNA expression of nutrient transporters in male and female chickens. *Poultry Science*, 97(1), 313-318. <https://doi.org/10.3382/ps/pex262>

Kapus, A., & Szászi, K. (2006). Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 84(6), 870-880. <https://doi.org/10.1139/o06-202>

Kararli, T. T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics y Drug Disposition*, 16(5), 351-380. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>

Kato, T., y Owen, R. L. (2005). Chapter 8—Structure and Function of Intestinal Mucosal Epithelium. En J. Mestecky, M. E. Lamm, J. R. McGhee, J. Bienenstock, L. Mayer, y W. Strober (Eds.), *Mucosal Immunology (Third Edition)* (pp. 131-151). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012491543-5/50012-7>

Katongole, J. B., y March, B. E. (1979). Fatty acid binding protein in the intestine of the chicken. *Poultry Science*, 58(2), 372-375. <https://doi.org/10.3382/ps.0580372>

Kayama, H., Okumura, R., y Takeda, K. (2020). Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annual Review of Immunology*, 38(1), 23-48. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115104>

Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., y Smidt, H. (2018). Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235>

Kerstens, K., Vos, P. D., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. *The Prokaryotes*, 3-37. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1

Khan, M. T., Duncan, S. H., Stams, A. J. M., van Dijk, J. M., Flint, H. J., y Harmsen, H. J. M. (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *The ISME Journal*, 6(8), 1578-1585. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.5>

Khanna, S. (2018). Microbiota Replacement Therapies: Innovation in Gastrointestinal Care. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 103(1), 102-111. <https://doi.org/10.1002/cpt.923>

Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 30(2), 145-159. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>

Kim, H.-R., Park, S.-W., Cho, H.-J., Chae, K.-A., Sung, J.-M., Kim, J.-S., Landowski, C. P., Sun, D., Abd El-Aty, A. M., Amidon, G. L., & Shin, H.-C. (2007). Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans. *Pharmacological Research*, 56(3), 224-236. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.06.005>

Kim, J. E., Lillehoj, H. S., Hong, Y. H., Kim, G. B., Lee, S. H., Lillehoj, E. P., y Bravo, D. M. (2015). Dietary Capsicum and Curcuma longa oleoresins increase intestinal microbiome and necrotic enteritis in three commercial broiler breeds. *Research in Veterinary Science*, 102, 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.022>

Klasing, K. C. (1999). Avian gastrointestinal anatomy and physiology. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 8(2), 42-50. [https://doi.org/10.1016/S1055-937X\(99\)80036-X](https://doi.org/10.1016/S1055-937X(99)80036-X)

Kogut, M. (2017). Gut health in poultry. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 12(031). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201712031>

Kollarcikova, M., Kubasova, T., Karasova, D., Crhanova, M., Cejkova, D., Sisak, F., y Rychlik, I. (2019). Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota. *Poultry Science*, 98(6), 2347-2353. <https://doi.org/10.3382/ps/pey594>

Kong, S., Zhang, Y. H., y Zhang, W. (2018). Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International*, 2018, 2819154. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>

Kong, S.-E., Heel, K., McCauley, R., & Hall, J. (1998). The Role of Enterocytes in Gut Dysfunction. *Pathology - Research and Practice*, 194(11), 741-751. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(98\)80063-0](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(98)80063-0)

König, H. E., Korbelt, R., Liebich, H. G., Bragulla, H., Budras, K. D., Romay, A. C. and Mišek, I. 2016. Avian Anatomy: Textbook and Colour Atlas. 5M Publishing. Pp. 92 – 117

Kono, T., Nishida, M., Nishiki, Y., Seki, Y., Sato, K., y Akiba, Y. (2005). Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *British Poultry Science*, 46(4), 510-515. <https://doi.org/10.1080/00071660500181289>

Kostic, A. D., Howitt, M. R., y Garrett, W. S. (2013). Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. *Genes y Development*, 27(7), 701-718. <https://doi.org/10.1101/gad.212522.112>

Kovatcheva-Datchary, P., y Arora, T. (2013). Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. *Best Practice y Research. Clinical Gastroenterology*, 27(1), 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.017>

Kraehenbuhl, J.-P., Pringault, E., y Neutra, M. R. (1997). Review article: Intestinal epithelia and barrier functions. *Alimentary Pharmacology y Therapeutics*, 11(s3), 3-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.1997.tb00803.x>

Kubasova, T., Kollarcikova, M., Crhanova, M., Karasova, D., Cejkova, D., Sebkova, A., Matiasovicova, J., Faldynova, M., Sisak, F., Babak, V., Pokorna, A., Cizek, A., y Rychlik, I. (2019). Gut Anaerobes Capable of Chicken Caecum Colonisation. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120597>

Kubasova, T., Seidlerova, Z., y Rychlik, I. (2021). Ecological Adaptations of Gut Microbiota Members and Their Consequences for Use as a New Generation of Probiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5471. <https://doi.org/10.3390/ijms22115471>

Laanbroek, H. J., Smit, A. J., Nulend, G. K., y Veldkamp, H. (1979). Competition for L-glutamate between specialised and versatile Clostridium species. *Archives of Microbiology*, 120(1), 61-66. <https://doi.org/10.1007/BF00413275>

Laudadio, V., Dambrosio, A., Normanno, G., Khan, R. U., Naz, S., Rowghani, E., y Tufarelli, V. (2012). Effect of Reducing Dietary Protein Level on Performance Responses and some Microbiological Aspects of Broiler Chickens under Summer Environmental Conditions. *Avian Biology Research*, 5(2), 88-92. <https://doi.org/10.3184/175815512X13350180713553>

Laukens, D., Brinkman, B. M., Raes, J., De Vos, M., y Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 117-132. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv036>

Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., y Leisner, J. (2005). Carnobacterium divergens and Carnobacterium maltaromaticum as spoilers or protective cultures in meat and seafood: Phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and applied microbiology*. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2004.12.001>

Lavin, S. R., Karasov, W. H., Ives, A. R., Middleton, K. M., & Garland Jr., T. (2008). Morphometrics of the Avian Small Intestine Compared with That of Nonflying Mammals: A Phylogenetic Approach. *Physiological and Biochemical Zoology: Ecological and Evolutionary Approaches*, 81(5), 526-550. <https://doi.org/10.1086/590395>

Lee, R., y Mezoff, E. A. (2021). 30—Anatomy and Physiology of the Small and Large Intestines. En R. Wyllie, J. S. Hyams, y M. Kay (Eds.), *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease (Sixth Edition)* (pp. 308-320.e3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67293-1.00030-X>

Leite, G. G. S., Weitsman, S., Parodi, G., Celly, S., Sedighi, R., Sanchez, M., Morales, W., Villanueva-Millan, M. J., Barlow, G. M., Mathur, R., Lo, S. K., Jamil, L. H., Paski, S., Rezaie, A., & Pimentel, M. (2020). Mapping the Segmental Microbiomes in the Human Small Bowel in Comparison with Stool: A REIMAGINE Study. *Digestive*

