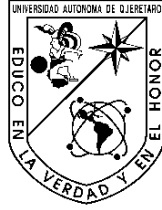


Estudio Bioinformático Del Bacterioma Colónico En Ratas
Tratadas Con Una Lectina Recombinante Del Frijol Tépari
(*Phaseolus Acutifolius*) Bajo Un Esquema Subcrónico

2024

Juan Brandon Araujo Mendoza



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**“ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DEL BACTERIOMA COLÓNICO EN
RATAS TRATADAS CON UNA LECTINA RECOMBINANTE DEL
FRIJOL TÉPARI (*PHASEOLUS ACUTIFOLIUS*) BAJO UN ESQUEMA
SUBCRÓNICO.”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

Juan Brandon Araujo Mendoza

Dirigido por

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Querétaro, Qro. Febrero de 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio bioinformático del bacterioma colónico en
ratas tratadas con una lectina recombinante del frijol
Tépari (*Phaseolus acutifolius*) bajo un esquema
subcrónico.

por

Juan Brandon Araujo Mendoza

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNMAC-195588



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

Estudio bioinformático del bacterioma colónico en ratas tratadas con una lectina recombinante del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) bajo un esquema subcrónico.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Lic. en Microbiología Juan Brandon Araujo Mendoza

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Presidente

Dr. Roberto Álvarez Martínez

Secretario

Dra. Etzel Garrido Espinoza

Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Suplente

Dr. Ulisses Moreno Celis

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de Aprobación por el Consejo Universitario diciembre de 2023

México

Dedicatoria

Para todos los que siguen creyendo en mí.

Para las personas que alguna vez creyeron en mí.

Para las personas que conoceré y de las cuales aprenderé.

Para mi familia que siempre está ahí.

Agradecimientos

Los agradecimientos en esta tesis son extensos, durante este proyecto conocí a muchas valiosas personas, así como muchas otras siguieron mi vida después de la licenciatura. En primera estancia quiero agradecer a la Dra. Teresa García Gasca, no solo por ser mi directora si no por ser una de las figuras académicas que ha seguido creyendo en mi durante tantos años, sin su apoyo mi formación profesional ni siquiera la hubiera concluido, sus ánimos y su confianza en mi sin duda me motivaron todo el tiempo. Así mismo agradezco a mi familia, sé que siempre puedo contar con ellos, así como lo han estado en muchos aspectos de mi vida, sé que no fueron los mejores tiempos, pero siempre estuvieron ahí para mí.

Agradezco mucho al maravilloso equipo de trabajo que conocí en el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales quienes sin su apoyo no podría haber aprendido todas las maravillosas cosas que en este se realizan. Un agradecimiento muy especial al Dr. Roberto Esquivel sin duda aprendí demasiado bajo su tutela, no solo en lo académico sino en lo personal, sin duda fue un excelente pilar de apoyo. Al maestro Misael Rios, de quién aprendí lo maravilloso que puede ser no sólo el trabajo sino el cómo disfrutar todos los grandiosos aspectos de la vida. A Berenice y Sergio quienes aportaron un gran apoyo, con quienes aprendí mucho en todo momento. A la encargada del bioterio Verónica Andrade, cuyos consejos siempre fueron los más acertados y a quién tengo mucha estima. Todo el trabajo que se realizó en bioterio no habría sido igual sin su presencia ahí y representan para mí una parte especial de mi formación.

Agradezco también a toda la maravillosa gente que conocí en el Laboratorio de Biología Celular. A Francisco Josué por ser un excelente compañero, técnico y estar siempre atento a cada una de las inquietudes que teníamos, a la dra. Dulce Palmerín no sólo por la lectina recombinante, sino por ser una gran compañera que siempre ha dado ánimos en cada momento. Al Dr. Ulisses Moreno quién si su gran

apoyo este proyecto no podría haber seguido adelante. A la maestra Berenice quién ha y sigue siendo una amiga muy preciada en muchos sentidos.

Agradezco también a mis sinodales quiénes conozco desde hace mucho tiempo y básicamente han visto desarrollarse mi crecimiento profesional. Al Dr. Roberto gracias por todos los consejos y por enseñarme el maravilloso mundo de la bioinformática, biología de sistemas y modelos complejos sin duda es una gran inspiración. A la Dra. Etzel muchas veces todos los consejos es información que durante sus cursos nos daba llegan volando a mi mente cuando me encuentro atorado en algo, sin duda la tengo en muy alta estima. Al Dr. Carlos Saldaña, a quién conozco desde hace más tiempo, agradezco sus consejos durante los inicios de mi carrera y sobre todo consejos que también me otorgó en lo personal.

Agradezco finalmente a CONAHCYT por el apoyo durante estos dos años que duró la maestría para poder desempeñarme en la investigación además de adquirir mejores experiencias y conocimientos que harán de mi un mejor elemento. Agradezco a la FCN y a la UAQ por el apoyo económico para mi estancia de investigación en el CIAD Mazatlán, fue una experiencia de aprendizaje gratificante. Así mismo a FOPER por darme la oportunidad de enriquecer mi experiencia como investigador con el apoyo que se nos otorgó tanto a mi como al grupo de trabajo.

Índice

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos	4
Índice i	
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	v
Resumen	vi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1. Microbioma	3
2.2 Modelos de estudio del microbioma	6
2.4 Rata Sprague Dawley como modelo de estudio.....	8
2.5 Lectina recombinante rTBL-1 del frijol Tépari	9
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos específicos	15
6. Materiales y métodos	16
6.1 Obtención de rTBL-1.....	16
6.2 Estudio subcrónico	16
6.3 Extracción de ADN y secuenciación masiva.....	18
6.4 Asignación taxonómica	21

6.5	Comparaciones entre grupos midiendo alfa diversidad.	22
7	Resultados y Discusión	24
7.1	Extracción y secuenciación de ADN	24
7.2	Análisis de las secuencias de contenido colónico	26
7.2.1	Análisis del bacterioma por género de acuerdo a la edad de las ratas.	26
7.2.2	Análisis del bacterioma por género después del tratamiento con rTBL-1 por 28 días.	31
7.2.3	Análisis del bacterioma por género después del periodo de recuperación sin tratamiento con rTBL-1 por seis semanas.	35
7.2.4	Comparación del bacterioma por género entre ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas que permanecieron en recuperación sin tratamiento con rTBL-1 por seis semanas.	39
8	Conclusiones	50
9	Referencias Bibliográficas	51
	Anexo 1. Resumen del filtrado de secuencias.	69

Índice de figuras

Figura 1. Conformación del microbioma.	4
Figura 2. Representación esquemática del colon.	5
Figura 3 Esquema de recolección de muestras.	17
Figura 4. Verificación de amplificación PCR de la región V3.	25
Figura 5. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas de seis semanas de edad (tiempo cero).	27
Figura 6. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas de 10 semanas de edad.	27
Figura 7. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas de 10 semanas de edad.	28
Figura 8. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos de acuerdo a la edad.	29
Figura 9. Análisis de la diversidad bacteriana por edad.	30
Figura 10 Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días.	31
Figura 11. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días.	32
Figura 12. Análisis de la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 y sus controles.	33
Figura 13. Análisis de mapas de calor para la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 y sus controles.	34
Figura 14. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y después de un periodo de recuperación de seis semanas.	36
Figura 15. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y después de un periodo de recuperación de seis semanas.	37

Figura 16. Análisis de la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y después de un periodo de recuperación de seis semanas.	38
Figura 17. Análisis de mapas de calor para la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 y sus controles y después de un periodo de recuperación de seis semanas.	39
Figura 18. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos entre ratas recién expuestas a rTBL-1 por 28 días y ratas que se mantuvieron después de un periodo de recuperación de seis semanas.	40
Figura 19. Análisis de la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas tratadas por 28 días y mantenidas en periodo de recuperación de seis semanas.	41
Figura 20. Análisis de mapas de calor para la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas tratadas y mantenidas en periodo de recuperación de seis semanas.	42

Índice de tablas

Tabla 1 Comparación de las tendencias en los cambios de frecuencia de géneros bacterianos por efecto de la edad y tratamiento con rTBL-1.	43
--	----

Resumen

Las lectinas son moléculas ubicuas en los seres vivos con capacidad de reconocimiento específico a carbohidratos de membrana. Las lectinas de origen vegetal tienen la capacidad de provocar efectos celulares en animales como la modulación del sistema inmune y la muerte de células cancerígenas. Una fracción concentrada en lectinas proveniente del frijol Tépari (TBLF, por sus siglas en inglés) es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer de colon e inhibir la tumorigénesis temprana. Una lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1, por sus siglas en inglés) ha mostrado mantener la actividad biológica de las lectinas nativas, así como su perfil de baja toxicidad y también los efectos adversos. Los cambios en el bacterioma provocados por la presencia de la TBLF o la rTBL-1 no han sido estudiados a profundidad. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la administración subcrónica de la rTBL-1 en dosis de 30 mg/kg de peso sobre el bacterioma en contenidos colónicos de rata. Se analizó la composición y estructuración de comunidades bacterianas en tres momentos, al inicio del estudio (tiempo cero), a la finalización de la administración de la rTBL-1 (28 días de administración diaria) y tras un periodo de recuperación sin tratamiento (42 días posteriores al tratamiento). Se obtuvieron muestras de contenido colónico de las cuales se extrajo el ADN, se realizó la secuenciación masiva de la región v3 del 16S y esta información se analizó por métodos bioinformáticos para detectar hasta nivel de género las comunidades microbianas. Los resultados obtenidos indican la relación entre el tratamiento con rTBL-1 y la presencia de géneros relacionados con mala salud intestinal o proceso inflamatorio. Sin embargo, durante el periodo de recuperación incrementaron géneros con efectos benéficos sobre la salud intestinal. Lo anterior sugiere que la rTBL-1 provoca efectos adversos en el tubo digestivo, sin embargo, dichos efectos son reversibles. Es necesario continuar con estudios a mayor profundidad para evaluar la seguridad y el impacto potencial de rTBL-1 en futuros estudios clínicos.

Palabras clave: Bacterioma, efectos adversos, frijol Tépari, lectinas, rTBL-1.

Abstract

Lectins are ubiquitous molecules in living beings with the capacity for specific recognition of membrane carbohydrates. Lectins of plant origin have the ability to cause cellular effects in animals such as modulation of the immune system and the death of cancer cells. A concentrated lectin fraction from the Tepary bean (TBLF) is capable of inducing apoptosis in colon cancer cells and inhibiting early tumorigenesis. A recombinant Tepary bean lectin (rTBL-1) has been shown to maintain the biological activity of native lectins, as well as its low toxicity profile and adverse effects. The changes in the bacteriome caused by the presence of TBLF or rTBL-1 have not been studied in depth. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the effects of subchronic administration of rTBL-1 at doses of 30 mg/kg body weight on the bacteriome in rat colonic contents. The composition and structuring of bacterial communities were analyzed at three times: at the beginning of the study (time zero), at the end of rTBL-1 administration (28 days of daily administration) and after a recovery period without treatment (42 days after treatment). Colonic content samples were obtained from which DNA was extracted, massive sequencing of the 16S v3 region was performed and this information was analyzed by bioinformatic methods to detect microbial communities down to the genus level. The results obtained indicate the relationship between treatment with rTBL-1 and the presence of genera related to poor intestinal health or inflammatory process. However, during the recovery period, genera with beneficial effects on intestinal health increased. The above suggests that rTBL-1 causes adverse effects in the digestive tract, however these effects are reversible. Further in-depth studies are needed to evaluate the safety and potential impact of rTBL-1 in future clinical studies.

Keywords: Adverse effects, bacterioma, lectins, Tepari bean, rTBL-1.

I. Introducción

El papel del microbioma, la comunidad diversa de microorganismos que coexisten con el cuerpo humano, ha cobrado relevancia. El microbioma participa en regulación celular y procesos metabólicos, su influencia en la patogénesis de diferentes enfermedades, especialmente en el tracto digestivo, ha sido objeto de estudio. Sin embargo, la complejidad del microbioma, su variabilidad y su impacto en la salud y enfermedad presentan desafíos en su investigación (Amon y Sanderson, 2017; Kumar y col., 2019; Rastogi y Singh, 2022; Watson, 2020).

Estudiar el microbioma, sin embargo, es complejo debido a que es necesario comprender las funciones de cada una de las distintas comunidades de grupos de organismos que hay comprendidas en un ecosistema de interés. Es decir, para poder hablar del microbioma es importante no sólo conocer las funciones un grupo de organismos, comúnmente las bacterias, sino la totalidad de ellos. Es por esto que al estudiar la función de un grupo específico de microorganismos, en este caso bacterias, se propone usar el término bacterioma y no hablar de ellos como microbioma (Berg y col., 2020; Stern y col., 2019). Se recurre al uso de herramientas bioinformáticas para analizar los datos de secuenciación y para realizar predicciones de sucesos en la naturaleza, de acuerdo con el avance tecnológico (Gómez-Merino, 2010; Hernández y col., 2020).

Este estudio explora la relación entre el bacterioma y una molécula terapéutica con potencial anticancerígeno, la lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1, por sus siglas en inglés), con un enfoque particular en el tejido colónico. El tejido colónico es un entorno diverso y dinámico, poblado por microorganismos beneficiosos, neutrales y patógenos que interactúan con las células y regulan procesos importantes. Además, se aborda el uso de modelos de estudio, como la rata Sprague Dawley, para comprender mejor las interacciones entre el bacterioma y el cuerpo humano.

La rTBL-1 surge de la necesidad de contar con una lectina biocativa a partir de frijol Tépari. Nuestro grupo de trabajo ha estudiado una fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari (TBLF, por sus siglas en inglés), que ha mostrado efecto citotóxico diferencia sobre células de cáncer de colon (García-Gasca y col., 2012). La TBLF presenta baja toxicidad y buena tolerabilidad en ratas (Ferriz-Martínez y col., 2015; Pita-López y col. 2020) y es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer de colon (Moreno-Celis y col., 2020) e inhibir la carcinogénesis temprana *in vivo* (Moreno-Celis y col., 2017). Por lo anterior, se desarrolló la metodología para la producción de una lectina recombinante de friol Tépari en la levadura *Pichia pastoris* (Martínez-Alarcón y col. 2020; Palmerín-Carreño y col., 2021) que ha mostrado mantener la actividad citotóxica de la TBLF (Dena-Beltrán y col., 2023) y perfil toxicológico similar (Ocádiz, 2023; Rios Ortiz, 2022, Villicaña Álvarez, 2023).

Por lo anterior, el presente estudio se enfocó en estudiar el efecto de la administración subcrónica de la rTBL-1 sobre el bacterioma y su posible recuperación tras un periodo sin tratamiento. Lo anterior permitirá conocer más sobre los posibles efectos adversos de esta molécula y su seguridad para su potencial uso farmacológico sobre cáncer de colon.

II. Antecedentes

2.1. Microbioma

El cuerpo humano se encuentra en constante convivencia no sólo con los elementos propios sino, además, con otros entes biológicos que obtienen algún beneficio de él o mutuamente. A este tipo de interacciones se les llama simbiosis, las cuales pueden ser de distintos tipos ya sea beneficiosas, dañinas o neutrales para alguno de los participantes en la interacción (Ahmadjian y Paracer, 1988). El cuerpo humano es un sistema biológico abierto al ambiente, por lo que este tipo de interacciones son comunes y, en los últimos años, el interés en el campo ha ido creciendo de una manera importante debido a la evidencia de la participación, no sólo de cohabitar, sino también por llevarse a cabo comunicación y regulación celular entre ellos (Berg y col., 2020; Kumar y col., 2019). Es importante destacar que debido a la evidencia de que ejercen ciertas funciones señalizadoras, a los microorganismos que se encuentran en el cuerpo se les ha denominado microbioma, un concepto que es confundido comúnmente con microbiota. Se le llama microbiota a la comunidad y composición de microorganismos que viven en un entorno particular, mientras que el microbioma es para referirse a la comunidad de microorganismos, composición y además a sus funciones en el entorno en el que se encuentra establecido (Berg y col., 2020; Kumar y col., 2019; Watson, 2020).

En la patogénesis del cáncer, el microbioma juega un papel importante tanto en su desarrollo como en su progresión, particularmente en los tipos de cáncer asociado al tracto digestivo (Bauer y Thiele, 2018; Sen y Orešič, 2019). De los tipos de cáncer asociado al tracto digestivo uno de los más estudiados es el del tejido colónico. Sin embargo, debido a las limitaciones tecnológicas actuales, es casi imposible realizar un estudio de microbioma dado a que se conforma por la interacción de los distintos grupos de microorganismos (Figura 1) y se debe hacer una clara diferencia de qué es lo que específicamente se está estudiando. El colon es uno de los tejidos más grandes en el cuerpo humano y se ha reportado que el ecosistema microbiano no es uniforme en todo este tejido, incluso la composición y estructuración de

comunidades microbianas va cambiando de forma diferencial conforme al tiempo (Amon y Sanderson, 2017; Berg y col., 2020; Marchesi y Ravel, 2015; Rhodes, 2016; Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2017; Silva y col., 2020; Ternes y col., 2020; Xavier y col., 2020). Debido a las limitaciones expuestas e incluyendo el costo de las investigaciones, se propone el estudio del bacterioma, es decir, analizando solo las comunidades bacterianas por medio de detección del 16s rARN (ácido ribonucleico ribosomal) (Fricker y col., 2019).

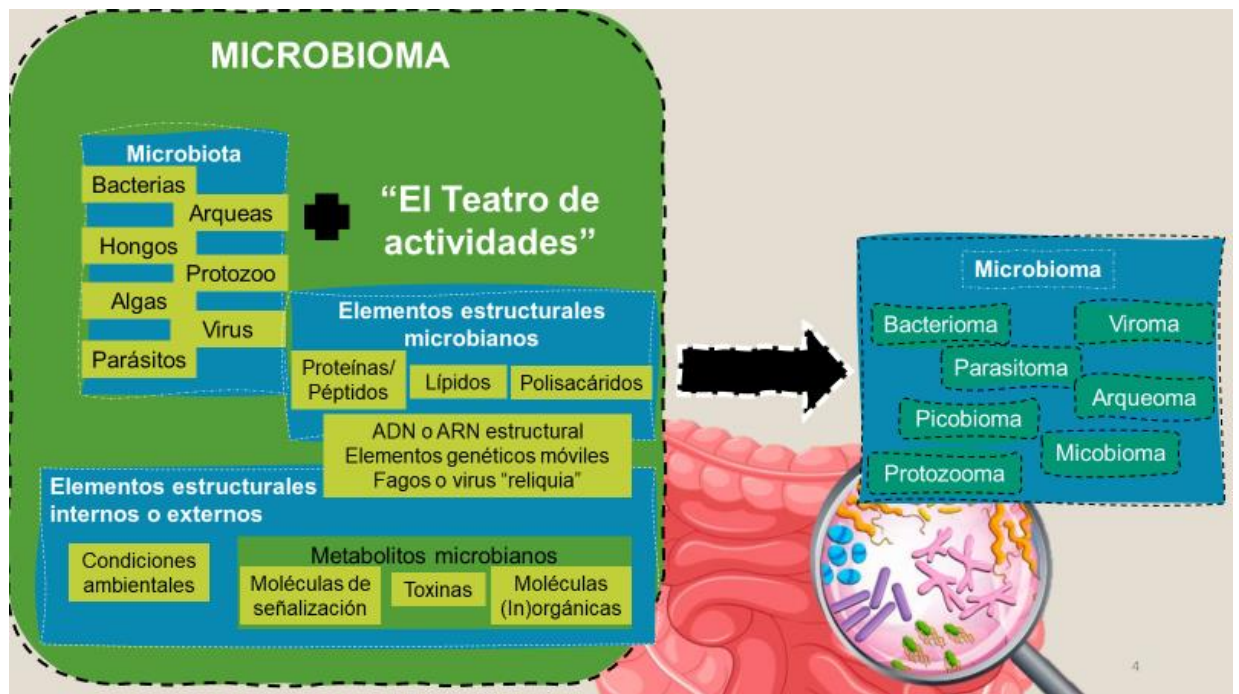


Figura 1. Conformación del microbioma. De manera esquemática se observan las principales características de lo que es el microbioma y todos los elementos que lo conforman (Berg y col., 2020)

El colon está compuesto y dividido en cuatro secciones: el colon ascendente, transversal, descendente y sigmoideo. Este último une al colon con el recto, por lo que también puede llamarse tejido colorrectal. Este tejido se encuentra recubierto por el epitelio intestinal el cual está conformado por enormes columnas llamadas vellosidades integradas por células secretoras y enterocitos, los cuales poseen

microvellosidades que conforman la mucosa intestinal y, a su vez, se encuentran zonas con células madre llamadas criptas (A.D.A.M, 2019; Chaudhry SR, Peterson DC, 2019). Alberga a millones de microorganismos, tanto aquellos microorganismos benéficos para el cuerpo, que ayudan en el procesamiento o metabolismo de algunos compuestos de la dieta, así como microorganismos que actúan de manera neutra ya que no generan ningún beneficio o daño, pero habitan en él. También hay microorganismos patógenos que provocan daño en el ambiente de este tejido. La presencia y regulación de estos microorganismos está dada por distintos mecanismos como la dieta, estilo de vida y a nivel celular (Ley y col., 2006; Nguyen y col., 2015; Valdes y col., 2018).

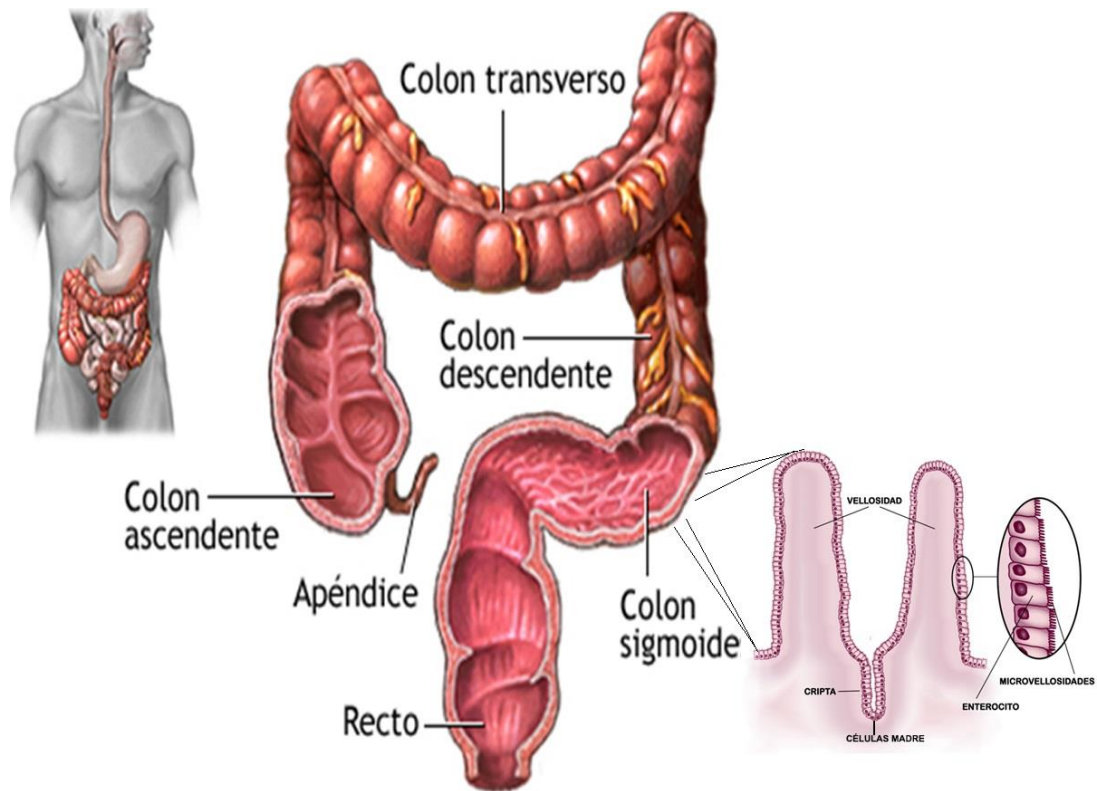


Figura 2. Representación esquemática del colon. El colon es uno de los tejidos más grandes del cuerpo dividido en cuatro partes además de que se encuentra unido al recto, todo el tejido colónico se encuentra estructurado por las vellosidades

que contienen distintos tipos de células para ayudar en la homeostasis de ese entorno (A.D.A.M, 2019)

Este epitelio tiene la capacidad de regenerarse rápidamente ya que es una barrera de protección importante del cuerpo (A.D.A.M., 2019; Barker y col., 2009; Berg y col., 2020; Chaudhry y Peterson, 2019; Ganz, 2000; La Vecchia y Sebastián, 2019; Sebio y col., 2014; Watson, 2020; Xavier y col., 2020). En el tejido colónico los organismos más comunes de encontrar asociados a salud son principalmente aquellos pertenecientes a los Firmicutes como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Roseburia*, así como algunas Actinobacteria principalmente *Bifidobacterium* o *Akkermansia* de las Verrumicrobia. Por el contrario, algunos géneros y especies que se encuentran asociados específicamente al cáncer colorrectal son *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus gallolyticus* así como algunos *Enterococcus* (Watson, 2020).

2.2 Modelos de estudio del microbioma

El interés por saber qué papel juegan los microorganismos con el ser humano ha existido desde mucho tiempo atrás, sin embargo, con la posibilidad de la secuenciación se ha comenzado a entender que los microorganismos comparten una relación muy estrecha con el individuo hasta el punto de regular procesos e incluso comportamientos en otros organismos, por lo que su estudio ha cobrado una gran relevancia (Chowdhury y Fong, 2020). Existen a la fecha muchos acercamientos para el estudio de las relaciones del microbioma con el cuerpo humano, uno de ellos es el modelaje tanto informático como matemático. Por medio de este acercamiento se tiene cada vez más evidencia de cómo el microbioma puede modular determinados estados celulares en el tejido colorrectal entre ellos propiciar estadios metabólicos idóneos para el desarrollo de la carcinogénesis (Lee y col., 2017), la iniciación del cáncer (Paterson y col., 2020) y de señalización predichos (Bucci y Xavier, 2014; Kinross y col., 2017; Ternes y col., 2020), entre otros procesos.

Debido a las muchas ventajas que este tipo de estudios presentan es que cada vez más se opta por ellos, como el uso de información ya generada en el laboratorio pero que no ha sido procesada (Reeve, 2013) o la generación de nuevas hipótesis o comprobación de ellas sin experimentación (Janes y Lauffenburger, 2013). Los acercamientos informáticos han ganado mayor importancia debido a su practicidad a la hora de analizar y generar hipótesis con datos, además de representar una ventaja económica en la clínica y experimentación por su característica predictiva (Gómez-Merino, 2010; Wang y Liotta, 2011). Entre las herramientas más utilizadas para estudiar el microbioma se encuentran:

a) Curvas de rarefacción. Las curvas de rarefacción son una herramienta de control de calidad que permite determinar si el tamaño de la muestra es adecuado para capturar toda la diversidad bacteriana, o al menos la mayor parte de ella (Gotelli y Colwell, 2001). En el análisis de secuenciación es común observar que estas curvas se aproximan a una asíntota. Cuando esto ocurre, indica que el tamaño de la muestra es suficiente para detectar una gran cantidad de diversidad, al menos en términos de diversidad de especies. Es importante tener en cuenta que la rarefacción suele asociarse más con la riqueza de especies, es decir, cuántas especies diferentes podemos detectar. No obstante, no proporciona información sobre la abundancia de estas especies. Para evaluar si las comunidades bacterianas se comportan de manera similar o diferente entre grupos, se comparan las curvas de rarefacción. Cuando dos curvas se superponen, esto sugiere similitud en cuanto a la riqueza de especies (Hernández y col., 2020)

b) Alfa diversidad. Se utiliza para comparar la riqueza de especies entre las muestras y evaluar cuán similares o diferentes son en términos de riqueza observada. Se emplea el índice de Simpson para determinar si existe dominancia por una o más especies. Este índice varía de 0 a 1, siendo valores más bajos cercanos a 0 indicativos de una máxima diversidad, donde todas las especies tienen una abundancia similar en la muestra. Valores cercanos a 1 indican que una o pocas especies dominan, es decir, hay poca abundancia de otras especies. Es importante

recordar que el índice de Simpson se enfoca en la dominancia, no en la riqueza (Simpson, 1949; Thukral, 2017).

El índice de Pielou, que también varía de 0 a 1, se utiliza para evaluar la abundancia entre todas las especies de una comunidad. Un valor cercano a 1 sugiere una distribución uniforme de secuencias entre los diferentes taxones. Un valor cercano a 0 indica una distribución desequilibrada, donde una o pocas especies dominan en la comunidad y las demás tienen baja abundancia (Pielou, 1966; Thukral, 2017). Estas métricas permiten comprender la diversidad alfa, es decir, las diferencias entre comunidades. Para visualizar mejor las similitudes y diferencias entre los grupos, se recurre a un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis reduce la dimensionalidad de las variables en las muestras a dos dimensiones, lo que facilita la detección de patrones en los datos complejos. Al considerar estas mediciones es posible interpretar mejor el comportamiento de las diferentes comunidades analizadas (Borcard y col., 2018).

c) Mapas de calor. El mapa de calor compara individuo con individuo, es decir, mide qué tan diferente es la comunidad de un individuo en comparación con otro. Esta medición se logra mediante la medida de Bray-Curtis, que indica la similitud en términos de presencia y abundancia de diferentes especies. El valor de esta medida varía entre 0 y 1, donde un valor más cercano a 1 indica que la composición de especies entre esos dos individuos es completamente diferente (Borcard y col., 2018; Bray & Curtis, 1957).

2.4 Rata Sprague Dawley como modelo de estudio

Sprague Dawley es una raza exogámica de rata albina usada de manera extensiva en la investigación médica debido a su docilidad y fácil manejo en el laboratorio. Fueron generadas en los años 20 por Robert S. Dawley al cruzar una rata Wistar y una silvestre, además de que fueron mejoradas posteriormente para ser una raza más estable (Brower y col., 2015). El microbioma en roedores, principalmente ratas

y ratones, está compuesto por una comunidad diversa de microorganismos que colonizan principalmente el tracto gastrointestinal. Dentro de estos grupos de microorganismos se encuentran los *Firmicutes*, que componen aproximadamente el 50-70% del total de bacterias, principalmente en el intestino. Los *Bacteroidetes* conforman alrededor del 10-30%, las *Proteobacterias* representan entre el 5-15% y finalmente, las *Actinobacterias* constituyen aproximadamente el 1-5% de la comunidad y composición bacteriana. Muchos de estos porcentajes dependen del estilo de vida, la cepa, así como la alimentación y el esquema de experimentación (Clavel y Haller, 2007; Lamendella y col., 2011; Ley y col., 2006; Wang y col., 2014).

Se ha observado que al igual que en los humanos, las ratas desarrollan su microbiota intestinal durante y después del nacimiento. Durante este periodo, se ha notado que los neonatos están más expuestos a *Escherichia coli*, así como a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Esto se debe a que su entorno de nacimiento suele estar rodeado de materia fecal. Después del destete, las bacterias anaeróbicas *Bacteroidaceae* y las anaeróbicas facultativas *Lactobacilli* tienden a dominar (Čoklo y col., 2020; Yajima y col., 2001). Se ha informado que la microbiota intestinal de las ratas experimenta una clara diversificación a medida que maduran. El primer punto de cambio ocurre alrededor de los 21-22 días después del nacimiento, y el segundo pico de cambio se produce entre los días 24 y 27 debido a la maduración inmunológica del intestino. Después de estas etapas, la composición y estructura de las comunidades bacterianas se ven fuertemente influenciadas por la dieta y los factores ambientales (Čoklo y col., 2020; Inoue y Ushida, 2003).

2.5 Lectina recombinante rTBL-1 del frijol Tépari

Las lectinas son moléculas de origen vegetal no inmunogénicas que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos de manera específica y reversible (Sharon, 2004). Presentan interacción con los glicanos de las superficies de células sanas y tumorales de forma diferencial, promoviendo muchas veces la inhibición de la

división celular, apoptosis así como una capacidad de modular el sistema inmune (Fujita y col., 2004; Mazalovska y Kouokam, 2020; Sharon, 2004). Las lectinas de origen vegetal han mostrado gran potencial en tratamiento contra el cáncer, sin embargo, al ser moléculas de defensa de las plantas contra depredadores o fitopatógenos se comportan como factores antinutricionales ya que tienen la capacidad de unirse a la mucosa del tubo digestivo provocando problemas en la absorción de nutrientes de la dieta, mientras que otras pueden presentar efectos tóxicos más severos que pueden conducir a los individuos incluso a la muerte (Mazalovska y Kouokam, 2020; Sharon, 2004).

Las lectinas de las leguminosas han propiciado un gran interés al ser importantes componentes proteicos (Micucci y Camps, 1987) y conforman parte de la dieta de las personas, sin embargo, han mostrado ser componentes tóxicos de importancia en la salud nutricional. La ricina se encuentra entre las primeras lectinas descubiertas, fue identificada en la semilla de higuera, *Ricinus communis* y tiene propiedades citotóxicas ya que puede internalizarse al citoplasma e interferir con la síntesis de proteínas, por lo que es considerada como una de las toxinas más potentes y debe vigilarse incluso en entornos de su uso en actividades bioterroristas (Moshiri y col., 2016; Sandvig y van Deurs, 2002).

Las lectinas son capaces de interactuar con comunidades bacterianas e inducir distintas respuestas inmunológicas, particularmente sobre células inmunes de origen mieloide favoreciendo la diferenciación y activación. Aunque esto en humanos aún falta ser comprobado debido a la complejidad que representa, se ha encontrado una respuesta similar a la observada en modelos de estudios. Las lectinas (edógenas o exógenas) son capaces de interactuar con los microorganismos del tracto digestivo y células del sistema inmune del huésped, provocando diferentes efectos y afectando a las comunidades bacterianas (Cohen y col., 2022; Pusztai, 1993).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado a lectinas proveniente del frijol Tépari, *Phaseolus acutifolius* A. Gray, que exhiben propiedades citotóxicas de manera selectiva contra células cancerígenas de colon, lo cual la proyecta como herramienta anticancerígena (García-Gasca y col., 2012) y, además, han mostrado baja toxicidad en estudios *in vivo* (Ferriz-Martínez y col., 2015). García-Gasca y col. (2012) reportaron el efecto diferencial de una fracción concentrada de lectinas (TBLF, por sus siglas en inglés) que más tarde Torres-Arteaga y col. (2016) caracterizaron como la mezcla de dos glicoproteínas mayoritarias (TBL-1 y TBL-2) con diferente efecto citotóxico contra de células de cáncer humano. Pita-López y Col (2020) reportó con la TBLF efectos reversibles en el colón de ratas lo cual apunta hacia la seguridad de la molécula ante individuos sanos y no sólo el potencial anticancerígeno hacia este tipo celular. Además, mostraron un cambio significativo de la composición microbiológica general en ratas tras dos semanas de tratamiento con la TBLF.

Moreno-Celis y col. (2020), mostraron que la TBLF es capaz de inducir apoptosis por la vía de las caspasas en diferentes líneas celulares de cáncer de colon humano, así como inducir el arresto del ciclo celular en G₀-G₁. El efecto apoptótico está relacionado también con la fosforilación de p53 en la serina 46. Además, fue posible determinar el efecto anticancerígeno de la TBLF en ratas Sprague Dawley a las que les indujeron lesiones cancerígenas en colon, encontrando que la TBLF es capaz de inhibir la carcinogénesis temprana (Moreno -Celis y col., 2017). Lo anterior da cuenta de que lectinas de frijol Tépari presentan potencial como agentes terapéuticos contra cáncer de colon. Sin embargo, la obtención de la TBLF presenta varios inconvenientes ya que depende de su purificación a partir del frijol Tépari, es costosa, produce muy bajos rendimientos y consume mucho tiempo para obtenerse, además de que la TBLF es una fracción impura de las lectinas citotóxicas.

Con estos precedentes y para contar con un sistema estandarizado de producción, Martínez-Alarcón y col. (2020) lograron la expresión y producción de una lectina recombinante (TBL-1) de frijol Tépari mediante un sistema heterólogo empleando a

Pichia pastoris. La rTBL-1 mantiene los efectos citotóxicos observados para la TBLF, en donde se encontró que la concentración letal media (LC₅₀) sobre células humanas de cáncer de colon HT-29 fue de 56 µg/mL, similar al de la TBLF (LC₅₀= 55 µg/mL) (Palmerín-Carreño y col., 2021). Parte del mecanismo de acción propuesto hasta el momento es que la rTBL-1 induce apoptosis sobre las células de cáncer de colon a través de la vía de señalización de las MAP cinasas (Dena-Beltrán y col., 2023).