Diseases and Sciences, 65(9), 2595-2604. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06173-x>

Lennernas, H. (2007). Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 37(10-11), 1015-1051. <https://doi.org/10.1080/00498250701704819>

Li, J., Li, R. X., Liu, G., Lv, C. F., Mi, Y. L., y Zhang, C. Q. (2017). Effect of melatonin on renewal of chicken small intestinal mucosa. *Poultry Science*, 96(8), 2942-2949. <https://doi.org/10.3382/ps/pex085>

Li, Y., Liu, X.-Y., Ma, M.-M., Qi, Z.-J., Zhang, X.-Q., Li, Z., Cao, G.-H., Li, J., Zhu, W.-W., & Wang, X.-Z. (2014). Changes in intestinal microflora in rats with acute respiratory distress syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5849-5858. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5849>

Li, Y., Xu, Q., Huang, Z., Lv, L., Liu, X., Yin, C., Yan, H., y Yuan, J. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 195-204. <https://doi.org/10.1111/jam.12972>

Lili, Q., Xiaohui, L., Haiguang, M., y Jinbo, W. (2021). Clostridium butyricum Induces the Production and Glycosylation of Mucins in HT-29 Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2021.668766>

Lin, J. (2011). Effect of Antibiotic Growth Promoters on Intestinal Microbiota in Food Animals: A Novel Model for Studying the Relationship between Gut Microbiota and Human Obesity? *Frontiers in Microbiology*, 2, 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00053>

Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(8), 543-560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>

Linton, A. H. (1977). Animal To Man Transmission of Enterobacteriaceae. *Royal Society of Health Journal*, 97(3), 115-118. <https://doi.org/10.1177/146642407709700308>

Liu, J., Stewart, S. N., Robinson, K., Yang, Q., Lyu, W., Whitmore, M. A., y Zhang, G. (2021). Linkage between the intestinal microbiota and residual feed intake in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00542-2>

Liu, L., Li, Q., Yang, Y., y Guo, A. (2021). Biological Function of Short-Chain Fatty Acids and Its Regulation on Intestinal Health of Poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.736739>

Liu, Y., Yu, X., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., y Chen, W. (2020). The role of MUC2 mucin in intestinal homeostasis and the impact of dietary components on MUC2 expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 884-891. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.191>

Lopetuso, L. R., Scaldaferrri, F., Petito, V., y Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens*, 5(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-23>

Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J., y Lee, M. D. (2003). Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6816-6824. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003>

Ludwig, W., Schleifer, K., & Whitman, W. (2015). *Carnobacteriaceae fam. Nov.* <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00124>

Lumpkins, B. S., Batal, A. B., y Lee, M. (2008). The effect of gender on the bacterial community in the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science*, 87(5), 964-967. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00287>

Luo, Y., Peng, H., Wright, A.-D. G., Bai, S., Ding, X., Zeng, Q., Li, H., Zheng, P., Su, Z., Cui, R., y Zhang, K. (2013). Broilers fed dietary vitamins harbor higher diversity of cecal bacteria and higher ratio of Clostridium, Faecalibacterium, and Lactobacillus than broilers with no dietary vitamins revealed by 16S rRNA gene clone libraries. *Poultry Science*, 92(9), 2358-2366. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02935>

Madsen, S. L., y Wong, E. A. (2011). Expression of the chicken peptide transporter 1 and the peroxisome proliferator-activated receptor α following feed restriction and subsequent refeeding. *Poultry Science*, 90(10), 2295-2300. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01173>

Mancabelli, L., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Viappiani, A., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., y Ventura, M. (2016). Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4727-4738. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13363>

Martens, E. C., Neumann, M., y Desai, M. S. (2018). Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(8), 457-470. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0036-x>

Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Possemiers, S., Benner, J., Verstraete, W., y Van de Wiele, T. (2011). Studying the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract: Basic concepts and in vitro approaches. *Annals of Microbiology*, 61(4), 709-715. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0242-5>

McCarthy, F. M., Pendarvis, K., Cooksey, A. M., Gresham, C. R., Bomhoff, M., Davey, S., Lyons, E., Sonstegard, T. S., Bridges, S. M., y Burgess, S. C. (2019). Chickspress: A resource for chicken gene expression. *Database*, 2019. <https://doi.org/10.1093/database/baz058>

Meehan, C. J., y Beiko, R. G. (2014). A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. *Genome Biology and Evolution*, 6(3), 703-713. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu050>

Melhem, H., Regan-Komito, D., y Niess, J. H. (2021). Mucins Dynamics in Physiological and Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13642. <https://doi.org/10.3390/ijms222413642>

Meng, H., Zhang, Y., Zhao, L., Zhao, W., He, C., Honaker, C. F., Zhai, Z., Sun, Z., y Siegel, P. B. (2014). Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota. *PloS One*, 9(3), e89862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089862>

Mignon-Grasteau, S., Narcy, A., Rideau, N., Chantry-Darmon, C., Boscher, M.-Y., Sellier, N., Chabault, M., Konsak-Ilievski, B., Le Bihan-Duval, E., y Gabriel, I. (2015). Impact of Selection for Digestive Efficiency on Microbiota Composition in the Chicken. *PloS One*, 10(8), e0135488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135488>

Miska, K. B., Fetterer, R. H., y Wong, E. A. (2015). mRNA expression of amino acid transporters, aminopeptidase, and the di- and tri-peptide transporter PepT1 in the intestine and liver of posthatch broiler chicks. *Poultry Science*, 94(6), 1323-1332. <https://doi.org/10.3382/ps/pev059>

Moini, J. (2020). *Anatomy and physiology for health professionals* (Third edition). Jones y Bartlett LeRNAing.

Moon, Y. (2017). Mucosal Exposome and Food Toxicity Biomarkers. En Sachan, A., Hendrich, S. *Food Toxicology: Current Advances and Future Challenges*. (pp. 28-32). Oakville, ON, Canada: Apple Academic Press Inc.