Considerando lo anterior, se han realizado estudios *in vivo* para evaluar el perfil toxicológico de la rTBL-1, tanto de toxicidad oral aguda como de toxicidad subcrónica en rata y ratón por vía intragástrica. En estos estudios se han encontrado resultados similares a los observados para la TBLF, en donde los efectos toxicológicos son de bajo nivel, con buena tolerabilidad. Principalmente se observan efectos adversos en el sistema digestivo dada su naturaleza antinutricia, mismos que se revierten después de un tiempo de recuperación sin tratamiento. También se observó efecto de activación del sistema inmune, tal como lo mostró la TBLF. Por lo anterior, se ha considerado que la proteína puede clasificarse como una sustancia de categoría 3 con baja toxicidad (Ocádiz, 2023; Rios Ortiz, 2022, Villicaña Álvarez, 2023).

3. Justificación

Estudios previos han mostrado que la fracción concentrada en lectinas (TBLF) de frijol Tépari es capaz de provocar la inducción de apoptosis en cáncer de colon químicamente inducido. Los estudios también han mostrado cambios en la composición de las comunidades bacterianas en el colon de ratas. Actualmente se ha estandarizado la metodología para obtener una lectina recombinante biológicamente activa (rTBL-1) con la cual se están realizando diversos ensayos para obtener evidencia preclínica y valorar su desarrollo como un candidato terapéutico.

La rTBL-1 ha mostrado mantener las propiedades biológicas de las lectinas nativas de frijol Tépari sobre células de cáncer de colon *in vitro* y en estudios *in vivo*, por lo que ha sido necesario confirmar sus efectos preclínicos en animales de experimentación. Dentro de los efectos importantes se encuentran aquellos que estén relacionados con cambios en el bacterioma, por lo que el presente trabajo se enfocó en determinar los cambios de la composición y estructuración de las comunidades bacterianas en ratas macho Sprague Dawley bajo un tratamiento toxicológico subcrónico con rTBL-1 y un periodo posterior sin tratamiento. Lo anterior permitirá saber si la rTBL-1 presenta efectos adversos a nivel del bacterioma y si éstos son reversibles.

4. Hipótesis

La lectina recombinante del frijol Tépari, *Phaseolus acutifolius*, induce cambios en la composición y abundancia de las comunidades bacterianas colónicas en ratas macho Sprague Dawley (*Rattus norvegicus domestica*) sometidas a un tratamiento subcrónico.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el cambio en la composición y abundancia de las comunidades bacterianas colónicas en ratas macho Sprague Dawley bajo un tratamiento toxicológico subcrónico con lectina recombinante de frijol Tépari y posterior a un periodo de recuperación.

5.2 Objetivos específicos

1. Someter a ratas macho Sprague Dawley a un tratamiento subcrónico con lectina recombinante de frijol Tépari durante cuatro semanas y posterior recuperación durante seis semanas.
2. Obtener muestras contenidos colónicos a diferentes tiempos y extraer el ADN.
3. Determinar las especies bacterianas presentes en las muestras mediante secuenciación masiva con la ayuda de bases de datos informáticos.
4. Determinar la diversidad del bacterioma e inferir sus funciones metabólicas.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de rTBL-1

La rTBL-1 se produjo y purificó de acuerdo a la metodología de Palmerín-Carreño y col (2021), donde se utilizó un biorreactor de 3 L con factores controlados de pH, niveles de oxígeno, temperatura y agitación constante. Se obtuvo el medio de cultivo líquido donde se creció a *Pichia pastoris* el cual se sometió a centrifugación de 4000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se filtró para su purificación en columnas con gel Sephadex con afinidad a níquel con una bomba peristáltica bidireccional. Tras este paso, las columnas fueron lavadas con imidazol a 200mM para la recuperación de la rTBL-1 que se sometió a un proceso de diálisis por osmosis con agua destilada para la eliminación de las sales y tener una conductividad menor a 50 μ S/cm. La muestra fue finalmente liofilizada y congelada a -80 °C para su uso.

6.2 Estudio subcrónico

El presente protocolo siguió las recomendaciones de la reglamentación interna del bioterio de la FCN-UAQ (García-Gasca y Andrade-Portillo, 2021), Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y la guía 407 de la OCDE para pruebas de toxicidad subcrónica (OCDE, 2008). El protocolo contó con la aprobación de Comité de Bioética (54FCN2021 y 75FCN2023) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con número de registro 13251 y 14133.

Se utilizaron un total de 30 ratas Sprague Dawley macho de cinco semanas de edad que fueron adquiridas del bioterio del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla-UNAM. Atendiendo las recomendaciones de las buenas prácticas de experimentación animal y los principios de las tres erres (reemplazo, refinamiento y reducción) se realizó el presente estudio a la par de un estudio de toxicidad oral subcrónica de la rTBL-1 en ratas Sprague Dawley en conjunto con Ríos Ortiz (2022).

Los animales fueron colocados en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum* (Nutricubos® Agribbrands Purina México, S.A. de C.V.). Las lectinas del alimento fueron inactivadas mediante tratamiento térmico en autoclave a 105 °C por 15 min y 6 psi y secado en horno con flujo de aire (Shel Lab) a 60 °C por 24 h. El experimento se llevó a cabo en el bioterio de la FCN-UAQ a una temperatura de 22±2 °C, humedad relativa de 45 a 60%, ciclos de 12 h luz y 12 h oscuridad. Los animales se mantuvieron por una semana de aclimatación antes de comenzar los experimentos. Se registró el peso corporal de cada animal cada tercer día así como el consumo de agua y alimento semanal. Los animales se mantuvieron en observación constante para detectar si se presentaban signos o síntomas de toxicidad (Ríos Ortiz, 2022). La recolección de muestras se llevó a cabo de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 3.

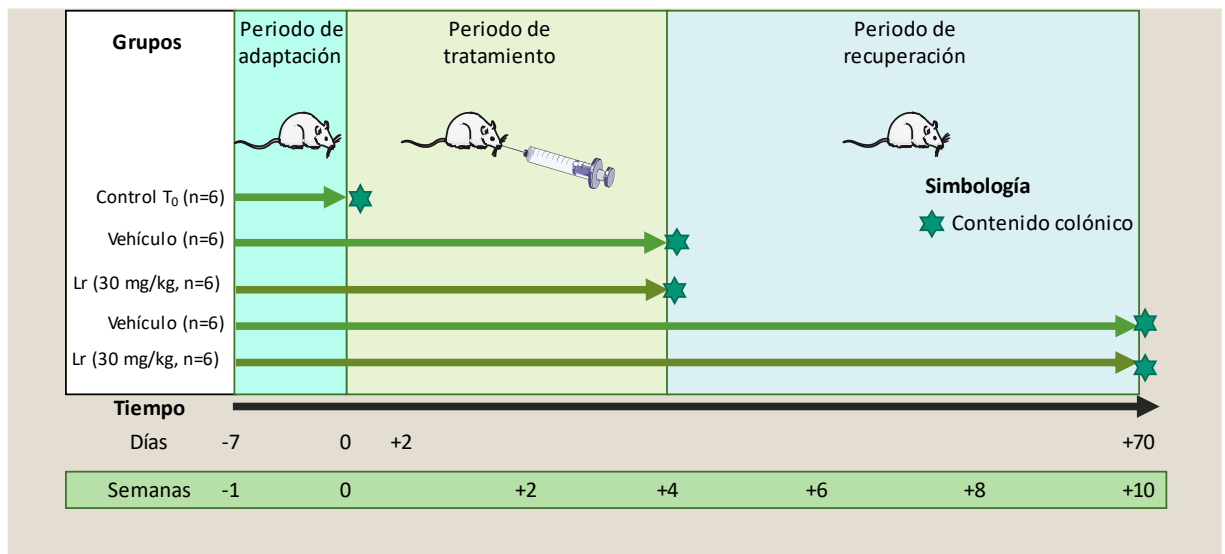


Figura 3 Esquema de recolección de muestras. La recolección de muestras de los individuos se realizó de acuerdo al esquema donde se observa un cuadrado azul indicando los días que se hizo recolección de heces, mientras que la estrella verde indica el día que se hizo recolección de contenido colónico marcando a su vez días de sacrificio de roedores. Los sacrificios se hicieron en los roedores a la finalización del periodo de adaptación, periodo de tratamiento y periodo de recuperación.

Seis ratas fueron sacrificadas al inicio del experimento para obtener contenido colónico, 12 fueron administradas diariamente con cánula intragástrica con solución salina y 12 con 30 mg/kg de peso de rTBL-1 en solución salina. A las cuatro semanas se realizó la matanza de seis animales por grupo y se tomaron muestras de contenido colónico. Posteriormente seis animales control y seis tratados con la rTBL-1 continuaron la fase de recuperación de seis semanas sin tratamiento y al momento de la matanza también se tomaron muestras de contenido colónico. Las muestras se recolectaron en tubos falcón de 15 mL y se refrigeraron a -20°C y posteriormente a -80 °C para la posterior extracción de ADN.

Los residuos biológico-infecciosos fueron manejados, desechados y resguardados hasta su destrucción según la "Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, "Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo".

6.3 Extracción de ADN y secuenciación masiva.

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit® para 106 muestras tras la finalización del experimento. El ADN extraído se cuantificó por nanodrop (Thermofisher®) a una densidad óptica de 260/280 y 260/230. Las muestras se mantuvieron en congelamiento a -4°C. Las muestras se enviaron en un contenedor térmico con hielo seco al Centro de investigación de alimentos y desarrollo (CIAD) unidad Mazatlán donde se recibieron y procesaron para su posterior secuenciación.

Cada una de las muestras se sometió a PCR para amplificar la región V3 del 16S ribosomal bacteriano. Tras la PCR se verificó la amplificación del producto el cual se esperaba entre 100 a 200 pares de bases. Después de verificar que cada uno de los productos haya amplificado la región V3, se sometieron a una nueva amplificación para añadir una secuencia índice. Estas secuencias índices de pequeño tamaño conocido permiten distinguir a las muestras ya que al secuenciar

se agregan todas las secuencias en un solo pool, por lo que el proceso de indexado es esencial para no perder de vista las muestras.

Al terminar el indexado de las muestras se realizó una cuantificación y normalización, esto básicamente depende del tamaño del producto a analizar, pero se busca que se tenga una concentración de ADN total de 2.0 a 2.3 nM entre todas las muestras a cargar en la secuenciadora. La librería para secuenciación se carga con un máximo de 500 μ L. El tiempo de secuenciación final fue de aproximadamente 17 h por corrida de acuerdo con Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol.

Las secuencias obtenidas se trabajaron con el lenguaje de programación R (R core Team, 2022) y su interfaz Rstudio (Posit Team, 2022) con distintos paquetes para análisis de microbioma. Para el comienzo del análisis se recurrió al uso de DADA2 (Callahan y col., 2016). El uso de DADA2 se justifica debido a que, a diferencia de otros algoritmos, esta toma en consideración también los errores que puedan ocurrir en la secuenciación de amplicones de modo que se pueda inferir de mejor manera la composición de la muestra. Además, este paquete no se guía por los métodos de OTUS, lo que ha demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad que los métodos basados en ellos (Callahan y col., 2016; Posit Team, 2022).

Para procesar las muestras se colocaron los archivos FASTq en una dirección de fácil acceso. En este caso se separaron las muestras en carpetas de acuerdo con el tiempo para realizar un análisis por grupos. Se debe verificar cuidadosamente que se encuentren todos los archivos necesarios a analizar, los que se requieren son las secuencias sentido como anti sentido, la nomenclatura general en archivos de secuenciación es en el nombre del archivo la presencia de un R1 para indicar la secuencia sentido y un R2 para las anti sentido. Esta nomenclatura se aprovecha para generar objetos de análisis en R.

Se verificaron los perfiles de calidad de las secuencias de las muestras lo que permitió determinar parámetros de importancia para continuar con el análisis. Es de utilidad notar que las secuencias anti-sentido suelen tener peor calidad que las secuencias sentido. Tomando en cuenta los perfiles de calidad se procedió a realizar el filtrado de las muestras y recorte (Anexo 1). Para llevar a cabo este paso se consideró el puntaje de calidad de los perfiles, debido a que este era bastante alto (QS=40) se decidió tomar el tamaño completo de las secuencias para evitar pérdida de información a la hora de perfilar las comunidades microbianas, aunque posteriormente se había realizado el análisis considerando el QS=30 al considerarse con un QS=40 se encontró mayor información a la hora de determinar las variantes de amplicones secuenciadas (ASV, por sus siglas en inglés) presentes.

Las secuencias filtradas pasan un segundo paso de filtro y recorte. En estas secuencias, debido al alto valor de QS=40, se optó por no hacer recortes con un truncLen= (0,0), pero con una tasa de errores esperados maxEE=2, donde se espera se seleccionen las secuencias que mantengan al menos un error cada 100 pares de bases, truncQ=2 para ser consistente con el maxEE. rm.phix= TRUE para desechar todas las secuencias que se parezcan a las de fagos.

Tras el filtrado de secuencias y observar el número totales de secuencias que pasaron el filtro se procedió a conocer la tasa de errores que el algoritmo puede detectar esto permitió determinar qué tan viables las secuencias fueron así como qué tipo de errores se encontraron más. Tras conocer las tasas de errores se procedió con una dereplicación, este paso permite al algoritmo combinar secuencias totalmente idénticas en una sola manteniendo aún así la abundancia de esa secuencia única.

Tras el preparado previo de las secuencias se utilizó dada2, el cual realizó el ajuste final de las secuencias removiendo errores de secuenciación y mantuvo solo aquellas que se consideran secuencias únicas sin perder la abundancia. Tras obtener las secuencias tratadas con dada2, se sobrelaparon las secuencias con sus

respectivos sentido-antisentido. Estos dos pasos permiten crear una tabla ASV que es preferida sobre el uso de OTU. Tras crear la tabla ASV, se procedió a la remoción de quimeras de ADN que se pudieron haber creado tras el paso de solapamiento. Esto da como resultado el tratamiento final de todas las secuencias. En secuenciación es esperado que un gran porcentaje de secuencias pasen todos los filtros para determinar si fue una buena o mala corrida, por lo que se creó un objeto donde se pudo observar el número de secuencias que pasaron los filtros.

Para la utilización de *dada* se usaron los objetos obtenidos (secuencias) de la dereplicación y la tasa de errores. En el objeto de solapamiento se usa tanto los objetos de *dada* como los de dereplicación, esto permite crear un objeto ASV más específico para tener verdaderas secuencias, tras este paso se hizo la remoción de quimeras de ADN, es importante hacer notar en el programa o método si estas secuencias fueron de pools o no. Finalmente se crea una tabla donde se observan el número de secuencias que pasaron cada uno de los filtros. En una óptima secuenciación se espera que la mayoría de las secuencias “input” lleguen hasta el último paso de filtrado “nonchim”.

6.4 Asignación taxonómica

La asignación taxonómica se realizó mediante el entrenador Silva 138.1 (McLaren y Callahan, 2021) mediante la extensión del paquete *dada2* para realizar estos procesos. Aunque el entrenador puede llegar a asignar especies, el número de especies que se pueden detectar sigue siendo muy limitado por lo que se optó trabajar hasta nivel de género. Los entrenadores son sets de secuencias utilizados en la perfilación taxonómica, estos permiten al algoritmo *dada2* el cual por medio de clasificación bayesiana ingenua realiza la asignación a cada secuencia que tenga un parecido de 95% o más con la secuencia del entrenador.

Para observar de manera gráfica los perfiles taxonómicos de las secuencias, se utilizó el paquete *Phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) y *ggplot2* (Wickham, 2016).

La creación del objeto Phyloseq es importante ya que este se utilizó para análisis posteriores. Se crea el objeto Phyloseq a partir de la tabla de ASV generada con dada2. El objeto Phyloseq es un comodín para muchos de los programas de R que se utilizan (Wickham, 2016). A partir del objeto Phyloseq creado se realizó una gráfica para observar los géneros más comunes por muestra para observar los de mayor abundancia.

6.5 Comparaciones entre grupos midiendo alfa diversidad.

Para el proceso de comparaciones entre grupos se usó la paquetería de Microbiota Process (Xu y col., 2023) que permite analizar de manera compacta y eficaz los datos de secuenciación. Se realizó primeramente curvas con el método de rarefacción de abundancia. Los objetos Phyloseq previamente creados se utilizan y se hace una unión de aquellos que se vayan a analizar y de acuerdo con la condición de que es de interés. El paquete permite convertir los archivos.rds u objetos Phyloseq en un objeto mpse que es el que utiliza todo el paquete. la función mp_rrarefy realiza la rarefacción en las muestras creando un ajuste al tamaño de las muestras para permitir una comparación precisa de la diversidad. Para graficar las curvas además de las funciones de MicrobiotaProcess se usan las de ggplot2.

Se midió la alfa diversidad de las muestras en distintos tiempos utilizando adicionalmente el paquete gghalves (Tiedemann, 2022) para tener una buena visualización de los gráficos. Los índices que se utilizaron para la medición de la alfa diversidad fueron la abundancia de rarefacción observada, el índice de Shannon para medir la riqueza y equidad de especies en una comunidad (Shannon, 1948), el índice de Simpson para evaluar la dominancia de especies (Simpson, 1949) y el índice de Pielou para medir la uniformidad de la distribución de especies (Pielou, 1966).

Después se procedió a realizar gráficas de abundancia de taxones, esto para observar qué géneros son los que estaban dando una dominancia o qué tan

equitativos son de acuerdo con los valores de índice de diversidad previamente obtenidos. Para ello se utilizaron adicionalmente tres paquetes de R: forcast el cual proporciona funciones para manipular y visualizar factores (Wickham, 2023), ggalluvial el cual permite crear gráficos de transiciones entre diferentes categorías (Brunson y Read, 2023) y ggh4x que es una extensión para funciones de ggplot2 (van den Brand, 2023). Se seleccionó el método de clasificación de taxones por género además de que se especificó se mostrarán los 20 taxones más representativos. Se crearon gráficos diferenciales por agrupación (Brunson y Read, 2023; van den Brand, 2023)..

Para hacer medidas de beta diversidad se hizo un mapa de calor dónde se comparan las muestras entre ellas mismas para ver qué tan similares o no son. Para ello se utilizó la medida de similitud de Bray-Curtis que toma en cuenta la abundancia de las muestras (Bray y Curtis, 1957) y no sólo la presencia o ausencia como la medida de Jaccard (Jaccard, 1912). A su vez se realizó un gráfico de análisis de componentes principales para observar tanto la alfa como beta diversidad y qué tanto es explicado y compartido en las muestras por las métricas.

En estos comandos se generan gráficos de mapa de calor donde se comparan muestras con muestras genera un gráfico de distancia utilizando el método de distancia de Bray-Curtis. Se utiliza la variable Tratamiento como la variable de agrupación para comparar las distancias entre las muestras. Para el análisis de componentes principales Este comando genera un gráfico de ordenamiento (PCoA) utilizando el método de análisis de coordenadas principales (PCoA). Se utiliza la variable Tratamiento para agrupar las muestras y se asigna el color, tamaño y transparencia basándose en las variables Tratamiento, Observe y Pielou, respectivamente.

7 Resultados y Discusión

Se llevó a cabo el tratamiento subcrónico con 30 mg/kg de peso de la rTBL-1 en ratas macho Sprague Dawley. Los datos toxicológicos fueron analizados por Ríos Ortiz (2022), no se encontraron cambios en el peso corporal a lo largo de los 28 días de tratamiento ni posteriormente, durante seis semanas de recuperación sin tratamiento, tampoco se registraron cambios en el consumo de agua y alimento respecto al control sin tratamiento. No se observaron efectos toxicológicos ni antinutricios aparentes, incluso en la ganancia de peso corporal como los observados anteriormente con la FCL (Ferriz-Martínez y col., 2015; García-Gasca y col., 2012; Pita-López y col., 2020). Los sujetos de estudio mostraron signos de salud adecuada y experimentaron un aumento gradual y consistente de peso tanto durante la fase de administración como en la fase de recuperación.

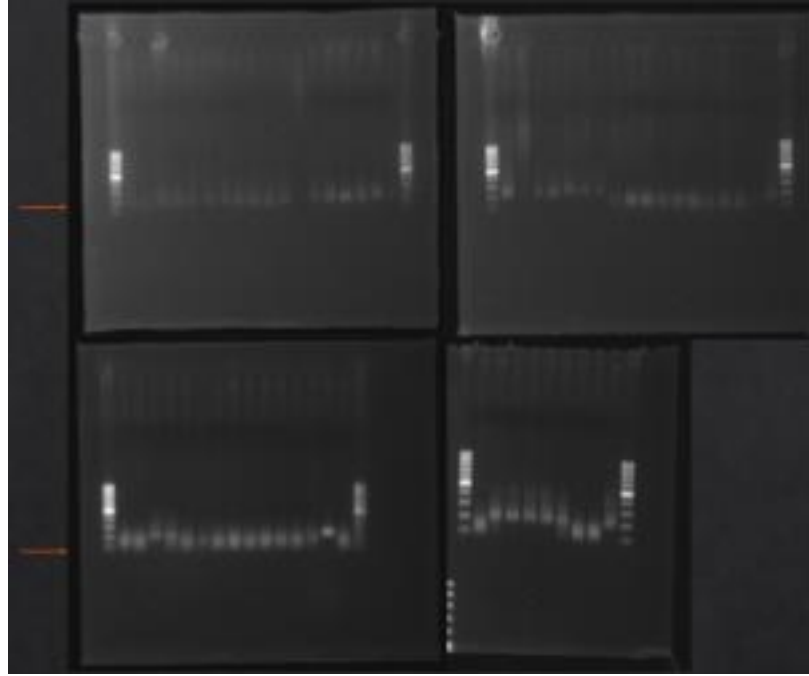
7.1 Extracción y secuenciación de ADN

Se extrajo el ADN de 106 muestras con cuatro repeticiones, obteniendo una concentración promedio de 0.062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una relación promedio de absorbancia 260/280 de 1.854. Estos resultados aseguraron la calidad del material genético extraído. Se amplificó la región V3 del ARN ribosomal bacteriano (Figura 4). Dentro de la región 16s del ARN ribosomal la cual contiene nueve regiones variables la región V3 ha sido determinada en consenso cómo una de las que mayor información en cuanto a diversidad bacteriana puede detectar, incluso se llega a usar como código de barras genético en métodos de secuenciación modernos (Bukin y col., 2019).

Todas las muestras presentaron amplificaciones del tamaño esperado entre 100-200pb tras amplificar la región v3 del 16S en ellas. Posteriormente se verificó la correcta amplificación. Se esperaba un tamaño similar al anterior de 100 a 200 pb, debido a que los índices son pequeños, con solo unas cuantas pares de bases.

Además, se rectificaron aquellas muestras que aparentemente no habían amplificado la región V3.

A



B

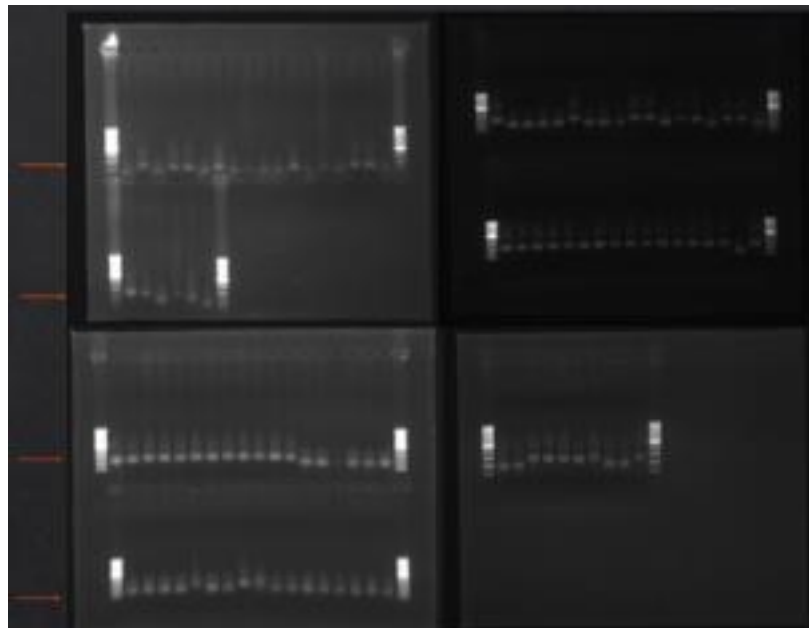


Figura 4. Verificación de amplificación PCR de la región V3. (A) Se verificó por medio de gel de agarosa la amplificación de la región V3 de los productos de PCR

de las 106 muestras. El producto esperado después de la PCR para la región V3 en todas las muestras es de 100-200 pb. (B) Una vez observada la amplificación de la región V3 en las muestras se continuó con la verificación de la adición de las secuencias índices. El producto esperado es similar ya que los índices son sólo unas pequeñas bases añadidas por lo cuál se esperó observar bandas entre los 100 a 200 pb nuevamente.

En el Anexo 1 se muestra el número de secuencias que se procesaron inicialmente y las que pasaron por cada uno de los filtros. Se mantuvo un QScore de 40 en todas las muestras. Además, se presenta el porcentaje final de las secuencias que superaron cada uno de los filtros. Esta métrica proporciona información sobre la calidad de la secuenciación.

7.2 Análisis de las secuencias de contenido colónico

7.2.1 Análisis del bacterioma por género de acuerdo a la edad de las ratas.

Las secuencias del bacterioma del contenido colónico se analizaron de acuerdo a género. Se comparó el bacterioma de las ratas control al tiempo cero (6 semanas de edad), después de los 28 días (10 semanas de edad) y al término de la fase de recuperación a los 70 días (16 semanas de edad). En la Figura 5 se muestra la frecuencia de los principales géneros bacterianos en las muestras de contenido colónico al tiempo cero del experimento en ratas de 6 semanas de edad. En las Figuras 6 y 7 se observan las frecuencias de los géneros bacterianos a los 28 y a los 70 días de experimentación, ratas de 10 y 16 semanas de edad, respectivamente.

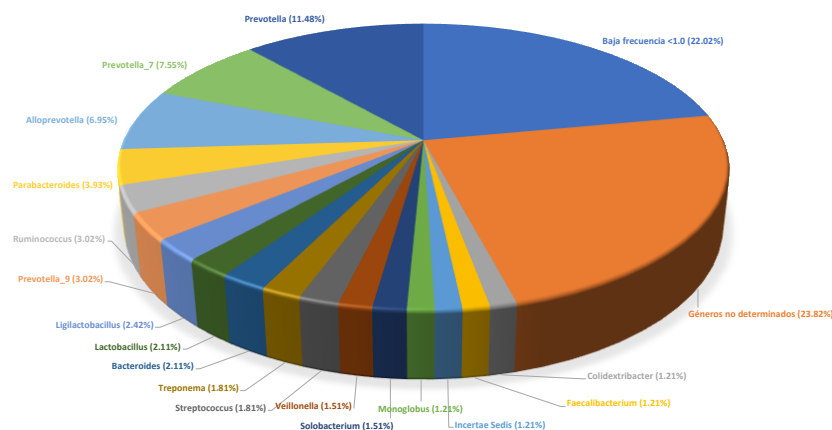


Figura 5. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas de seis semanas de edad (tiempo cero). Seis ratas Sprague Dawley de seis semanas de edad fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por métodos bioinformáticos.

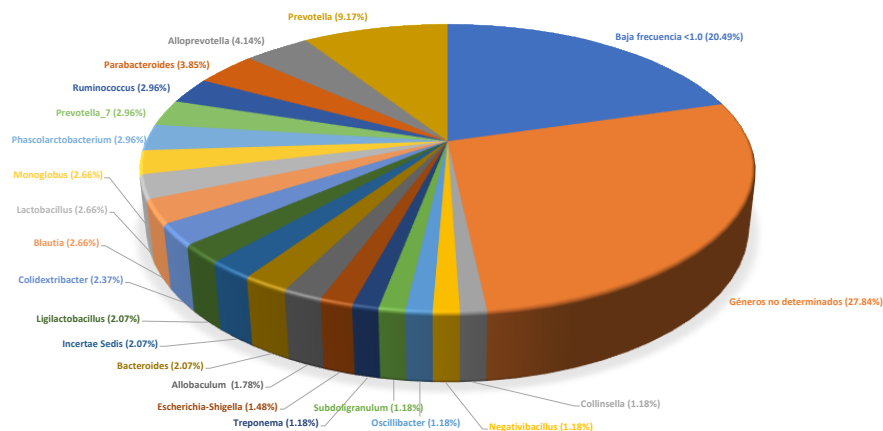


Figura 6. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas de 10 semanas de edad. Seis ratas Sprague Dawley de 10 semanas de edad del grupo control del experimento fueron sacrificadas al término de 28 días y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por métodos bioinformáticos.

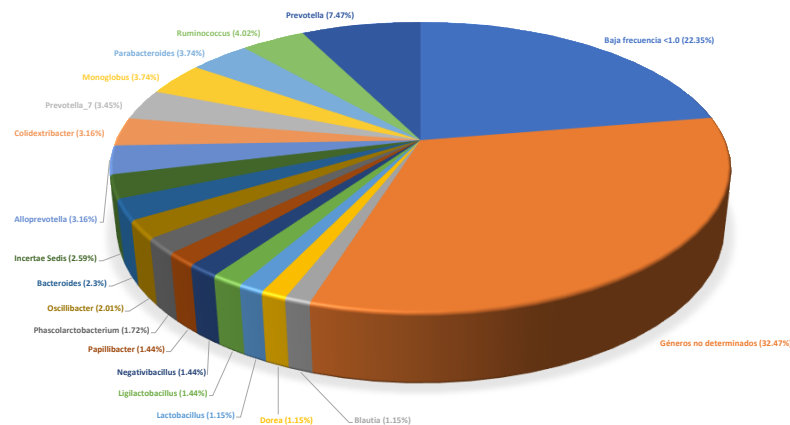


Figura 7. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas de 16 semanas de edad. Seis ratas Sprague Dawley de 16 semanas de edad del grupo control del experimento fueron sacrificadas al término de 70 días y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por métodos bioinformáticos.

Al comparar las frecuencias entre los tres grupos de edad (Figura 8), se observan cambios en diferentes géneros bacterianos, entre ellos: disminución de la frecuencia de *Alloprevotella*, *Faecalibacterium*, *Ligilactobacillus*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, *Treponema* y *Veillonella*. *Solobacterium* y *Veillonella*, incluso, no pudieron ser detectados en las muestras de animales de 16 semanas de edad. A su vez, se determinó el incremento de los géneros *Colidextribacter*, *Dorea*, *Incertae Sedis*, *Monoglobus*, *Negativibacillus*, *Oscillibacter*, *Papillibacter* y *Ruminococcus*. En este caso no fueron detectados *Dorea* y *Papillibacter* en las muestras de animales de seis semanas, pero si en muestras de animales de mayor edad.

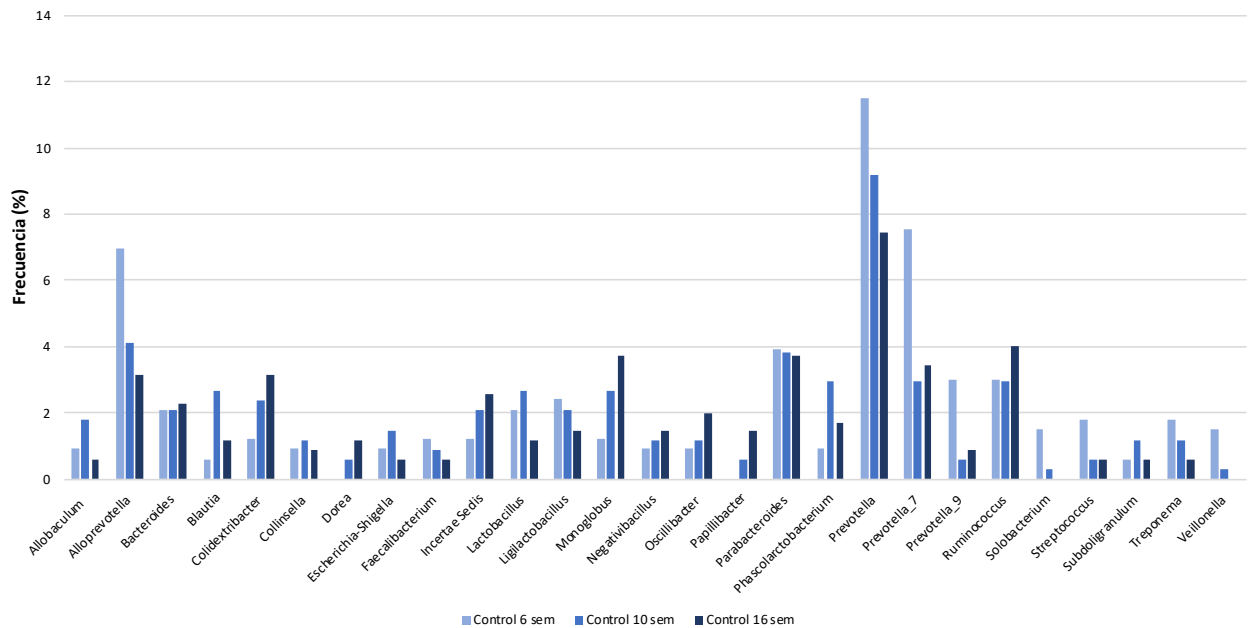


Figura 8. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos de acuerdo a la edad. Ratas Sprague Dawley de seis, 10 y 16 semanas de edad fueron sacrificadas al tiempo cero, 28 y 70 días de experimentación. Se tomó muestra del contenido colónico, se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos.

El análisis de muestras según sus edades (Figura 9) muestra la curva de rarefacción para los tres grupos, lo que indica que el tamaño de la muestra es adecuado para capturar la riqueza posible. Además, sugiere que las comunidades de seis y diez semanas de edad, 28 y 70 días de experimentación, respectivamente, son similares, ya que sus curvas se superponen. Para confirmar esto, se realizaron mediciones de índices de diversidad y comparativas estadísticas entre los grupos. Ninguno de los valores de p fue menor a 0.05, lo que indica que los grupos no son significativamente diferentes.

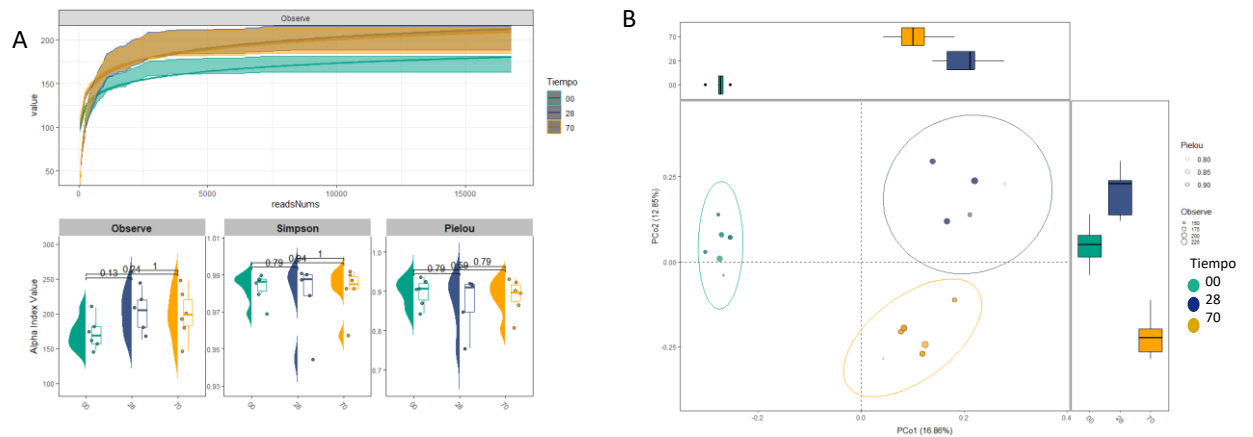


Figura 9. Análisis de la diversidad bacteriana por edad. Ratas Sprague Dawley de seis, 10 y 16 semanas de edad fueron sacrificadas al tiempo cero, 28 y 70 días de experimentación. Se tomó muestra del contenido colónico, se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. A) Curvas de rarefacción para los tiempos 00 (ratas de seis semanas de edad), 28 días de experimentación (ratas de 10 semanas de edad) y 70 días de experimentación (ratas de 16 semanas de edad). B) Análisis de coordenadas de dos dimensiones.