Moretó, M., y Planas, J. M. (1989). Sugar and amino acid transport properties of the chicken ceca. *The Journal of Experimental Zoology. Supplement: Published Under Auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry*, 3, 111-116. <https://doi.org/10.1002/jez.1402520518>

Mott, C. R., Siegel, P. B., Webb, K. E., y Wong, E. A. (2008). Gene expression of nutrient transporters in the small intestine of chickens from lines divergently selected for high or low juvenile body weight. *Poultry Science*, 87(11), 2215-2224. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00101>

Mulder, I. E., Schmidt, B., Stokes, C. R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R. I., Prosser, J. I., Gill, B. P., Pluske, J. R., Mayer, C.-D., Musk, C. C., & Kelly, D. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-79>

Nassar, F. S. (2018). Poultry as an Experimental Animal Model in Medical Research and Pharmaceutical Industry. *Biomedical Journal of Scientific y Technical Research*, 2(3). <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.02.000751>

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Division on Earth and Life Studies, Board on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology, y Committee on Advancing Understanding of the Implications of Environmental-Chemical Interactions with the Human Microbiome. (2017). *Environmental Chemicals*,

the Human Microbiome, and Health Risk: A Research Strategy. National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481560/>

Nava, G. M., Lee, D. Y., Ospina, J. H., Cai, S.-Y., y Gaskins, H. R. (2009). Genomic analyses reveal a conserved glutathione homeostasis pathway in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *Physiological Genomics*, 39(3), 183-194. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2009>

Nava, G. M., y Stappenbeck, T. S. (2011). Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes*, 2(2), 99-104. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15416>

Navale, A. M., y Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: Physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, 8(1), 5-9. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>

Netter, F. H., y Reynolds, J. C. (2016). *The Netter collection of medical illustrations. Volume 9, Part III, Volume 9, Part III.* <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20090638605>

Niot, I., Poirier, H., Tran, T. T. T., y Besnard, P. (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: Evidence and uncertainties. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 101-115. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.01.001>

Ngunjiri, J. M., Taylor, K. J. M., Abundo, M. C., Jang, H., Elaish, M., Kc, M., Ghorbani, A., Wijeratne, S., Weber, B. P., Johnson, T. J., & Lee, C.-W. (2019). Farm Stage, Bird Age, and Body Site Dominantly Affect the Quantity, Taxonomic Composition, and Dynamics of Respiratory and Gut Microbiota of Commercial Layer Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.03137-18>

Nobo, G., Moreki, J., y Nsoso, S. J. (2012). Feed Intake, Body Weight, Average Daily Gain, Feed Conversion Ratio and Carcass Characteristics of Helmeted Guinea Fowl Fed Varying Levels of Phane Meal (*Imbrasia belina*) as Replacement of Fishmeal under Intensive System. *International Journal of Poultry Science*, 11, 378-384. <https://doi.org/10.3923/ijps.2012.378.384>

Nurmi, E., & Rantala, M. (1973). New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature*, 241(5386), 210-211. <https://doi.org/10.1038/241210a0>

Oakley, B. B., y Kogut, M. H. (2016). Spatial and Temporal Changes in the Broiler Chicken Cecal and Fecal Microbiomes and Correlations of Bacterial Taxa with Cytokine Gene Expression. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00011>

Oakley, B. B., Lillehoj, H. S., Kogut, M. H., Kim, W. K., Maurer, J. J., Pedroso, A., Lee, M. D., Collett, S. R., Johnson, T. J., y Cox, N. A. (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 360(2), 100-112. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608>

Ockner, R. K., & Manning, J. A. (1974). Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *The Journal of Clinical Investigation*, 54(2), 326-338. <https://doi.org/10.1172/JCI107768>

Ojediran, T. K., Fasola, M. O., Oladele, T. O., Onipede, T. L., y Emiola, I. A. (2017). Growth performance, flock uniformity and economic indices of broiler chickens fed low crude protein diets supplemented with lysine. *Archivos de Zootecnia*, 66(256), 543-550.

Okumura, R., y Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental y Molecular Medicine*, 49(5), e338. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.20>

Okumura, R., y Takeda, K. (2018). Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflammation and Regeneration*, 38(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0063-z>

Oliveira, A. B., Moura, C. F. H., Gomes-Filho, E., Marco, C. A., Urban, L., y Miranda, M. R. A. (2013). The Impact of Organic Farming on Quality of Tomatoes Is Associated to Increased Oxidative Stress during Fruit Development. *PLOS ONE*, 8(2), e56354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056354>

Organización Mundial de la Salud (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food.

Ouwerkerk, J. P., de Vos, W. M., y Belzer, C. (2013). Glycobiome: Bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice y Research. Clinical Gastroenterology*, 27(1), 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.001>

Pan, D., y Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5(1), 108-119. <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>

Paone, P., y Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? *Gut*, gutjnl-2020-322260. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>

Pavan, S., Desreumaux, P., y Mercenier, A. (2003). Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(4), 696-701. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.4.696-701.2003>

Pedroso, A. A., Lee, M. D., y Maurer, J. J. (2021). Strength Lies in Diversity: How Community Diversity Limits Salmonella Abundance in the Chicken Intestine. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.694215>

Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E. L., Wising, C., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, 260(1), 8-20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00086>

Pham, N.-P., Layec, S., Dugat-Bony, E., Vidal, M., Irlinger, F., & Monnet, C. (2017). Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: Insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics*, 18, 955. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4322-1>

Pinca, A. M., Bautista, H. N. F., Adiova, C. B., y Sangel, P. P. (2019). *Comparative Expression Analysis of Small Intestine Nutrient Transporters Sodium/Glucose Cotransporter 1 (SGLT1) and Peptide Transporter 1 (PepT1) between Itik Pinas (Anas platyrhynchos L.) and Commercial Layer Chicken (Gallus gallus domesticus)*. 148(3), 7.

Poulsen, S. B., Fenton, R. A., & Rieg, T. (2015). Sodium-glucose cotransport. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 24(5), 463-469. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000152>

Primec, M., Škorjanc, D., Langerholc, T., Mičetić-Turk, D., y Gorenjak, M. (2021). Specific *Lactobacillus* probiotic strains decrease transepithelial glucose transport through GLUT2 downregulation in intestinal epithelial cell models. *Nutrition Research*, 86, 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.11.008>

Raimondi, S., Musmeci, E., Candeliere, F., Amaretti, A., y Rossi, M. (2021). Identification of mucin degraders of the human gut microbiota. *Scientific Reports*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90553-4>

Rampelli, S., Candela, M., Turrone, S., Biagi, E., Pflueger, M., Wolters, M., Ahrens, W., y Brigidi, P. (2016). Microbiota and lifestyle interactions through the lifespan. *Trends in Food Science y Technology*, 57, 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.003>

Ranjitkar, S., Lawley, B., Tannock, G., y Engberg, R. M. (2016). Bacterial Succession in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(8), 2399-2410. <https://doi.org/10.1128/AEM.02549-15>

Redweik, G. (2021). *Using prophylactics to improve resistance against Enterobacteriaceae in chickens* [Doctor of Philosophy, Iowa State University]. <https://doi.org/10.31274/etd-20210609-158>

Reynolds, J. C. (2016). *The Netter Collection of Medical Illustrations: Digestive System: Part III-Liver, etc.* E-Book. Elsevier Health Sciences.