Observando los valores de riqueza observada y el índice de Simpson, los grupos de seis y 10 semanas de edad (28 y 70 días de experimentación, respectivamente) son similares, sin embargo, al comparar con el índice de Pielou se observan algunas diferencias. Estas diferencias se reflejan gráficamente en el análisis de componentes principales donde se muestran patrones de dos dimensiones que representan las tres comunidades. La comunidad del grupo 00 (seis semanas de edad) está claramente aislada de las otras dos, lo que indica una diferencia significativa entre esta comunidad y las demás. En cuanto a los grupos de 28 (10 semanas de edad) y 70 días (16 semanas de edad), comparten ciertos componentes, pero no lo suficiente como para considerar que son idénticas o muy similares.

En resumen, se puede concluir que, de acuerdo con la edad de los individuos, las comunidades bacterianas presentan diferencias significativas. A medida que los individuos son más jóvenes, su composición microbiológica tiende a diferir considerablemente de la de los individuos maduros. Es posible observar que la diversidad bacteriana de animales de seis semanas de edad es completamente distinta a la de animales de 10 y 16 semanas de edad. Sin embargo, también es posible identificar que la diversidad bacteriana de animales de 10 y 16 semanas se encuentra agrupados por separado, lo que sugiere cambios significativos.

7.2.2 Análisis del bacterioma por género después del tratamiento con rTBL-1 por 28 días.

El análisis de los contenidos colónicos entra las ratas control y las tratadas con rTBL-1 por 28 días mostró cambios en la frecuencia de distintos géneros. En la Figura 10 se muestra la frecuencia de los principales géneros bacterianos en los contenidos colónicos de ratas tratadas con 30 mg/kg de peso vía intragástrica diariamente. La Figura 11 muestra la comparación entre ratas control y ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días, así como los cambios de acuerdo a los principales géneros detectados.

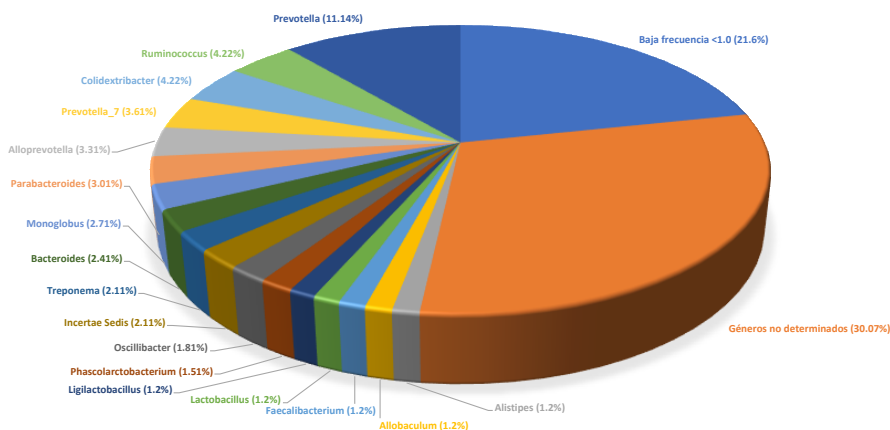


Figura 10 Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días. Seis ratas Sprague Dawley fueron tratadas con

30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos.

Se observó disminución (de mayor a menor) en *Subdoligranulum*, *Blautia*, *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus*, *Phascolarctobacterium* y *Ligilactobacillus* principalmente. Por su parte, los géneros que más incrementaron fueron *Treponema*, *Colidextribacter*, *Oscillibacter*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium*. Sin embargo, *Prevotella* prevaleció como el género más abundante.

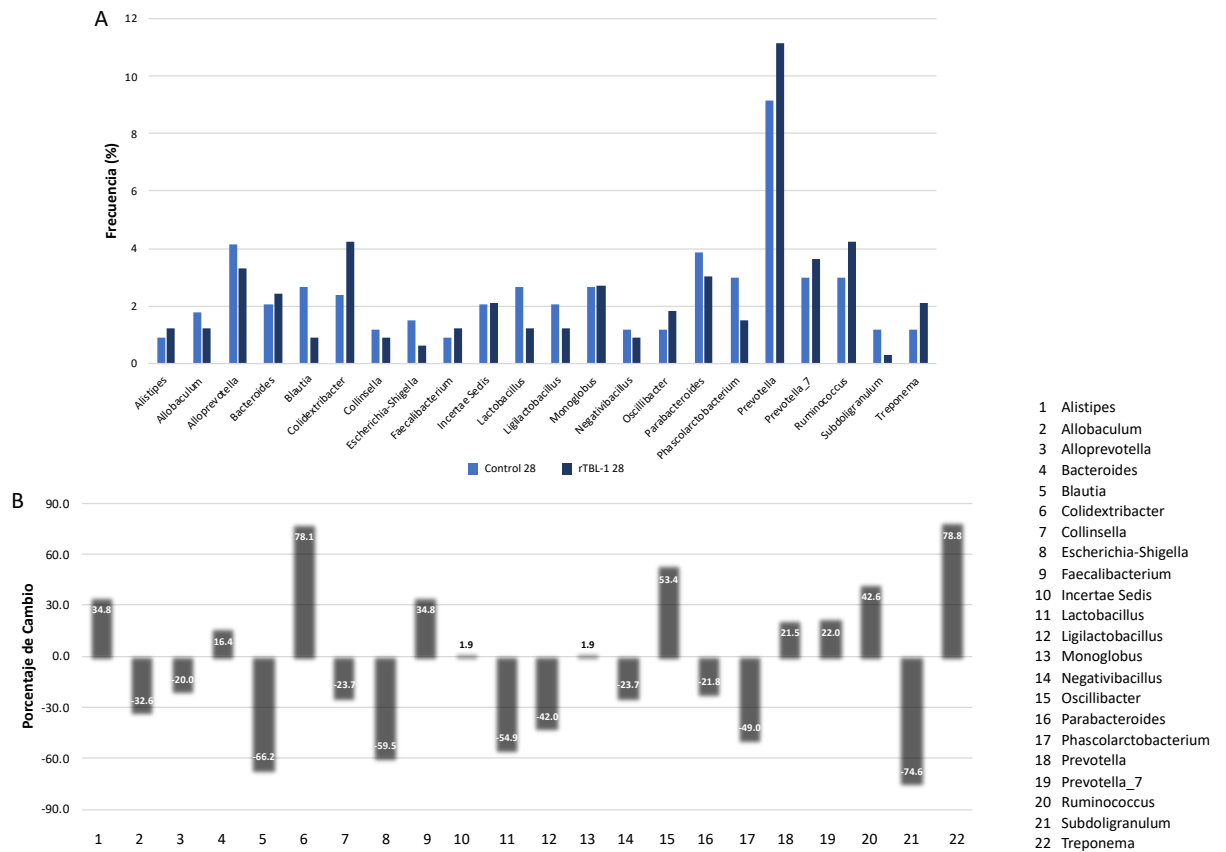


Figura 11. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se

extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control.

La Figura 12 muestra la curva de rarefacción, métricas de alfa diversidad y análisis de coordenadas para animales tratados con rTBL-1 y sus controles. Se observa solapamiento en las curvas de rarefacción, lo que sugiere que comparten parcialmente la composición de la diversidad bacteriana. Las curvas de rarefacción agrupada muestran la asíntota lo que indica que el tamaño de la muestra es adecuado para encontrar toda la riqueza de especies en las muestras. Las métricas utilizadas mediante los índices de Simpson y Pielou no muestran diferencias estadísticas significativas entre la diversidad de un grupo y el otro. Además, el análisis de coordenadas de dos dimensiones muestra solapamiento, lo que indica similitud entre las muestras.

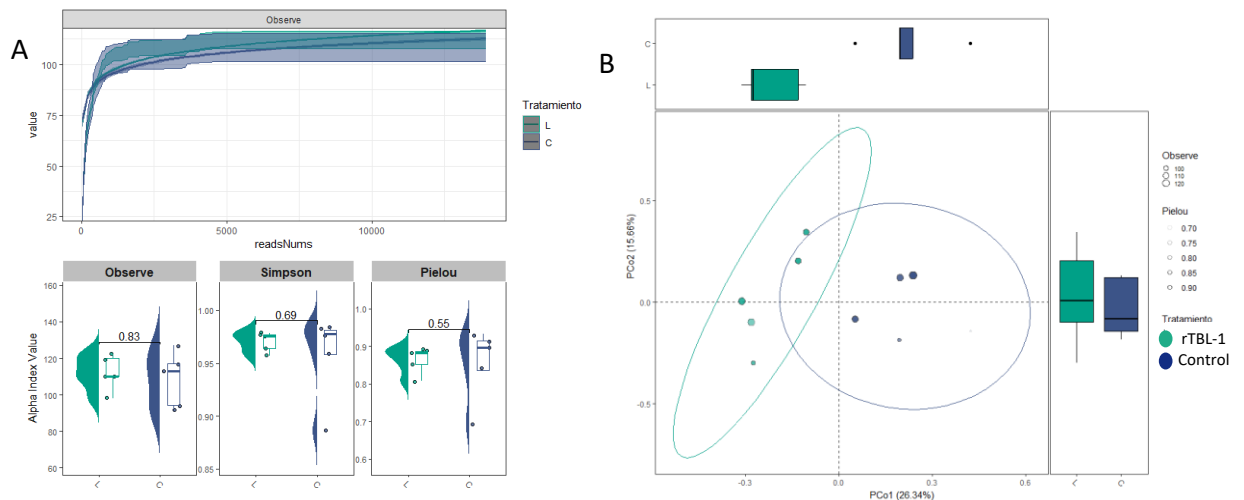


Figura 12. Análisis de la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 y sus controles. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al

control. A) Curvas de rarefacción para el tratamiento subcrónico. B) Análisis de coordenadas de dos dimensiones.

La Figura 13 muestra los mapas de calor que expresan la similitud entre individuos de los dos grupos experimentales, así como la agrupación por géneros bacterianos. Es importante destacar que, mientras los individuos dentro del grupo control son muy similares entre sí, los individuos dentro del grupo de lectina parecen tener una mayor disimilitud según la medida de Bray-Curtis y la escala de colores presentada en el mapa de calor. Esto se refleja en la observación de que, en el grupo control, al comparar los individuos de este grupo entre sí, los colores son más claros. Por lo tanto, se puede inferir que hay una mayor uniformidad en la composición bacteriológica entre los individuos del grupo control, mientras que los individuos del grupo de lectina tienen una composición menos uniforme. Además, el dendograma también agrupa a los individuos con composiciones similares. En la Figura 13B, se muestra la similitud entre los grupos, donde se observa que entre individuos de los dos grupos (control y tratamiento) se comparte la diversidad microbiana en general, sin embargo, las abundancias identificadas muestran cambios relevantes.

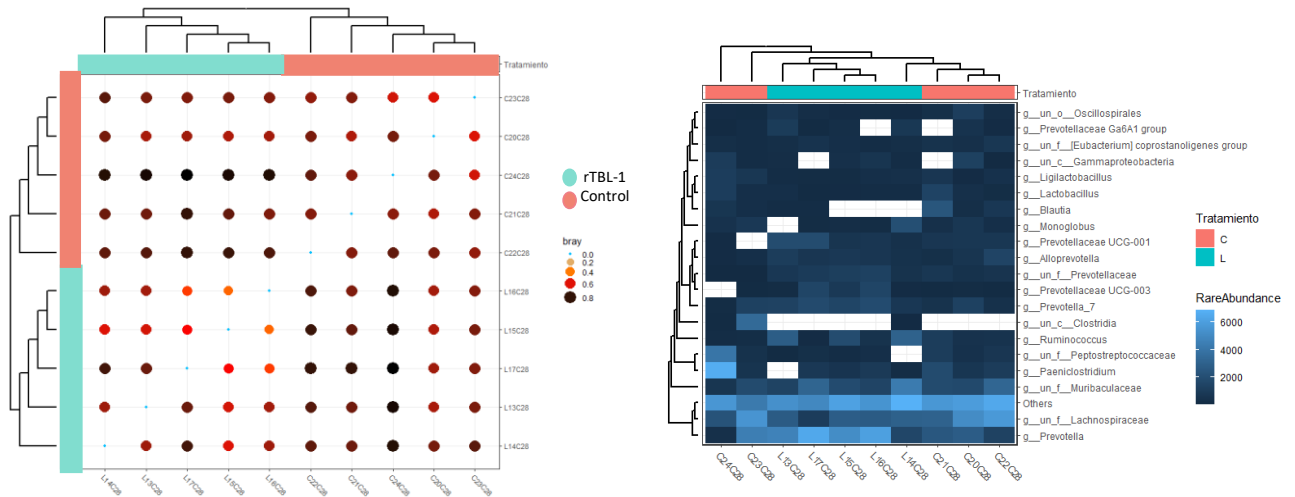


Figura 13. Análisis de mapas de calor para la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 y sus controles. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente fueron

sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control.

7.2.3 Análisis del bacterioma por género después del periodo de recuperación sin tratamiento con rTBL-1 por seis semanas.

Después del tratamiento por 28 días con la rTBL-1 se permitió que los animales permanecieran por seis semanas sin tratamiento para observar si se presentaban cambios. La Figura 14 muestra las frecuencias de los géneros bacterianos en los contenidos colónicos de ratas que se recuperaron del tratamiento por seis semanas (70 días de experimentación).

La comparación entre el grupo control y los animales sometidos previamente al tratamiento con rTBL-1 se muestra en la Figura 15. Los géneros que mayormente disminuyeron fueron *Monoglobus*, *Colidextribacter*, *Blautia*, *Phascolarctobacterium*, *Oscillibacter* y *Negativibacillus*. Por su parte, los que más incrementaron fueron *Prevotella*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Alloprevotella*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* y *Ligilactobacillus*. Los géneros que no fueron detectados en las muestras de los animales tratados después del periodo de recuperación fueron *Dorea* y *Pipillibacter*, a su vez se detectaron los géneros *Solobacterium* y *Veillonella* solo en animales tratados previamente con rTBL-1 pero no en los controles.

En la Figura 16 se observa la métrica de alfa diversidad mediante la curva de rarefacción y análisis de coordenadas para animales tratados con rTBL-1 y sus controles y que permanecieron por seis semanas sin tratamiento. Se observa que ambos casos muestran solapamiento en la agrupación de sus muestras, principalmente en el análisis de coordenadas, lo que sugiere que después del tratamiento con rTBL-1 se recupera la composición bacteriana en los animales. Es importante notar que, aunque el PCA muestra patrones entre las comunidades compartidos, aquellos pertenecientes al tratamiento parecen mostrar mayor

dispersión comparados a con los controles, esto puede indicar que la composición de las comunidades de esas muestras puede ser más diversa que la del grupo control que puede estar más uniforme. La curva de rarefacción agrupada muestra la asíntota lo que indica que el tamaño de la muestra es adecuado para encontrar toda la riqueza de especies en las muestras. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la diversidad de un grupo y el otro.

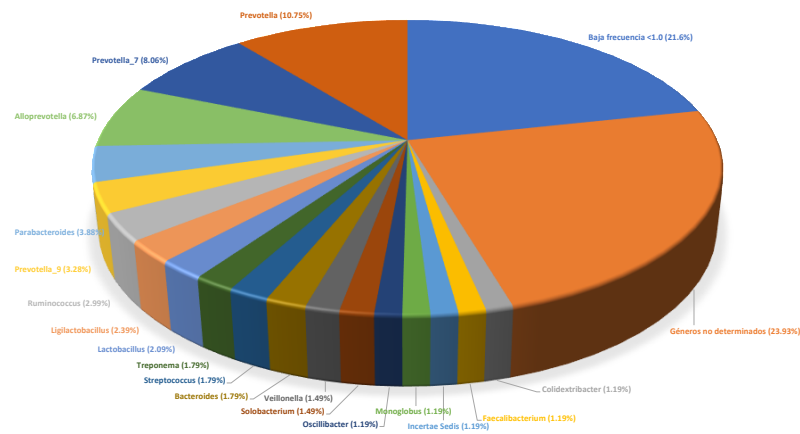


Figura 14. Frecuencia relativa de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y después de un periodo de recuperación de seis semanas. Seis ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente permanecieron sin tratamiento por seis semanas, fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos.

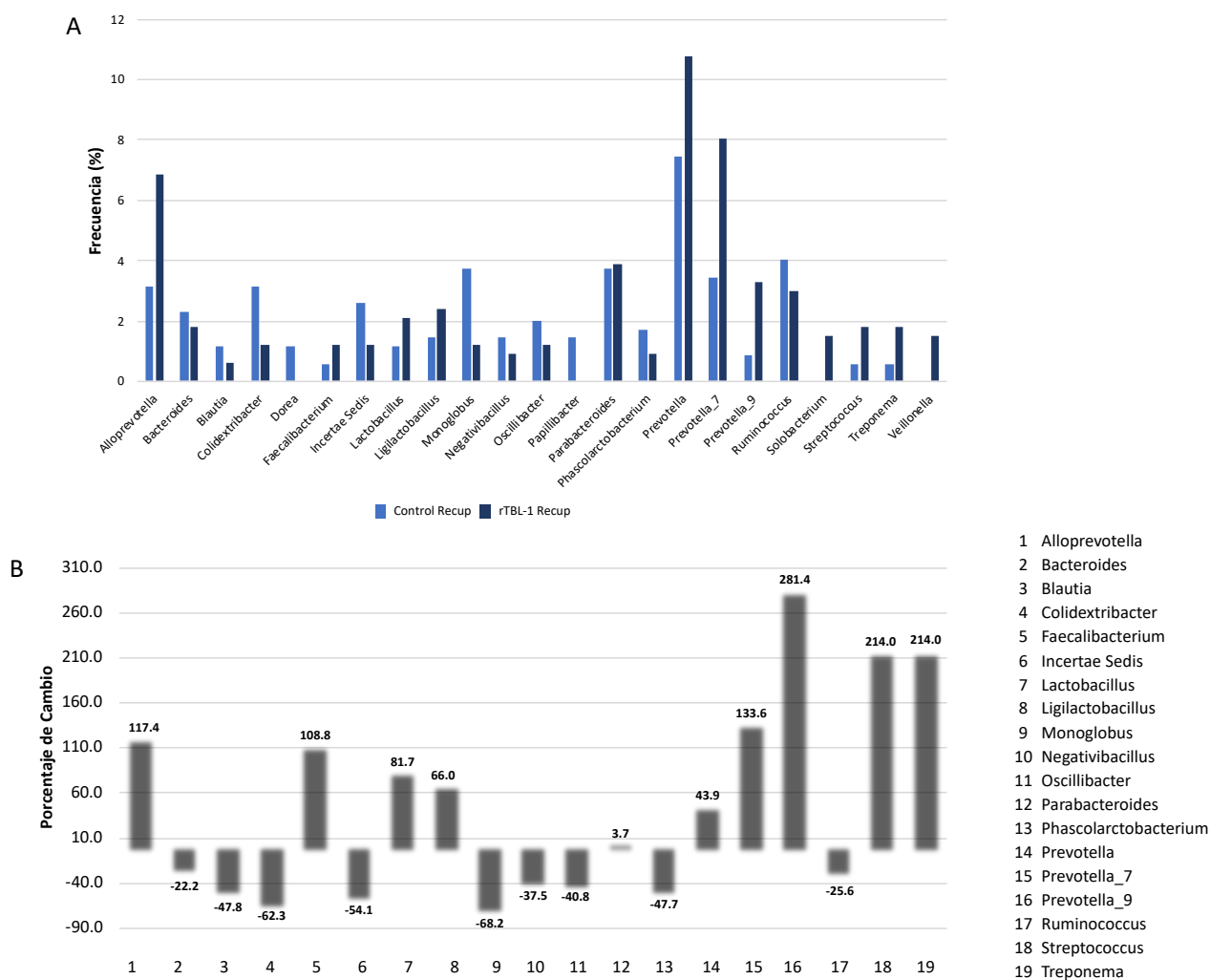


Figura 15. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y después de un periodo de recuperación de seis semanas. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente permanecieron sin tratamiento por seis semanas, fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestra el análisis comparativo respecto al control.