Reynolds, K. L., Cloft, S. E., & Wong, E. A. (2020). Changes with age in density of goblet cells in the small intestine of broiler chicks. *Poultry Science*, 99(5), 2342-2348. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.052>

Richards, P., Fothergill, J., Bernardeau, M., y Wigley, P. (2019). Development of the Caecal Microbiota in Three Broiler Breeds. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 201. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00201>

Richards-Rios, P., Fothergill, J., Bernardeau, M., y Wigley, P. (2020). Development of the Ileal Microbiota in Three Broiler Breeds. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00017>

Ringel, Y., Maharshak, N., Ringel-Kulka, T., Wolber, E. A., Sartor, R. B., y Carroll, I. M. (2015). High throughput sequencing reveals distinct microbial populations within the mucosal and luminal niches in healthy individuals. *Gut Microbes*, 6(3), 173-181. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1044711>

Royo, D., Méndez-García, C., Raczowska, B. A., Bargiela, R., Moya, A., Ferrer, M., & Barbas, C. (2017). Exploring the human microbiome from multiple perspectives: Factors altering its composition and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(4), 453-478. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw046>

Roto, S. M., Kwon, Y. M., y Ricke, S. C. (2016). Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 63. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00063>

Rumsey, D. (2005). SMALL INTESTINE | Structure and Function. En B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)* (pp. 126-133). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226694-3/02255-9>

Rychlik, I. (2020). Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010103>

Salvo-Romero, E., Alonso-Cotner, C., Pardo-Camacho, C., y Casado-Bedmar, M. (2015). Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev Esp Enferm Dig*, 107, 11.

Sánchez-Tapia, M., Tovar, A. R., y Torres, N. (2019). Diet as Regulator of Gut Microbiota and its Role in Health and Disease. *Archives of Medical Research*, 50(5), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.09.004>

Scanes, C. G. (2020). Avian Physiology: Are Birds Simply Feathered Mammals? *Frontiers in Physiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.542466>

Scanes, C. G., y Pierzchala-Koziec, K. (2014). Biology of the Gastrointestinal Tract in Poultry. *Avian Biology Research*, 7(4), 193-222. <https://doi.org/10.3184/175815514X14162292284822>

Schokker, D., Veninga, G., Vastenhouw, S. A., Bossers, A., de Bree, F. M., Kaal-Lansbergen, L. M. T. E., Rebel, J. M. J., y Smits, M. A. (2015). Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines. *BMC Genomics*, 16, 418. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1646-6>

Schoultz, I., y Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8), 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>

Schroeder, B. O. (2019). Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report*, 7(1), 3-12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>

Schweikhard, E. S., & Ziegler, C. M. (2012). Amino acid secondary transporters: Toward a common transport mechanism. *Current Topics in Membranes*, 70, 1-28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00001-6>

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>

Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T. A., Bedford, M. R., Penn, C. W., y Pallen, M. J. (2014). Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941>

Sfanos, K. S., Markowski, M. C., Peiffer, L. B., Ernst, S. E., White, J. R., Pienta, K. J., Antonarakis, E. S., & Ross, A. E. (2018). Compositional differences in gastrointestinal microbiota in prostate cancer patients treated with androgen axis-targeted therapies. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 21(4), 539-548. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0061-x>

Shalev, B. A., & Pasternak, H. (1995). Incremental changes in and distribution of chick weight with hen age in four poultry species. *British Poultry Science*, 36(3), 415-424. <https://doi.org/10.1080/00071669508417788>

Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B., y Kim, W. K. (2018). Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 254. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00254>

Shehata, A. M., Paswan, V. K., Attia, Y. A., Abdel-Moneim, A.-M. E., Abougabal, M. S., Sharaf, M., Elmazoudy, R., Alghafari, W. T., Osman, M. A., Farag, M. R., & Alagawany, M. (2021). Managing Gut Microbiota through In Ovo Nutrition Influences Early-Life Programming in Broiler Chickens. *Animals*, 11(12), 3491. <https://doi.org/10.3390/ani11123491>

Shi, H., & Walker, W. (2015). Development and Physiology of the Intestinal Mucosal Defense. *Mucosal Immunology: Fourth Edition*, 1, 9-29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00002-1>

Shibata, M., Takahashi, T., Kozakai, T., Kakudo, M., Kasuga, S., Azuma, Y., y Kurose, Y. (2019). Active transport of glucose across the jejunal epithelium decreases with age in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(6), 2570-2576. <https://doi.org/10.3382/ps/pez002>

Shimizu, K., Komaki, Y., Fukano, N., y Bungo, T. (2018). Transporter Gene Expression and Transference of Fructose in Broiler Chick Intestine. *The Journal of Poultry Science*, 55(2), 137-141. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170095>

Shini, S., Bryden, W. L., Shini, S., y Bryden, W. L. (2021). Probiotics and gut health: Linking gut homeostasis and poultry productivity. *Animal Production Science*. <https://doi.org/10.1071/AN20701>

Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleer, P., Jacques, M., y Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 387. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00387>

Sidel, P. S. (1986). Software Reviews: Statview, Version 1.0. *Social Science Microcomputer Review*, 4(2), 232-237. <https://doi.org/10.1177/089443938600400211>

Simon, K., de Vries Reilingh, G., Kemp, B., y Lammers, A. (2014). Development of ileal cytokine and immunoglobulin expression levels in response to early feeding in broilers and layers. *Poultry Science*, 93(12), 3017-3027. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04225>

Slawinska, A., Dunislawaska, A., Plowiec, A., Radomska, M., Lachmanska, J., Siwek, M., Tavaniello, S., y Maiorano, G. (2019). Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212318>

Sm, J., R, T., C, S., H, V., M, S., y D, N. R. (2015, julio 8). *Role of the normal gut microbiota*. *World Journal of Gastroenterology; World J Gastroenterol*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>

Smathers, R. L., & Petersen, D. R. (2011). The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Human Genomics*, 5(3), 170. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-3-170>

Smirnov, A., Perez, R., Amit-Romach, E., Sklan, D., y Uni, Z. (2005). Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine Are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth Promoter Supplementation. *The Journal of Nutrition*, 135(2), 187-192. <https://doi.org/10.1093/jn/135.2.187>

Smirnov, A., Tako, E., Ferket, P. R., y Uni, Z. (2006). Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. *Poultry Science*, 85(4), 669-673. <https://doi.org/10.1093/ps/85.4.669>

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., y Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16731-16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>

Sood, U., Gupta, V., Kumar, R., Lal, S., Fawcett, D., Rattan, S., Poinern, G. E. J., y Lal, R. (2020). Chicken Gut Microbiome and Human Health: Past Scenarios, Current Perspectives, and Futuristic Applications. *Indian Journal of Microbiology*, 60(1), 2-11. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00785-2>

Sorbara, M. T., Littmann, E. R., Fontana, E., Moody, T. U., Kohout, C. E., Gjonbalaj, M., Eaton, V., Seok, R., Leiner, I. M., y Pamer, E. G. (2020). Functional and Genomic Variation between Human-Derived Isolates of Lachnospiraceae Reveals Inter- and

Intra-Species Diversity. *Cell Host y Microbe*, 28(1), 134-146.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.005>

Sorokulova, I. (2008). Preclinical testing in the development of probiotics: A regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 2, S92-95; discussion S144-151. <https://doi.org/10.1086/523334>