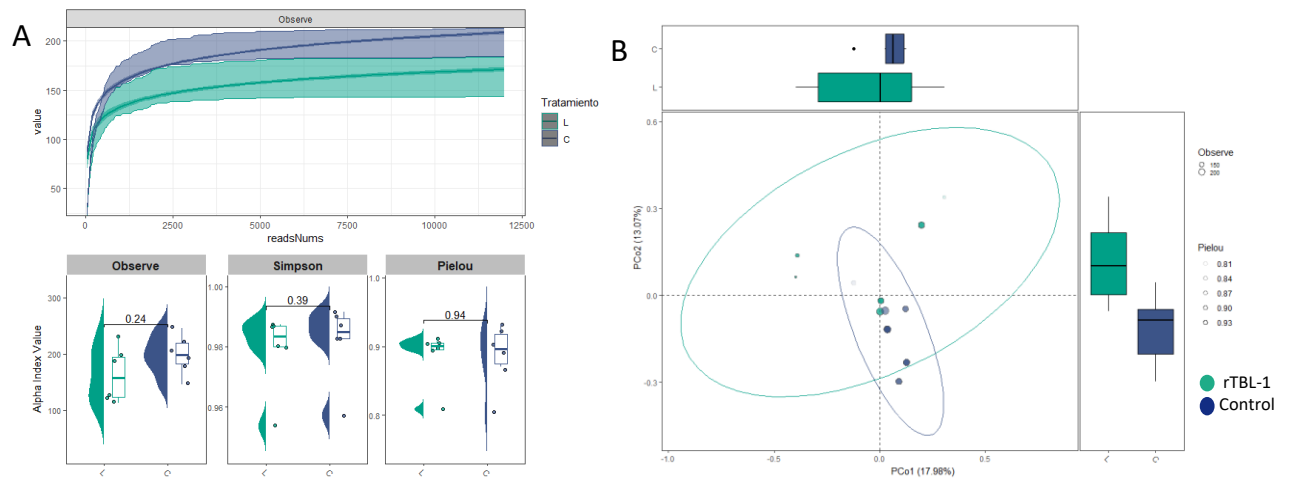


Figura 16. Análisis de la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y después de un periodo de recuperación de seis semanas. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente permanecieron sin tratamiento por seis semanas, fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control. A) Curvas de rarefacción para el periodo de recuperación. B) Análisis de coordenadas de dos dimensiones.

La Figura 17 muestra los mapas de calor que expresan una mayor similitud entre individuos de los dos grupos experimentales, así como la agrupación por géneros bacterianos. Es posible observar que la similitud es mayor que en el caso de la comparación entre el grupo control y el tratado con rTBL-1 al final de la administración a los 28 días. Lo anterior sugiere que la rTBL-1 ejerce un efecto sobre determinados géneros bacterianos y, al dejar de ser administrada por seis semanas, los animales recuperan parcialmente la diversidad microbiana respecto a los animales del grupo control.

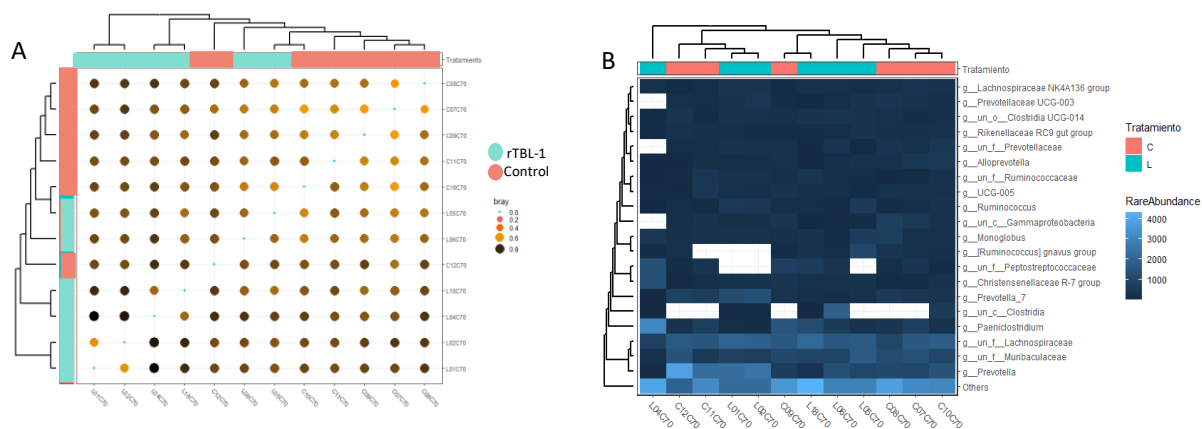


Figura 17. Análisis de mapas de calor para la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 y sus controles y después de un periodo de recuperación de seis semanas. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días, posteriormente permanecieron sin tratamiento por seis semanas, fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control.

7.2.4 Comparación del bacterioma por género entre ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas que permanecieron en recuperación sin tratamiento con rTBL-1 por seis semanas.

Con la finalidad de conocer el efecto del tratamiento por 28 días con rTBL-1 y el efecto de la fase de recuperación por seis semanas, se muestra el análisis comparativo entre los dos grupos: ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y seis semanas de recuperación postratamiento. La Figura 18 muestra el análisis comparativo de las frecuencias en donde se observan mayores cambios a la baja para los géneros *Colidextribacter*, *Monoglobus*, *Phascolarctobacterium*, *Oscillibacter* y *Blautia*. Sin embargo, los mayores cambios se observaron en el incremento de géneros como *Solobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella sp.*, *Alloprevotella*, *Subdoligranulum*, *Ligilactobacillus*, *Streptococcus* y

Lactobacillus. Los géneros *Dorea* y *Papillibacter* no fueron detectados después del periodo de recuperación de seis semanas.

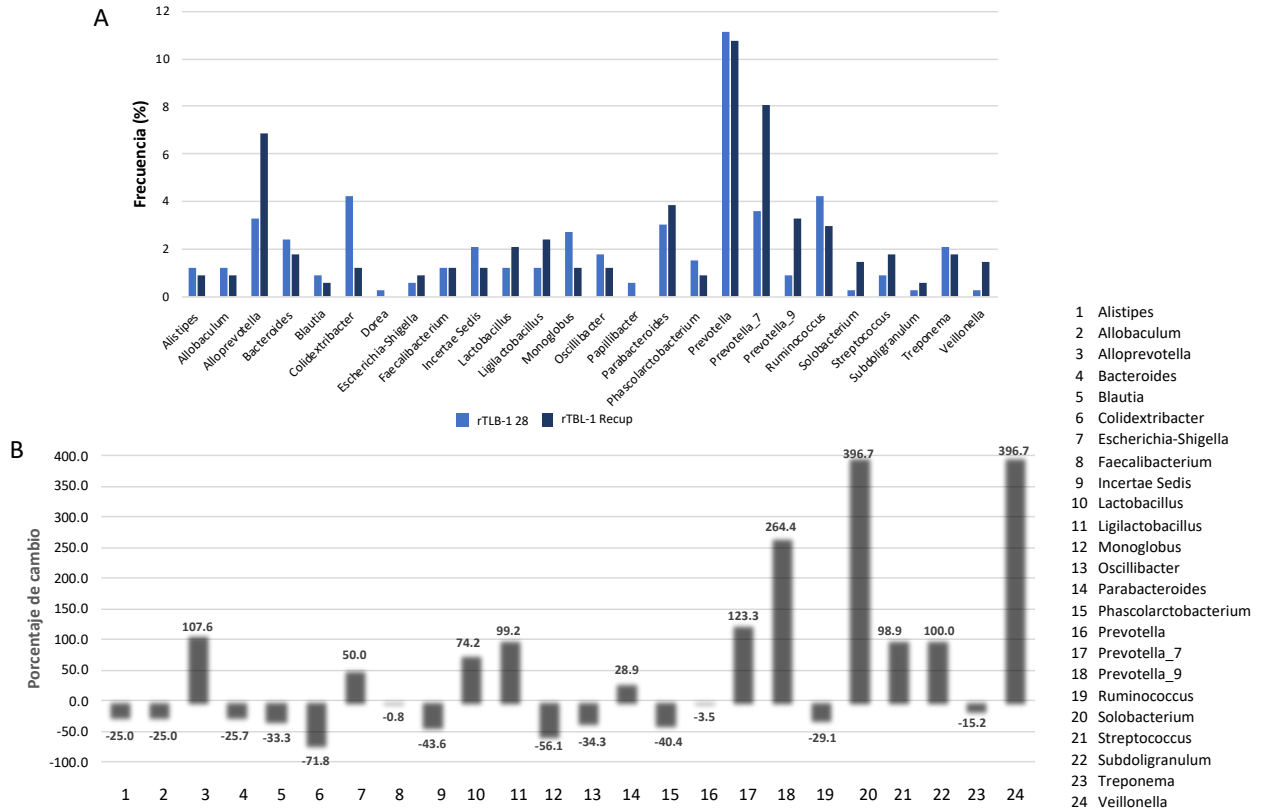


Figura 18. Comparación de las frecuencias relativas de los principales géneros bacterianos entre ratas recién expuestas a rTLB-1 por 28 días y ratas que se mantuvieron después de un periodo de recuperación de seis semanas. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTLB-1 por 28 días. Un grupo de seis ratas se sacrificó para obtener los contenidos colónicos y otro grupo permaneció sin tratamiento por seis semanas más, posteriormente fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control.

La Figura 19 muestra el análisis del índice alfa mediante curva de rarefacción y análisis de coordenadas, en donde se observa una marcada diferencia en las

diversidades bacterianas, sugiriendo un efecto directo de la rTBL-1 que se elimina parcialmente después de seis semanas de recuperación. Por su parte, la Figura 20 muestra los mapas de calor que exhiben mayores semejanzas entre individuos del mismo grupo y menores similitudes entre grupos distintos.

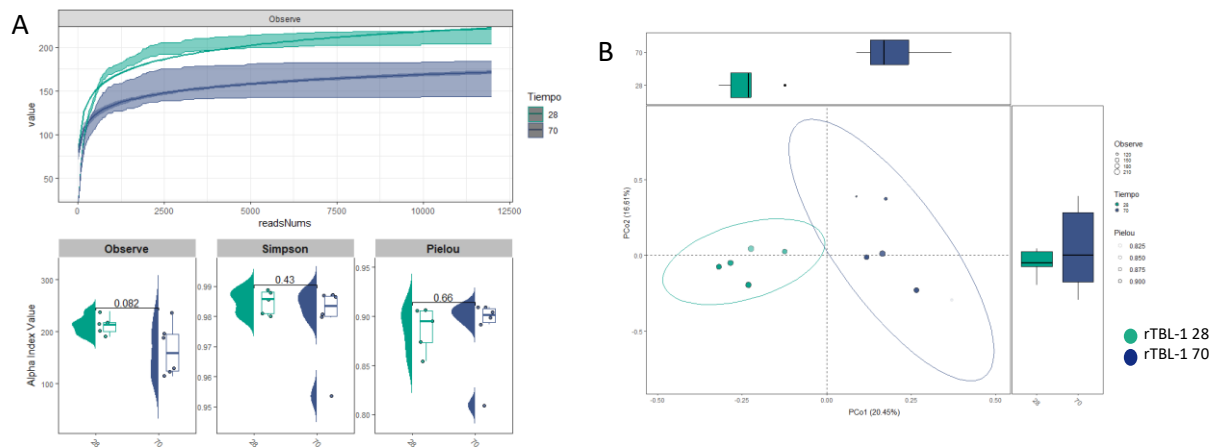


Figura 19. Análisis de la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas tratadas por 28 días y mantenidas en periodo de recuperación de seis semanas. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días. Un grupo de seis ratas se sacrificó para obtener los contenidos colónicos y otro grupo permaneció sin tratamiento por seis semanas más, posteriormente fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control. A) Curvas de rarefacción. B) Análisis de coordenadas de dos dimensiones.

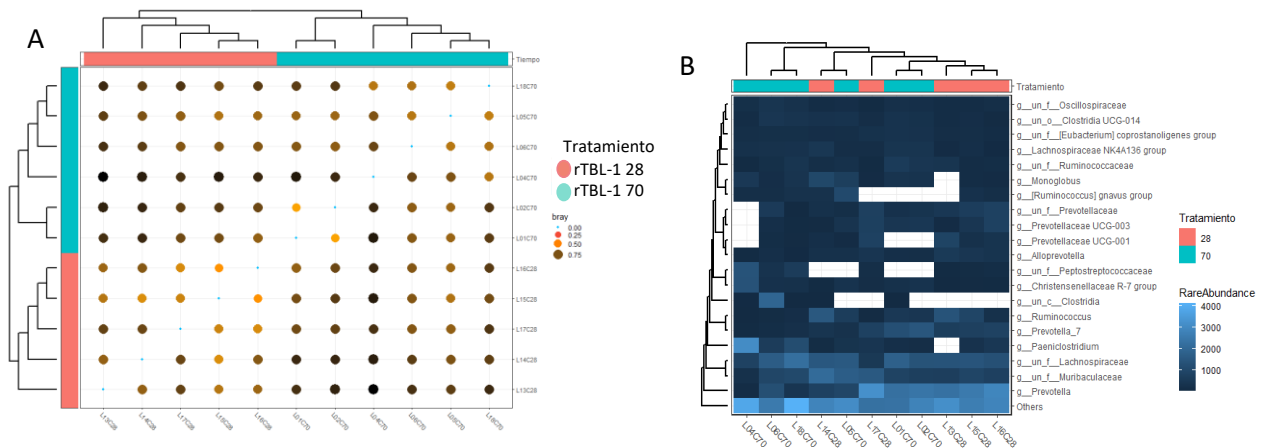


Figura 20. Análisis de mapas de calor para la diversidad bacteriana en ratas tratadas con rTBL-1 por 28 días y ratas tratadas y mantenidas en periodo de recuperación de seis semanas. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con 30 mg/kg de peso diariamente con rTBL-1 por 28 días. Un grupo de seis ratas se sacrificó para obtener los contenidos colónicos y otro grupo permaneció sin tratamiento por seis semanas más, posteriormente fueron sacrificadas y se tomó muestra del contenido colónico. Se extrajo el ADN de la región V3, se amplificó y se analizó por medios bioinformáticos. Se muestran comparados datos respecto al control.

De forma general es posible observar que existe un efecto relacionado con la edad de las ratas que es importante tomar en cuenta para el análisis del efecto de la rTBL-1 (Tabla 1).

Tabla 1 Comparación de las tendencias en los cambios de frecuencia de géneros bacterianos por efecto de la edad y tratamiento con rTBL-1.

Género	Efecto de la edad	C vs rTBL-1 Trat 28 días	C vs Recup rTBL-1 70 días	rTBL-1 28 días vs Recup 70 días	Posible efecto rTBL-1	Posible efecto recuperación
<i>Alistipes</i>	Baja frecuencia	(+)	(--)*	(-)	Inducción	Recuperación
<i>Allobaculum</i>	Sin tendencia	(-)	(--)*	(-)	Sin efecto	Sin efecto
<i>Alloprevotella</i>	Disminuyó	(-)	(+++)	(++)	Sin efecto	Inducción
<i>Bacteroides</i>	Sin cambios	(+)	(-)	(-)	Inducción	Recuperación
<i>Blautia</i>	Sin tendencia	(--)	(-)	(-)	Sin efecto	Sin efecto
<i>Colidextribacter</i>	Incrementó	(++)	(--)	(--)	Inducción	Recuperación
<i>Collinsella</i>	Sin cambios	(-)	(--)*	(--)*	Sin efecto	Sin efecto
<i>Escherichia-Shigella</i>	Sin tendencia	(--)	(--)*	(--)	Sin efecto	Sin efecto
<i>Faecalibacterium</i>	Disminuyó	(+)	(+++)	(-)	Inducción	Inducción
<i>Lactobacillus</i>	Sin tendencia	(++)	(++)	(++)	Inducción	Inducción
<i>Ligilactobacillus</i>	Disminuyó	(-)	(++)	(++)	Sin efecto	Inducción

<i>Monoglobus</i>	Incrementó	(+)	(--)	(--)	Inducción	Recuperación
<i>Oscillibacter</i>	Incrementó	(++)	(-)	(-)	Inducción	Recuperación
<i>Parabacteroides</i>	Disminuyó	(-)	(+)	(+)	Sin efecto	Inducción
<i>Phascolarctobacterium</i>	Sin tendencia	(+)	(-)	(-)	Inducción	Recuperación
<i>Prevotella</i>	Disminuyó	(+)	(+)	(-)	Inducción	Recuperación
<i>Prevotella_7</i>	Disminuyó	(+)	(++)	(+++)	Inducción	Inducción
<i>Prevotella_9</i>	Disminuyó	(--)*	(+++)	(+++)	Disminución	Inducción
<i>Ruminococcus</i>	Incrementó	(+)	(-)	(-)	Inducción	Recuperación
<i>Solobacterium</i>	Disminuyó	(--)*	(--)*	(+++)	Disminución	Inducción
<i>Streptococcus</i>	Disminuyó	(--)*	(+++)	(++)	Disminución	Inducción
<i>Subdoligranulum</i>	Sin tendencia	(--)	(--)*	(+++)	Disminución	Inducción
<i>Treponema</i>	Disminuyó	(++)	(+++)	(-)	Inducción	Sin efecto
<i>Veillonella</i>	Disminuyó	(--)*	(--)*	(+++)	Disminución	Inducción

* Muestras con frecuencias menores al 1%

Es importante destacar la alta abundancia del filo *Bacteroidetes*, al cual pertenece *Prevotella*. Para el día 28 en adelante se observa dominancia de la comunidad por

Firmicutes y después *Bacteroidetes*. Estos cambios pueden estar influenciados por la maduración de las ratas y cómo su composición microbiológica atraviesa un periodo de maduración hasta estabilizarse, siendo influenciado por factores ambientales. Este efecto de cambio en la composición y estructuración de las comunidades bacterianas con respecto al tiempo de maduración ya había sido observado previamente con la fracción concentrada de lectina (Pita-López y col., 2020). Además, se ha reportado ampliamente que en ratas, tras llegar a su periodo de maduración, su composición microbiológica se modifica por cambios en factores ambientales (Čoklo y col., 2020; Inoue y Ushida, 2003; Yajima y col., 2001).