Spanier, B., y Rohm, F. (2018). Proton Coupled Oligopeptide Transporter 1 (PepT1) Function, Regulation, and Influence on the Intestinal Homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 8(2), 843-869. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170038>

Stanley, D., Hughes, R. J., Geier, M. S., y Moore, R. J. (2016). Bacteria within the Gastrointestinal Tract Microbiota Correlated with Improved Growth and Feed Conversion: Challenges Presented for the Identification of Performance Enhancing Probiotic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7, 187. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00187>

Steffansen, B., Nielsen, C. U., Brodin, B., Eriksson, A. H., Andersen, R., y Frokjaer, S. (2004). Intestinal solute carriers: An overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.10.010>

Stern, C. D. (2005). The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. *Developmental Cell*, 8(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.11.018>

Stevens, C. E., y Hume, I. D. (1998). Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. *Physiological Reviews*, 78(2), 393-427. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.393>

Stevens, C. E., y Hume, I. D. (2004). *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. Cambridge University Press. <https://books.google.com.mx/books?id=DZuAsci2apAC>

Su, X., & Abumrad, N. A. (2009). Cellular fatty acid uptake: A pathway under construction. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(2), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.001>

Sureshkumar, S., Lee, H. C., Jung, S. K., Kim, D., Oh, K. B., Yang, H., Jo, Y. J., Lee, H. S., Lee, S., y Byun, S. J. (2021). Inclusion of *Lactobacillus salivarius* strain revealed a positive effect on improving growth performance, fecal microbiota and immunological responses in chicken. *Archives of Microbiology*, 203(2), 847-853. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02088-3>

Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Levchuk, V. P., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Stepanshin, J., Dyatlov, I., Seal, B. S., y Stern, N. J. (2011). Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and Characterization of Its Bacteriocin, Including the Antimicrobial Activity Spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2749-2754. <https://doi.org/10.1128/AEM.02481-10>

Takiishi, T., Fenero, C. I. M., y Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*, 5(4). <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>

Tandoğan, M., y Çiçek, H. (2016). Technical Performance and Cost Analysis of Broiler Production in Turkey. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18, 169-174. <https://doi.org/10.1590/18069061-2015-0017>

Taylor, R. (1990). Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 6(1), 35-39. <https://doi.org/10.1177/875647939000600106>

Tinker, D. A., Brosnan, J. T., y Herzberg, G. R. (1986). Interorgan metabolism of amino acids, glucose, lactate, glycerol and uric acid in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biochemical Journal*, 240(3), 829-836.

Tokuhara, D., Kurashima, Y., Kamioka, M., Nakayama, T., Ernst, P., y Kiyono, H. (2019). A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 68(1), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.09.004>

Tortora, G. J., y Derrickson, B. (2017). *Principles of anatomy y physiology*.

Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., y Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host y Microbe*, 21(4), 433-442. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.010>

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., y Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>

Uni, Z., Noy, Y., y Sklan, D. (1996). Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. *British Poultry Science*, 37(1), 63-71. <https://doi.org/10.1080/00071669608417837>

Uni, Z., Smirnov, A., y Sklan, D. (2003). Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. *Poultry Science*, 82(2), 320-327. <https://doi.org/10.1093/ps/82.2.320>

Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>

Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., y Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 361, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>

van der Wielen, P. W. J. J., Lipman, L. J. A., van Knapen, F., y Biesterveld, S. (2002). Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus*

crispatus and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 555-559. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.555-559.2002>

Viennois, E., Pujada, A., Zen, J., y Merlin, D. (2018). Function, Regulation, and Pathophysiological Relevance of the POT Superfamily, Specifically PepT1 in Inflammatory Bowel Disease. *Comprehensive Physiology*, 8(2), 731-760. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170032>

Volk, N., and Lacy, B. (2017). Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 27(1), 1–13.

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., y Whitman, W. B. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science y Business Media.

Vuik, F., Dicksved, J., Lam, S., Fuhler, G., van der Laan, L., van de Winkel, A., Konstantinov, S., Spaander, M., Peppelenbosch, M., Engstrand, L., & Kuipers, E. (2019). Composition of the mucosa-associated microbiota along the entire gastrointestinal tract of human individuals. *United European Gastroenterology Journal*, 7(7), 897-907. <https://doi.org/10.1177/2050640619852255>

Walthall, K., Cappon, G. D., Hurtt, M. E., y Zoetis, T. (2005). Postnatal development of the gastrointestinal system: A species comparison. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 74(2), 132-156. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20040>

Wang, B. X., Wu, C. M., y Ribbeck, K. (2021). Home, sweet home: How mucus accommodates our microbiota. *The FEBS Journal*, 288(6), 1789-1799. <https://doi.org/10.1111/febs.15504>

Wang, J., Fan, H., Han, Y., Wei, J., Zhao, J., y Zhou, Z. (2016). Pyrosequencing of the broiler chicken gastrointestinal tract reveals the regional similarity and dissimilarity of microbial community. *Canadian Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.1139/cjas-2015-0120>

Wang, Z., Yue, Y.-X., Liu, Z.-M., Yang, L.-Y., Li, H., Li, Z.-J., Li, G.-X., Wang, Y.-B., Tian, Y.-D., Kang, X.-T., y Liu, X.-J. (2019). Genome-Wide Analysis of the FABP Gene Family in Liver of Chicken (*Gallus gallus*): Identification, Dynamic Expression Profile, and Regulatory Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235948>

Warren, W. C., Hillier, L. W., Tomlinson, C., Minx, P., Kremitzki, M., Graves, T., Markovic, C., Bouk, N., Pruitt, K. D., Thibaud-Nissen, F., Schneider, V., Mansour, T. A., Brown, C. T., Zimin, A., Hawken, R., Abrahamsen, M., Pyrkosz, A. B., Morisson, M., Fillon, V., ... Cheng, H. H. (2016). A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 7(1), 109-117. <https://doi.org/10.1534/g3.116.035923>

Watford, M. (2015). Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? *Animal Nutrition*, 1(3), 119-122. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.008>

Weimer, B. (1999). BREVIBACTERIUM. En R. K. Robinson (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 308-314). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0245>

Weinroth, M. D., Belk, A. D., Dean, C., Noyes, N., Dittoe, D. K., Rothrock, M. J., Jr, Ricke, S. C., Myer, P. R., Henniger, M. T., Ramírez, G. A., Oakley, B. B., Summers, K. L., Miles, A. M., Ault-Seay, T. B., Yu, Z., Metcalf, J. L., & Wells, J. E. (2022). Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. *Journal of Animal Science*, *100*(2), skab346. <https://doi.org/10.1093/jas/skab346>

Wen, C., Yan, W., Mai, C., Duan, Z., Zheng, J., Sun, C., & Yang, N. (2021). Joint contributions of the gut microbiota and host genetics to feed efficiency in chickens. *Microbiome*, *9*(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01040-x>

Wolf, K. K., Paine, M. F., y Watkins, P. B. (2010). 10.05—Metabolic Barrier of the Gastrointestinal Tract*. En C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 53-75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00844-7>

Woudstra, T. D., Drozdowski, L. A., Wild, G. E., Clandinin, M. T., Agellon, L. B., & Thomson, A. B. R. (2004). The age-related decline in intestinal lipid uptake is associated with a reduced abundance of fatty acid-binding protein. *Lipids*, *39*(7), 603-610. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1272-9>

Wright, E. M., Loo, D. D. F., y Hirayama, B. A. (2011). Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiological Reviews*, *91*(2), 733-794. <https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2009>

Wright, E. M., Sala-Rabanal, M., Loo, D. D. F., y Hirayama, B. A. (2012). Chapter 58—Sugar Absorption. En L. R. Johnson, F. K. Ghishan, J. D. Kaunitz, J. L. Merchant, H. M. Said, y J. D. Wood (Eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition)* (pp. 1583-1593). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382026-6.00058-0>

Xiao, Z., Liu, L., Jin, Y., Pei, X., Sun, W., y Wang, M. (2021). Clostridium tyrobutyricum Protects against LPS-Induced Colonic Inflammation via IL-22 Signaling in Mice. *Nutrients*, *13*(1), 215. <https://doi.org/10.3390/nu13010215>

Xiong, W., Lo, J., Chou, K. J., Wu, C., Magnusson, L., Dong, T., & Maness, P. (2018). Isotope-Assisted Metabolite Analysis Sheds Light on Central Carbon Metabolism of a Model Cellulolytic Bacterium Clostridium thermocellum. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01947>

Yadav, M., Verma, M. K., y Chauhan, N. S. (2018). A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*, *200*(2), 203-217. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x>

Yadav, S., y Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0310-9>

Yang, Z., & Liao, S. F. (2019). Physiological Effects of Dietary Amino Acids on Gut Health and Functions of Swine. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 169. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00169>

Yamada, T. and Alpers, D.H. (2003). Textbook of gastroenterology. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins.

Yamashita, M. S. de A., y Melo, E. O. (2018). Mucin 2 (MUC2) promoter characterization: An overview. *Cell and Tissue Research*, 374(3), 455-463. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2916-9>

Yang, Q., Liu, J., Wang, X., Robinson, K., Whitmore, M. A., Stewart, S. N., Zhao, J., y Zhang, G. (2021). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With the Severity of Necrotic Enteritis. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.703693>

Yoshikawa, T., Inoue, R., Matsumoto, M., Yajima, T., Ushida, K., & Iwanaga, T. (2011). Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochemistry and Cell Biology*, 135(2), 183-194. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0779-1>

Zhang, H., Li, D., Liu, L., Xu, L., Zhu, M., He, X., y Liu, Y. (2019). Cellular Composition and Differentiation Signaling in Chicken Small Intestinal Epithelium. *Animals*, 9(11), 870. <https://doi.org/10.3390/ani9110870>

Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., Zhang, H., Xiong, Z., Xue, Y., Tu, J., & Lu, Z. (2018). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of The Total Environment*, 618, 1254-1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>

Zhang, Q., Eicher, S. D., y Applegate, T. J. (2015). Development of intestinal mucin 2, IgA, and polymeric Ig receptor expressions in broiler chickens and Pekin ducks. *Poultry Science*, 94(2), 172-180. <https://doi.org/10.3382/ps/peu064>

Zhou, Q., Lan, F., Li, X., Yan, W., Sun, C., Li, J., Yang, N., y Wen, C. (2021). The Spatial and Temporal Characterization of Gut Microbiota in Broilers. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2021.712226>

Zucker, I., y Beery, A. K. (2010). Males still dominate animal studies. *Nature*, 465(7299), 690. <https://doi.org/10.1038/465690a>

Zwarycz, B., y Wong, E. A. (2013). Expression of the peptide transporters PepT1, PepT2, and PHT1 in the embryonic and posthatch chick. *Poultry Science*, 92(5), 1314-1321. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02826>

9. ANEXOS

Anexo 1. Lugar y condiciones de mantenimiento

a. Crianza y Densidad

Se simularon cercos rectangulares de 4m² y 60 cm de alto (Figura 25). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) recomienda al menos 0,125 m² de espacio de suelo para cada ave. La densidad será de 8 a 9 pollos por m² para el verano y 10 pollos por m² en invierno.



Figura 25. Corrales en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria del INIFAP.

b. Medidas de instalación (French, 1981; Vantress, 2013)

Se acondicionó el espacio físico con las siguientes especificaciones:

1. Se instaló la campana calefactora en la parte central de la habitación de corrales.
2. El día antes de la recepción, se colocó la cama de viruta de madera con una profundidad de 5 cm (Tabla 20).
3. Cada corral contó con su comedero y bebedero.

Tabla 20. Requerimientos mínimos de la cama

Tipo de cama	Profundidad mínima o volumen
Viruta de madera	2.5 cm
Aserrin seco	2.5 cm
Paja	1 kg/m ²
Cascarilla de arroz	5 cm
Cascarilla de girasol	5 cm

Vantress, 2013

c. Medidas de limpieza (Agencia de Cooperación Internacional de Japón, 2017)

Antes de la recepción de los polluelos se llevó a cabo lo siguiente:

1. Lavado de comederos y bebederos y exponer al sol.
2. Lavado de techos, paredes, mallas y pisos con escoba y cepillo.

Diariamente:

1. Barrido del espacio de confinamiento, así como retirar las heces.
2. Lavado de comederos y bebederos.
3. Eliminación viruta de madera mojada y reemplazarla por seca.

Semanalmente:

1. Desinfección de bebederos una vez por semana.
2. Cambio de cama, limpieza y desinfección del sitio una vez por semana.

d. Medidas para el recibimiento (Vantress, 2013, Agencia de Cooperación Internacional de Japón, 2017):

1. Colocar los alimentos apropiados en las bandejas.
2. Colocar el agua en los bebederos. El agua para el primer día debe contener vitaminas y electrolitos (agua con azúcar y vitaminas del complejo B).
3. Aumentar la temperatura del aire a 34°C, encendiendo la campana calefactora.
4. Controlar el cercado y la protección contra las corrientes de aire.
5. Duante las primeras horas y especialmente durante la noche, observar con atención el comportamiento de los pollitos y mantener la temperatura del aire cercana a los 34°C todo el tiempo.

Al recibir los pollitos, cercioramos que estos cumplían con las siguientes características de calidad (ver Anexo 4):

- Bien seco y de plumón largo.
- Ojos grandes, brillantes y activos.
- Pollitos activos y alertas.
- Ombligo completamente cerrado.
- Las patas deben ser brillantes a la vista y cerosas al tacto.
- Las articulaciones tibiotarsianas no deben estar enrojecidas.
- Los pollitos deben estar libre de malformaciones (patas torcidas, cuellos doblados o picos cruzados).

- e. **Condiciones ambientales (Vaca, 1991; Sonaiya y Swan, 2007; Vantress, 2013):**

Iluminación

Consideramos las siguientes condiciones:

1. Las paredes de la habitación fueron de color blanco para permitir la reflexión de la luz.
2. Se suministró 24 horas de luz durante el primer día de alojamiento (Tabla 21), y se usó un solo bloque de oscuridad en un periodo de 24 horas.
3. Se apagó la luz durante la segunda noche para establecer la hora de apagado de las luces.

Tabla 21. Programa de iluminación estándar

Edad en días	Horas de oscuridad	Horas de cambio
0	0	0
1	1	1
100 – 160 gramos (aproximadamente en la segunda semana)	9	8
22	8	1

Vantress, 2013

Temperatura y humedad

Para la temperatura ambiental se tuvieron las siguientes consideraciones:

1. El aumento de la temperatura se llevó a cabo a través del uso de campanas calentadoras de kerosén.
2. Si la humedad es menor que la del rango indicado en la tabla 22, aumente la temperatura de 0,5 a 1 °C. Si la humedad es mayor que la indicada en la tabla, reduzca la temperatura de 0,5 a 1°C.

Tabla 22. Humedad y temperatura ambiental específicas para Cobb 500.

Edad en días	% Humedad relativa	Temperatura ambiental °C
0	30 – 50	32 - 34
7	40 – 60	31
14	40 – 60	27
21	40 - 60	24

Vantress, 2013

Ventilación

La ventilación del galpón fue a través de ventiladores y cortinas para crear una ventilación cruzada (Tabla 23); así se mantuvo una circulación de aire y se evitó la acumulación de dióxido de carbono, amonio y humedad (Sonaiya y Swan, 2007).

Tabla 23. Velocidad máxima de aire al nivel de las aves según edad

Edad de las aves	Metros por segundo	Pies por minuto
0 – 14 días	0.3	60
15 – 21 días	0.5	100

Vantress, 2013

f. Medidas de bioseguridad

1. Se limitó el número de visitantes no esenciales.
2. La puerta se mantuvo cerrada en todo momento y se aplicó un guardapolvo para evitar la entrada de fauna nociva.
3. No se permitió la entrada de ningún animal.
4. Se colocaron trampas para roedores y se instalaron protecciones contra fauna nociva en puertas ventanas.
5. Antes de cualquier manipulación y contacto, se llevó a cabo un lavado y desinfección de manos.
6. Para entrar a los corrales fue necesario el uso de botas estériles desechables.

Anexo 2. Alimentación e hidratación (Vantress, 2013)

1. Se supervisó diariamente el alimento y agua disponible en los comederos y bebederos. Se registró en bitácora de monitoreo del INIFAP.
2. El alimento fue proveído por el INIFAP y cumplió con los requerimientos nutrimentales para pollo de engorde estirpe Cobb (Tabla 24).
3. Energía: 60 – 65%; proteína: 30 – 35% y nutrientes inorgánicos: 2 – 8%.
4. Se utilizaron bebederos de campana automáticos y comederos de tolva colgantes con capacidad de 10 kg. Su altura fue regulada de acuerdo al crecimiento de las aves (Figura 26).



Figura 26. Bebedero de campana automático y comedero de tolva colgante

Tabla 24. Requerimientos nutrimentales para pollo Cobb

	Inicio	Crecimiento	Finalizador 1
CANTIDAD DE ALIMENTO/ave	180 g	700 g	1350 g
PERIODO DE ALIMENTACIÓN (días)	0 - 8	9 - 18	19 - 28
TIPO DE ALIMENTACIÓN	Migaja	Migaja/Pellet	Pellet
Proteína cruda %	21 - 22	19 - 20	18 - 19
Energía metabolizable kcal/kg	2.975	3.025	3.100
Lisina digestible %	1.22	1.12	1.02
Metionina digestible %	0.46	0.45	0.42
Met + Cis digestible %	0.91	0.85	0.80
Triptófano digestible %	0.20	0.18	0.18
Treonina digestible %	0.83	0.73	0.66
Arginina digestible %	1.28	1.18	1.07
Valina digestible %	0.89	0.85	0.76
Isoleucina digestible %	0.77	0.72	0.67
Calcio %	0.90	0.84	0.76
Fósforo disponible %	0.45	0.42	0.38
Sodio %	0.16 - 0.23	0.16 - 0.23	0.16 - 0.23
Cloro %	0.16 - 0.30	0.16 - 0.30	0.16 - 0.30
Potasio %	0.60 - 0.95	0.60 - 0.95	0.60 - 0.95
Ácido linoleico %	1	1	1

Vantress, 2018

Anexo 3. Técnicas de correcto agarre y sacrificio por dislocación cervical

Correcto agarre del pollo (Jones *et al.*, 2013):

1. Colocar ambas manos en las alas, con calma y sin apretar, para evitar el aleteo. **Nota:** Agarrar al pollo por las patas puede provocar dislocación de cadera.
2. Deslizar la mano debajo del cuerpo y apretar las piernas colocando uno o dos dedos entre estas, y apoyar el pecho del pájaro en la palma de la misma mano (Figura 27).
3. Con la mano opuesta, controlar las alas. Nunca se debe invertir al ave.



Figura 27. Agarre correcto de pollos. Jones *et al.*, 2013

Dislocación manual del cuello (aves con peso menor a 3kg) (Jones *et al.*, 2013)

1. Sostener las piernas del ave y las puntas de las alas con una mano, cerca de la cadera del manipulador.
2. Con dos dedos de la otra mano, apretar la cabeza inmediatamente detrás del cráneo con el dedo pulgar debajo del pico (Figura 28).
3. Estirar el cuello hacia abajo, al mismo tiempo de apretar tus nudillos a las vértebras del cuello y jalar la cabeza hacia atrás. NOTA: Debe lograrse en un solo movimiento.

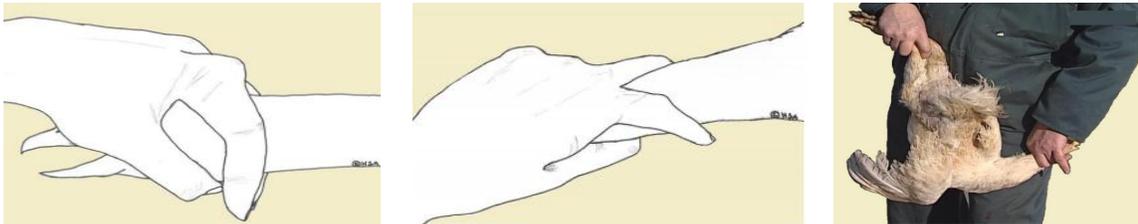


Figura 28. Agarre correcto para dislocación cervical. Jones *et al.*, 2013

Señales de una dislocación exitosa:

- Comprobar un vacío en la vértebra del cuello.
- Asegurarse de que el ave no está respirando.
- Asegurarse de que no hay una reacción de parpadeo, ni dilatación del ojo cuando este es tocado.

Anexo 4. Características de una buena calidad de los polluelos a la hora de recepción

Durante la recepción de los polluelos se aseguró que cumplieran con las características de buena calidad.

Característica	Cumplen	No cumplen
Bien seco y de plumón largo		
Ojos grandes, brillantes y activos		
Activos y alertas		
Ombligo completamente cerrado		
Patas brillantes a la vista y cerosas al tacto		
Articulaciones tibiotarsianas no enrojecidas		
Libres de malformaciones (patas torcidas, cuellos doblados o picos cruzados)		

Vantress, 2013

Registro de buche 1 día post alojamiento

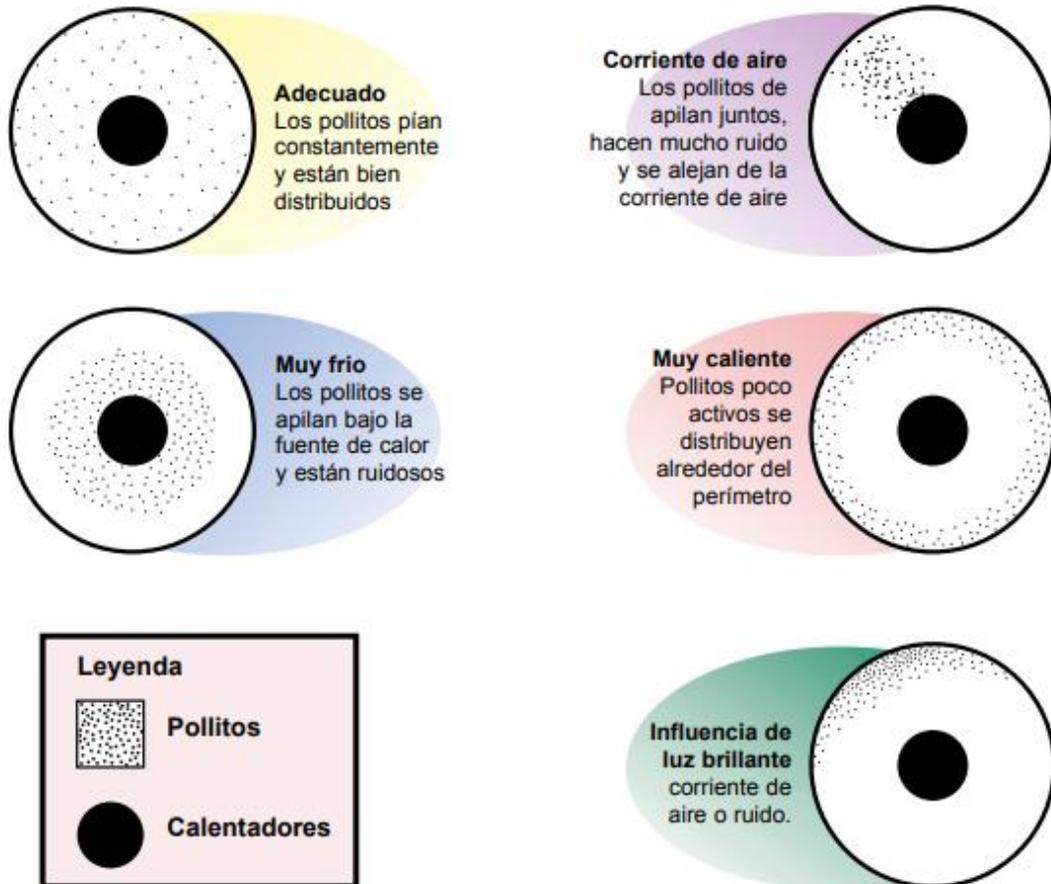
El buche de los pollitos debe ser evaluado a la mañana siguiente del alojamiento para cerciorarse de que ellos han encontrado alimento y agua. En ese momento, como mínimo un 95% de los buches deberían sentirse blandos y elásticos indicando que los pollitos han encontrado exitosamente agua y alimento. Buches duros indican que los pollitos no han encontrado el agua y por lo tanto la disponibilidad del agua debe ser verificada de forma inmediata. Si los buches están demasiado dilatados significa que los pollitos han localizado el agua pero no una cantidad suficiente de alimento. En este caso la disponibilidad y la consistencia del alimento debe ser evaluada de forma inmediata.

Llenado de buche	Lleno- elástico y Alimento agua	Lleno-duro Sólo alimento	Lleno-blando Sólo agua	Vacío
Evaluación	95%			

Anexo 5. Esquema de manejo de crianza

Especialmente en las 2 horas siguientes de su recepción y durante los primeros días, fue necesario verificar la comodidad de los polluelos considerando el comportamiento de las aves y su agrupación.

Crianza Adecuada



Vantress, 2013

Anexo 6. Heatmap de (A) duodeno, (B) yeyuno, (C) íleon y (D) ciegos en los días 1, 7, 15 y 35.

A)

Family	d1	d7	d15	d35
<i>Lactobacillaceae</i>	70-100	70-100	70-100	70-100
<i>Enterobacteriaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Lachnospiraceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Ruminococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Peptostreptococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Enterococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Clostridiaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Streptococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Corynebacteriaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Staphylococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Bacteroidaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Erysipelotrichaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Leuconostocaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Dermabacteraceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Aerococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
Unclassified <i>Clostridiales</i>	10-29	10-29	10-29	10-29

B)

Family	d1	d7	d15	d35
<i>Lactobacillaceae</i>	70-100	70-100	70-100	70-100
<i>Peptostreptococcaceae</i>	70-100	70-100	70-100	70-100
<i>Enterobacteriaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Lachnospiraceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Streptococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Ruminococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Enterococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Clostridiaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Corynebacteriaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Staphylococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Leuconostocaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Bacteroidaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Dermabacteraceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29

C)

Family	d1	d7	d15	d35
<i>Lactobacillaceae</i>	70-100	70-100	70-100	70-100
Unclassified <i>Clostridiales</i>	70-100	70-100	70-100	70-100
<i>Enterococcaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Streptococcaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Enterobacteriaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Clostridiaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Peptostreptococcaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Lachnospiraceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Ruminococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Leuconostocaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29

D)

Family	d1	d7	d15	d35
<i>Ruminococcaceae</i>	10-29	70-100	70-100	70-100
<i>Lachnospiraceae</i>	10-29	70-100	70-100	70-100
<i>Enterobacteriaceae</i>	70-100	10-29	10-29	10-29
<i>Lactobacillaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Erysipelotrichaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Enterococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Bacillaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Clostridiaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Bacteroidaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Streptococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
Unclassified <i>Clostridiales</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Porphyromonadaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Peptostreptococcaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Leuconostocaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
Unclassified	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Gastranaerophilales</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Rikenellaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Christensenellaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29
<i>Desulfovibrionaceae</i>	10-29	10-29	10-29	10-29