En todos los casos se observa alta abundancia del género *Prevotella*, misma que se ha documentado como un género asociado a enfermedades intestinales como la enfermedad de Crohn (Könönen y Gursoy, 2022; Lucke y col., 2006; Qi y col., 2021). La presencia de este género se ha reportado en heces (Nagpal y col., 2018), sin embargo, *Prevotella* pertenece al grupo de bacterias anaeróbicas (Könönen y Gursoy, 2022).

Es importante destacar que en las muestras hay presencia de grupos diferentes entre sí, como en el caso de *Prevotella_7* y *Prevotella_9* (Henderson y col., 2019) pero debido a las limitaciones de los equipos de secuenciación, entrenadores o fidelidad para detectar especies, no se puede identificar específicamente a que especies son estos grupos. Se debe tener en cuenta entonces este factor al momento de hacer una inferencia ya que no es posible saber si realmente todas las especies del género *Prevotella* están asociadas a enfermedades intestinales o no, por lo que enfocarse en una detección más detallada de este género sería algo ideal a futuro. Cabe destacar también la presencia de un género cercano a este, *Alloprevotella*, el cual suele estar asociado a la salud bucal, aunque en el contexto del tracto intestinal es considerado un género asociado a la salud de este órgano (Tian y col., 2021). En este estudio, este género incrementó durante el periodo de recuperación, lo que sugiere un proceso de compensación.

Alistipes es un género bacteriano que está cobrando relevancia debido a su asociación con efecto protector contra algunas enfermedades como fibrosis del hígado, colitis, cáncer y enfermedades cardiovasculares, sin embargo también se ha mostrado cómo un agente patógeno en cáncer colorrectal y está asociado con signos de enfermedades mentales, por lo que estudios más detallados son necesario en este género al ser de importancia emergente (Parker y col., 2020). En el presente estudio se pudo observar un aumento en la presencia de este género durante el periodo de administración de la lectina, pero hubo disminución durante el periodo de recuperación, lo que podría sugerir que el género está relacionado con el estrés que provoca la lectina.

Por su parte, el género *Allobaculum* ha sido recientemente asociado como un degradador de la mucina de las mucosas (Van Muijlwijk y col., 2021). En este estudio, aunque era un género abundante, no mostró una tendencia a incrementar por lo que podría ser un género común en la composición de las comunidades bacterianas en ratas. *Bacteroides* es el género más común en la microbiota intestinal, por lo que su presencia es esperada siempre, su ausencia sería un motivo de preocupación por el contrario (Zafar y Saier, 2021). *Blautia* ha cobrado interés debido a que se ha asociado como un género protector contra enfermedades inflamatorias y metabólicas, además de que suele ser antagonista a algunos microorganismos dañinos (Liu y col., 2021). En el presente estudio no se observó ninguna tendencia de aumento o disminución, pero sería interesante entender si su presencia podría influenciar a otros géneros bacterianos durante el estudio.

Colidextribacter no ha sido asociado directamente a algún efecto adverso, pero se ha encontrado en aumento en algunas enfermedades de interés como la colitis ulcerativa o el Alzheimer (Kang y col., 2022; Zhu y col., 2022). *Collinsela* es un género bacteriano asociado comúnmente con una buena circulación de insulina, sin embargo se ha reportado que una baja dieta en ingesta de fibra hace que su abundancia sea mayor en el intestino (Gomez-Arango y col., 2018). En este estudio se mantuvo sin cambios importantes. El grupo *Escherichia-Shigella* es atribuido

comúnmente junto con algunos componentes metabólicos como orquestadores de disbiosis en pacientes con algunas enfermedades alcohólicas (Baltazar-Díaz y col., 2022), que *Shigella* es filogenéticamente emparentado con *Escherichia coli*, sin embargo se consideran como especies diferentes con base en sus características bioquímicas y la importancia química de cada uno (Devanga Ragupathi y col., 2018). Durante el estudio no se pudo observar tendencia por parte de este grupo, sin embargo, se sugeriría hacer análisis más profundo como de inferencia metabólica para observar si pudieran estar generando algún daño en conjunto con productos metabólicos (Baltazar-Díaz y col., 2022).

Faecalibacterium, por su parte, es un género que se ha tomado como indicador de buena salud intestinal, su disminución en abundancia correlaciona con condiciones inflamatorias asociadas al tracto intestinal, además de que su abundancia también se ve afectadas en condiciones como la depresión o el cáncer de colon, por lo que disminución en este género es importante notarlo como un posible indicador de pobre salud intestinal (Martín y col., 2023). En este estudio se pudo observar un aumento a los 28 días al finalizar el tratamiento, así como un mayor incremento a los 70 días tras la recuperación, lo que sugiere que la exposición a la lectina induce la presencia de este género bacteriano, o que se trate de una forma de compensación debido a la alta abundancia de géneros asociados con enfermedades intestinales.

El género *Lactobacillus* es uno de los más importantes probióticos al actuar como reguladores del pH luminal, actuar como refuerzo para el incremento de mucosa, secreta péptidos antimicrobianos y modula la composición de la microbiota (Dempsey Corr, 2022; Rastogi y Singh, 2022). Su inducción con respecto al tiempo puede sugerir un mayor papel como regulador de otros patógenos antagonistas y ayudar a regular la salud del colon. Sin embargo, falta profundizar más en este aspecto, como el hecho de hacer inferencias metabólicas, así como posible detección de especies a futuro para poder realmente establecer alguna hipótesis sobre este comportamiento.

Ligilactobacillus es una reciente recategorización de varios géneros de *Lactobacillus*, esto da pie a su interés de ser considerado como probiótico además de que tienen algunas propiedades de interés como resistencia a la urea alta (Zheng y col., 2020). Dentro de todas las especies de este género hay una en especial, *Ligilactobacillus salivarius*, que ejerce un efecto modulador en las respuestas del sistema inmune y protección de infecciones (Indo y col., 2021). *Monoglobus* es un género con una sola especie en su haber y se ha documentado una función como degradador de pectina en el estómago (Kim y col., 2019). El género *Oscillibacter* ha sido detectado en gran abundancia en relación a estados de pobre salud intestinal como daño en la permeabilidad de la mucosa así como propiciar inflamación (Lam y col., 2012). En este estudio se puede observar como, conforme a la edad, este género aumentó su abundancia, sin embargo, bajo el tratamiento con lectina no hubo un incremento.

El género *Parabacteroides* se vio inducido por el tratamiento con lectina. Su presencia se asocia con salud intestinal así como los de *Lactobacillus* y *Ligilactobacillus* (Wang y col., 2019). En el caso de *Phascolarctobacterium*, género importante productor de propionato y acetato, su disminución se ha relacionado a algunas patologías como la cirrosis crónica propiciando con esto a su vez un aumento en los géneros *Prevotella* y *Faecalibacterium*, por lo que puede ser un indicador de disbiosis esta condición (Muriel, 2022). El género *Ruminococcus* juegan un papel importante como degradador de la pared celular de plantas en el colon y su disminución en abundancia ha sido asociado a enfermedades inflamatorias (Nagao-Kitamoto y Kamada, 2017). En este estudio se observó un incremento conforme a la edad, así como disminución en los animales tratados con lectina, lo que podría relacionarse al proceso inflamatorio provocado por la administración de la lectina y que ha sido observado también para la TBLF (Ferriz-Martínez y col., 2015; Pita-López y col., 2020).

El género *Solobacterium* es un grupo de organismos oportunistas que infectan en algunas ocasiones en infecciones por heridas quirúrgicas o bacteriemia (Alauzet y

col., 2021). Aunque el género *Streptococcus* es uno de los más comunes en el organismo, niveles altos en abundancia de este género se asocian a algunos padecimientos como aterosclerosis, metástasis de cáncer de hígado, sin haber síntomas de una aparente infección por lo que es posible tomar su aumento de diversidad como un marcador de mala salud intestinal (Sayols-Baixeras y col., 2023; Yang y col., 2023). Aunque se ha expuesto la correlación de algunos padecimientos con el género *Subdoligranulum* (entendiendo que correlación no necesariamente significa causalidad), la ausencia de este género usualmente se asocia a diabetes (Van Hul y col., 2020). *Treponema* es un género bacteriano cuya ausencia correlaciona fuertemente con daño en el intestino e inflamación, su presencia se considera como un factor benéfico así como la presencia de *Faecalibacterium* (Tanes y col., 2021). El género *Veillonella* está ligado fuertemente a procesos inflamatorios (Zhan y col., 2022). En este estudio se observó incremento durante el periodo de recuperación, lo que sugiere que se presentó proceso inflamatorio.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con rTBL-1 provoca el incremento de géneros relacionados con mala salud intestinal o proceso inflamatorio, tal es el caso de los géneros *Prevotella*, *Colidextribacter*, *Oscillibacter* y *Ruminococcus*. Por su parte, durante el periodo de recuperación incrementaron géneros con efectos benéficos sobre la salud intestinal como *Alloprevotella*, *Faecalibacterium* y *Treponema*; aunque también se identificó incremento de *Streptococcus*, el cual es indicador de mala salud intestinal. Lo anterior sugiere que el tratamiento con rTBL-1 provoca efectos adversos en el tubo digestivo, relacionados muy probablemente con su naturaleza antinutricia y la atrofia intestinal que se ha observado previamente con la TBLF (Pita-López y col., 2020). Sin embargo, el periodo de recuperación parece propiciar procesos compensatorios que revierten parcialmente los efectos adversos.

Son necesarios estudios más detallados, como la posibilidad de hacer inferencias metabólicas o detección de especies, y también es necesario incrementar el poder de cómputo y secuenciación que permita identificar a nivel de especie.

8 Conclusiones

El presente estudio identificó cambios significativos en la composición y estructuración de las comunidades bacterianas, tanto de manera natural por efecto de la edad, como de forma inducida por la administración de la rTBL-1. Se detectó la presencia de géneros bacterianos asociados a daño y mala salud intestinal durante la administración de la rTBL-1 y posterior recuperación de géneros benéficos tras seis semanas sin tratamiento. La presencia de géneros bacterianos asociados a daño se asocia también a los efectos adversos en el tejido intestinal principalmente atrofia. Lo anterior da cuenta de efectos negativos asociados con la administración de la rTBL-1 que es necesario tomar en cuenta para su aplicación farmacológica. Además, es relevante notar que el efecto, tanto atrófico como sobre el bacterioma, es reversible, lo que debe ser tomado en cuenta para definir el esquema de administración. Resulta importante continuar con el estudio de inferencia metabólica mediante técnicas bioinformáticas y analíticas para detectar presencia de posibles metabolitos que actúen como factores indicadores de mala salud intestinal. Las inferencias metabólicas pueden proporcionar más información sobre organismos podrían estar presentes y las relaciones entre las comunidades bacterianas, lo que permitiría profundizar en su seguridad farmacológica.

Entre las limitaciones del estudio se encuentra el poder de detección a nivel de especies ya que, aunque fue posible detectar géneros, no todas las bacterias del género necesariamente están asociadas a algún factor, ya sea benéfico o dañino. Otra limitación es que se dejan de lado las interacciones con otros microorganismos como levaduras, virus, fagos. Estas limitaciones están relacionadas con la capacidad tecnológica y económica del proyecto.

Por lo anterior, futuros estudios se concentrarán en profundizar sobre este campo de estudio, particularmente relacionado a los efectos adversos de la rTBL-1 y su potencial farmacológico.

9 Referencias Bibliográficas

- A.D.A.M American AccreditationHealthCare Commission. (2019). *Esquema del intestino grueso* [Electrónico]. <https://ssl.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=6&gid=19220&site=adeslas.adam.com&login=ADES1378>
- Ahmadjian, V., Paracer, S. (1988). *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*.
- Alauzet, C., Aujoulat, F., Lozniewski, A., Ben Brahim, S., Domenjod, C., Enault, C., Lavigne, J.-P., Marchandin, H. (2021). A New Look at the Genus *Solobacterium*: A Retrospective Analysis of Twenty-Seven Cases of Infection Involving *S. moorei* and a Review of Sequence Databases and the Literature. *Microorganisms*, 9(6), 1229. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061229>
- Amon, P., Sanderson, I. (2017). What is the microbiome? *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, 102(5), 257-260. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311643>
- Baltazar-Díaz, T. A., González-Hernández, L. A., Aldana-Ledesma, J. M., Peña-Rodríguez, M., Vega-Magaña, A. N., Zepeda-Morales, A. S. M., López-Roa, R. I., Del Toro-Arreola, S., Martínez-López, E., Salazar-Montes, A. M., Bueno-Topete, M. R. (2022). *Escherichia/Shigella*, SCFAs, and Metabolic Pathways—The Triad That Orchestrates Intestinal Dysbiosis in Patients with Decompensated Alcoholic Cirrhosis from Western Mexico. *Microorganisms*, 10(6), 1231. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061231>
- Barker, N., Ridgway, R. A., Van Es, J. H., Van De Wetering, M., Begthel, H., Van Den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A. R., Sansom, O. J., Clevers, H.

- (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, 457(7229), 608-611.
- Bauer, E., Thiele, I. (2018). From Network Analysis to Functional Metabolic Modeling of the Human Gut Microbiota. *mSystems*, 3(3), e00209-17, /msystems/3/3/msys.00209-17.atom.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00209-17>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P. (2018). *Numerical Ecology with R*. Springer.
- Bray, J. R., Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325-349.
<https://doi.org/10.2307/1942268>
- Brower, M., Grace, M., Kotz, C. M., Koya, V. (2015). Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Laboratory Animal Research*, 31(4), 166-173.
<https://doi.org/10.5625/lar.2015.31.4.166>
- Brunson, J., Read, Q. D. (2023). *ggalluvial: Alluvial Plots in «ggplot2»* (0.12.5) [R].
<http://corybrunson.github.io/ggalluvial/>
- Bucci, V., Xavier, J. B. (2014). Towards Predictive Models of the Human Gut Microbiome. *Journal of Molecular Biology*, 426(23), 3907-3916.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.017>

- Bukin, Yu. S., Galachyants, Yu. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6(1), 190007. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chaudhry SR, Peterson DC. (2019, abril 5). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482334/>
- Chowdhury, S., Fong, S. S. (2020). Computational Modeling of the Human Microbiome. *Microorganisms*, 8(2), 197. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020197>
- Clavel, T., Haller, D. (2007). Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: Implications for chronic inflammation. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 25-43.
- Cohen, L. J., Han, S. M., Lau, P., Guisado, D., Liang, Y., Nakashige, T. G., Ali, T., Chiang, D., Rahman, A., Brady, S. F. (2022). Unraveling function and diversity of bacterial lectins in the human microbiome. *Nature Communications*, 13(1), 3101. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29949-3>
- Čoklo, M., Maslov, D. R., Kraljević Pavelić, S. (s.f.). Modulation of gut microbiota in healthy rats after exposure to nutritional supplements. *Gut Microbes*, 12(1), 1779002. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1779002>

- Dempsey, E., Corr, S. C. (2022). Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 13, 840245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>
- Dena-Beltrán, J. L., Nava-Domínguez, P., Palmerín-Carreño, D., Martínez-Alarcón, D., Moreno-Celis, U., Valle-Pacheco, M., Castro-Guillén, J. L., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2023). EGFR and p38MAPK Contribute to the Apoptotic Effect of the Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) in Colon Cancer Cells. *Pharmaceuticals*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ph16020290>
- Devanga Ragupathi, N. K., Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Inbanathan, F. Y., Veeraraghavan, B. (2018). Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: Challenges and strategies. *New Microbes and New Infections*, 21, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.09.003>
- Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., Garcia, O. P., Garcia-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015>
- Fricke, A. M., Podlesny, D., Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of Advanced Research*, 19, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006>
- Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway—Its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews*, 198(1), 185-202. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0123.x>

- Ganz, T. (2000). Paneth cells—Guardians of the gut cell hatchery. *Nature Immunology*, 1(2), 99-100. <https://doi.org/10.1038/77884>
- García-Gasca, T., Andrade-Portillo, V. P. (2021). Protocolo de manejo de animales de experimentación para la realización de estudios in vivo y obtención de anticuerpos policlonales en la Facultad de Ciencias Naturales. *Facultad de Ciencias Naturales - UAQ*, 1-12.
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A. J., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J. L., Blanco-Labra, A. (2012). Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269-1278. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>
- Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Wilkinson, S. A., Callaway, L. K., McIntyre, H. D., Morrison, M., Dekker Nitert, M. (2018). Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes*, 9(3), 189-201. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1406584>
- Gómez-Merino, F. (2010). *Bioinformática: Aplicaciones en Genómica y Proteómica*.
- Gotelli, N. J., Colwell, R. K. (2001). Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4(4), 379-391. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00230.x>
- Henderson, G., Yilmaz, P., Kumar, S., Forster, R. J., Kelly, W. J., Leahy, S. C., Guan, L. L., Janssen, P. H. (2019). Improved taxonomic assignment of rumen bacterial 16S rRNA sequences using a revised SILVA taxonomic framework. *PeerJ*, 7, e6496. <https://doi.org/10.7717/peerj.6496>

- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Indo, Y., Kitahara, S., Tomokiyo, M., Araki, S., Islam, Md. A., Zhou, B., Albarracin, L., Miyazaki, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Nochi, T., Takenouchi, T., Uenishi, H., Aso, H., Takahashi, H., Kurata, S., Villena, J., Kitazawa, H. (2021). Ligilactobacillus salivarius Strains Isolated From the Porcine Gut Modulate Innate Immune Responses in Epithelial Cells and Improve Protection Against Intestinal Viral-Bacterial Superinfection. *Frontiers in Immunology*, 12, 652923. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.652923>
- Inoue, R., Ushida, K. (2003). Development of the intestinal microbiota in rats and its possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(2), 147-153. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00134-X)
- Jaccard, P. (1912). THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE.1. *New Phytologist*, 11(2), 37-50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>
- Janes, K. A., Lauffenburger, D. A. (2013). Models of signalling networks—what cell biologists can gain from them and give to them. *Journal of cell science*, 126(9), 1913-1921.
- Kang, G.-U., Park, S., Jung, Y., Jee, J. J., Kim, M.-S., Lee, S., Lee, D.-W., Shin, J.-H., Koh, H. (2022). Exploration of Potential Gut Microbiota-Derived Biomarkers to Predict the Success of Fecal Microbiota Transplantation in Ulcerative Colitis: A Prospective Cohort in Korea. *Gut and Liver*, 16(5), 775-785. <https://doi.org/10.5009/gnl210369>

- Kim, C. C., Lunken, G. R., Kelly, W. J., Patchett, M. L., Jordens, Z., Tannock, G. W., Sims, I. M., Bell, T. J., Hedderley, D., Henrissat, B., Rosendale, D. I. (2019). Genomic insights from *Monoglobus pectinilyticus*: A pectin-degrading specialist bacterium in the human colon. *The ISME Journal*, 13(6), 1437-1456. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0363-6>
- Kinross, J., Mirnezami, R., Alexander, J., Brown, R., Scott, A., Galea, D., Veselkov, K., Goldin, R., Darzi, A., Nicholson, J., Marchesi, J. R. (2017). A prospective analysis of mucosal microbiome-metabonome interactions in colorectal cancer using a combined MAS 1HNMR and metataxonomic strategy. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08150-3>
- Könönen, E., GURSOY, U. K. (2022). Oral *Prevotella* Species and Their Connection to Events of Clinical Relevance in Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Frontiers in Microbiology*, 12, 798763. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.798763>
- Kumar, M., Ji, B., Zengler, K., Nielsen, J. (2019). Modelling approaches for studying the microbiome. *Nature Microbiology*, 4(8), 1253-1267. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0491-9>
- La Vecchia, S., Sebastián, C. (2019). Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.018>
- Lam, Y. Y., Ha, C. W. Y., Campbell, C. R., Mitchell, A. J., Dinudom, A., Oscarsson, J., Cook, D. I., Hunt, N. H., Caterson, I. D., Holmes, A. J., Storlien, L. H. (2012). Increased Gut Permeability and Microbiota Change Associate with Mesenteric Fat Inflammation and Metabolic Dysfunction in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE*, 7(3), e34233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034233>

- Lamendella, R., Domingo, J. W. S., Ghosh, S., Martinson, J., Oerther, D. B. (2011). Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology*, 11, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-103>
- Lee, M., Chen, G. T., Puttock, E., Wang, K., Edwards, R. A., Waterman, M. L., Lowengrub, J. (2017). Mathematical modeling links Wnt signaling to emergent patterns of metabolism in colon cancer. *Molecular Systems Biology*, 13(2), 912. <https://doi.org/10.15252/msb.20167386>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2021). *Blautia*—A new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, 13(1), 1875796. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
- Lucke, K., Miehke, S., Jacobs, E., Schuppler, M. (2006). Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. In ulcerative colitis. *Journal of Medical Microbiology*, 55(5), 617-624. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46198-0>
- Marchesi, J. R., Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*, 3(1), 31, s40168-015-0094-0095. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Martín, R., Rios-Covian, D., Huillet, E., Auger, S., Khazaaal, S., Bermúdez-Humarán, L. G., Sokol, H., Chatel, J.-M., Langella, P. (2023). *Faecalibacterium*: A bacterial genus with promising human health applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(4), fuad039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad039>

- Martínez-Alarcón, D., Varrot, A., Fitches, E., Gatehouse, J. A., Cao, M., Pyati, P., Blanco-Labra, A., Garcia-Gasca, T. (2020). Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) with Specific Recognition for Cancer-Associated Glycans: Production, Structural Characterization, and Target Identification. *Biomolecules*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom10040654>
- Mazalovska, M., Kouokam, J. C. (2020). Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. *BioMed Research International*, 2020, 1631394. <https://doi.org/10.1155/2020/1631394>
- McLaren, M. R., Callahan, B. J. (2021). *Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2* [dataset]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4587955>
- McMurdie, P. J., Holmes, S. (2013). *phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data*. (1.42.0) [R]. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Micucci, H. A., Camps, E. (1987). Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 6.
- Moshiri, M., Hamid, F., Etemad, L. (2016). Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 4(2), 60-65.
- Muriel, P. (2022). Chapter 2—From inflammation to fibrosis. En P. Muriel (Ed.), *Hepatic Fibrosis* (pp. 25-53). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99764-5.00010-X>
- Moreno-Celis U, López-Martínez J, Blanco-Labra A, Cervantes-Jiménez R, Estrada-Martínez LA, García-Pascalín AE, Guerrero-Carrillo MJ, Rodríguez-

Méndez AJ, Mejía C, Ferríz-Martínez RA, García-Gasca T. 2017. *Phaseolus acutifolius* Lectin Fractions Exhibit Apoptotic Effects on Colon Cancer: Preclinical Studies Using Dimethylhydrazine or Azoxi-Methane as Cancer Induction Agents. *Molecules*. 22, 1670; doi:10.3390/molecules22101670. ISSN 1420-3049

Moreno-Celis U, López-Martínez FJ, Cervantes-Jiménez R, Ferríz-Martínez RA, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2020. Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Lectins Induce Apoptosis and Cell Arrest in G0/G1 by P53(Ser46) Phosphorylation in Colon Cancer Cells. *Molecules* 25 1021; doi:10.3390/molecules25051021. ISSN: 14203049 IF 3.06

Nagao-Kitamoto, H., Kamada, N. (2017). Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Network*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.1>

Nagpal, R., Wang, S., Solberg Woods, L. C., Seshie, O., Chung, S. T., Shively, C. A., Register, T. C., Craft, S., McClain, D. A., Yadav, H. (2018). Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2897. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02897>

Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>

NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (2002). Protección ambiental-Salud ambiental-Requisitos sanitarios que deben observarse en los establecimientos dedicados al manejo integral de residuos peligrosos. México: Secretaría de Salud.

- NOM-062-ZOO-1999. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial. 2001.
- Ocádiz, B. W. B. (2023). *Efecto de la administración oral aguda de lectina recombinante de frijol Tépari (rLTB-1) en ratones CD-1*. Tesis de Licenciatura en Nutrición. Universidad Autónoma de Querétaro. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4341>
- OCDE. (2008). OCDE/OECD 407 Guideline for testing of chemicals—Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. *Guidelines for the testing of chemicals*, 4, 13. <https://doi.org/10.1787/20745788>
- Palmerín-Carreño, D., Martínez-Alarcón, D., Dena-Beltrán, J. L., Vega-Rojas, L. J., Blanco-Labra, A., Escobedo-Reyes, A., García-Gasca, T. (2021). Optimization of a Recombinant Lectin Production in *Pichia pastoris* Using Crude Glycerol in a Fed-Batch System. *Processes*, 9(5), 876. <https://doi.org/10.3390/pr9050876>
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in Immunology*, 11, 906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
- Paterson, C., Clevers, H., Bozic, I. (2020). Mathematical model of colorectal cancer initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(34), 20681-20688. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003771117>
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131-144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)

- Pita-López, W., Gomez-Garay, M., Blanco-Labra, A., Aguilera-Barreyro, A., Reis-de Souza, T.C., Olvera-Ramírez, A., Ferriz-Martinez, R., García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction provokes reversible adverse effects on rats' digestive tract. *Toxicology Research*. 1-12 doi: 10.1093/toxres/tfaa062
- Posit Team. (2022). *RStudio: Integrated Development for R* [R]. Posit Software, PBC. <http://www.posit.co/>
- Pusztai, A. (1993). Dietary lectins are metabolic signals for the gut and modulate immune and hormone functions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47(10), 691-699.
- Qi, Y., Zang, S.-Q., Wei, J., Yu, H.-C., Yang, Z., Wu, H.-M., Kang, Y., Tao, H., Yang, M.-F., Jin, L., Zen, K., Wang, F.-Y. (2021). High-throughput sequencing provides insights into oral microbiota dysbiosis in association with inflammatory bowel disease. *Genomics*, 113(1 Pt 2), 664-676. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.063>
- R core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing* (4.0.3) [Windows]. <http://www.R-project.org/>
- Rastogi, S., Singh, A. (2022). Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1042189. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1042189>
- Reeve, A. (2013). Chapter 21—Big Data Integration. En A. Reeve (Ed.), *Managing Data in Motion* (pp. 141-156). Morgan Kaufmann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397167-8.00021-2>

- Rhodes, R. (2016). Ethical issues in microbiome research and medicine. *BMC Medicine*, 14(1), 156, s12916-016-0702-0707. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0702-7>
- Rios Ortiz, M. (2022). *Evaluación toxicológica de una lectina recombinante de frijol tépari (Phaseolus acutifolius) en ratas Sprague Dawley*. Tesis de Maestría en Nutrición Clínica Integral. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Sandvig, K., van Deurs, B. (2002). Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Letters*, 529(1), 49-53. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03182-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03182-4)
- Sayols-Baixeras, S., Dekkers, K. F., Baldanzi, G., Jönsson, D., Hammar, U., Lin, Y.-T., Ahmad, S., Nguyen, D., Varotsis, G., Pita, S., Nielsen, N., Eklund, A. C., Holm, J. B., Nielsen, H. B., Ericson, U., Brunkwall, L., Ottosson, F., Larsson, A., Ericson, D., ... Fall, T. (2023). *Streptococcus* Species Abundance in the Gut Is Linked to Subclinical Coronary Atherosclerosis in 8973 Participants From the SCAPIS Cohort. *Circulation*, 148(6), 459-472. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.123.063914>
- Sebastián Domingo, J. J., Sánchez Sánchez, C. (2017). From the intestinal flora to the microbiome. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110. <https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>
- Sebio, A., Kahn, M., Lenz, H.-J. (2014). The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(6), 611-615. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.906580>
- Sen, P., Orešič, M. (2019). Metabolic Modeling of Human Gut Microbiota on a Genome Scale: An Overview. *Metabolites*, 9(2), 22. <https://doi.org/10.3390/metabo9020022>

- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sharon, N. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>
- Silva, Y. P., Bernardi, A., Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00025>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), Article 4148. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Stern, J., Miller, G., Li, X., Saxena, D. (2019). Virome and bacteriome: Two sides of the same coin. *Current opinion in virology*, 37, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.05.007>
- Tanes, C., Walker, E. M., Slisarenko, N., Gerrets, G. L., Grasperge, B. F., Qin, X., Jazwinski, S. M., Bushman, F. D., Bittinger, K., Rout, N. (2021). Gut Microbiome Changes Associated with Epithelial Barrier Damage and Systemic Inflammation during Antiretroviral Therapy of Chronic SIV Infection. *Viruses*, 13(8), 1567. <https://doi.org/10.3390/v13081567>
- Ternes, D., Karta, J., Tsenkova, M., Wilmes, P., Haan, S., Letellier, E. (2020). Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism? *Trends in Microbiology*, 28(5), 401-423. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.001>

- Tian, T., Zhang, X., Luo, T., Wang, D., Sun, Y., Dai, J. (2021). Effects of Short-Term Dietary Fiber Intervention on Gut Microbiota in Young Healthy People. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, Volume 14*, 3507-3516. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S313385>
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>
- Tiedemann, F. (2022). *gghalves: Compose Half-Half Plots Using Your Favourite Geoms (0.1.4)* [R; Windows]. <https://CRAN.R-project.org/package=gghalves>
- Torres-Arteaga I, Castro-Guillén JL, Mendiola-Olaya E, García-Gasca T, Ángeles-Zaragoza MV, García-Santoyo V, Torres-Castillo JA, Aguirre C, Phinney B, Blanco-Labra A. 2016. Characterization of Two Non-fetuin-binding Lectins from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Seeds with Differential Cytotoxicity on Colon Cancer Cells. *Journal of Glycobiology*. 5:1 <http://dx.doi.org/10.4172/2168-958X.1000117>
- van den Brand, T. (2023). *ggh4x: Hacks for «ggplot2» (0.2.4)* [R]. <https://CRAN.R-project.org/package=ggh4x>
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- van den Brand, T. (2023). *ggh4x: Hacks for «ggplot2» (0.2.4)* [R]. <https://CRAN.R-project.org/package=ggh4x>
- Van Hul, M., Le Roy, T., Prifti, E., Dao, M. C., Paquot, A., Zucker, J.-D., Delzenne, N. M., Muccioli, G. G., Clément, K., Cani, P. D. (2020). From correlation to causality: The case of *Subdoligranulum*. *Gut Microbes*, 12(1), 1849998. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1849998>

- Van Muijlwijk, G. H., Van Mierlo, G., Jansen, P. W. T. C., Vermeulen, M., Bleumink-Pluym, N. M. C., Palm, N. W., Van Putten, J. P. M., De Zoete, M. R. (2021). Identification of *Allobaculum mucolyticum* as a novel human intestinal mucin degrader. *Gut Microbes*, 13(1), 1966278. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1966278>
- Villicaña Álvarez, S.F. (2023). *Ensayo de toxicidad subcrónica de una lectina recombinante de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) en ratones CD-1*. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Wang, J., Linnenbrink, M., Künzel, S., Fernandes, R., Nadeau, M.-J., Rosenstiel, P., Baines, J. F. (2014). Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26), E2703-E2710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402342111>
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S.-J., Liu, H. (2019). Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Reports*, 26(1), 222-235.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028>
- Wang, X., Liotta, L. (2011). Clinical bioinformatics: A new emerging science. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2043-9113-1-1>
- Watson, K. (2020). Understanding the microbiome: A primer on the role of the microbiome in colorectal neoplasia. *Annals of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.20524/aog.2020.0467>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. (3.4.0) [R]. <https://ggplot2.tidyverse.org>

- Wickham, H. (2023). *forcats: Tools for Working with Categorical Variables (Factors)* (1.0.0) [R]. <https://CRAN.R-project.org/package=forcats>
- Xavier, J. B., Young, V. B., Skufca, J., Ginty, F., Testerman, T., Pearson, A. T., Macklin, P., Mitchell, A., Shmulevich, I., Xie, L., Caporaso, J. G., Crandall, K. A., Simone, N. L., Godoy-Vitorino, F., Griffin, T. J., Whiteson, K. L., Gustafson, H. H., Slade, D. J., Schmidt, T. M., ... Wargo, J. A. (2020a). The Cancer Microbiome: Distinguishing Direct and Indirect Effects Requires a Systemic View. *Trends in Cancer*, 6(3), 192-204. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.004>
- Xu, S., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Dai, Z., Zhou, L., Feng, T., Chen, M., Wu, T., Hu, E., Yu, G. (2023). MicrobiotaProcess: A comprehensive R package for deep mining microbiome. *The Innovation*, 4(2), 100388. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>
- Yajima, M., Nakayama, M., Hatano, S., Yamazaki, K., Aoyama, Y., Yajima, T., Kuwata, T. (2001). Bacterial translocation in neonatal rats: The relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 33(5), 592-601. <https://doi.org/10.1097/00005176-200111000-00015>
- Yang, J., Ma, Y., Tan, Q., Zhou, B., Yu, D., Jin, M., Zhang, T., Liu, J., Liu, H. (2023). Gut Streptococcus is a microbial marker for the occurrence and liver metastasis of pancreatic cancer. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1184869. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1184869>
- Zafar, H., Saier, M. H. (2021). Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1848158. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>
- Zhan, Z., Liu, W., Pan, L., Bao, Y., Yan, Z., Hong, L. (2022). Overabundance of *Veillonella parvula* promotes intestinal inflammation by activating

macrophages via LPS-TLR4 pathway. *Cell Death Discovery*, 8(1), 251.
<https://doi.org/10.1038/s41420-022-01015-3>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhu, Z., Ma, X., Wu, J., Xiao, Z., Wu, W., Ding, S., Zheng, L., Liang, X., Luo, J., Ding, D., Zhao, Q. (2022). Altered Gut Microbiota and Its Clinical Relevance in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Shanghai Aging Study and Shanghai Memory Study. *Nutrients*, 14(19), 3959. <https://doi.org/10.3390/nu14193959>

Anexo 1. Resumen del filtrado de secuencias.

Tiempo	<i>input</i>	<i>filtered</i>	<i>denoised</i> <i>F</i>	<i>denoised</i> <i>R</i>	<i>merged</i>	<i>nonchi</i> <i>m</i>	%
0 días	53505	47578	46651	47015	36498	24917	46.57
	36167	30750	30220	30257	24490	19687	54.43
	39880	34566	33917	34173	27461	21110	52.93
	34148	27983	27293	27536	20187	16781	49.14
	37920	31261	30596	30938	24990	19390	51.13
	49185	43785	43142	43326	34967	27049	54.99
28 días	55340	48976	48105	48405	40389	33477	60.49
	55398	49347	48721	48900	38708	30381	54.84
	49456	43848	43039	43436	33673	26632	53.85
	48361	42954	42104	42428	34529	27240	56.33
	58746	52085	51243	51583	41975	32838	55.90
	51507	45930	45261	45500	38305	32082	62.29
	54482	48875	48237	48499	42230	34711	63.71
	42486	37842	37052	37373	30066	23399	55.07
	50083	44339	43483	43789	34561	26992	53.89
	52720	46900	46073	46294	36790	29829	56.58
	46492	41377	40618	40856	32013	27704	59.59
	64523	57209	56311	56593	47162	39369	61.02
53263	47323	46439	46668	36445	28812	54.09	
70 días	39760	34078	33460	33674	27674	24908	62.65
	39417	33849	33022	33351	26540	23443	59.47
	39022	33128	32479	32715	26439	22384	57.36
	54143	46094	45372	45679	34519	28712	53.03
	37377	32204	31591	31739	25075	21610	57.82
	37448	32112	31485	31688	26077	23118	61.73

	42353	35453	34644	34930	27005	24157	57.04
	40068	34874	34152	34377	25973	23417	58.44
	62127	52168	51473	51643	39411	35278	56.78
	55460	48379	47609	47765	37109	32230	58.11
	35973	31832	31272	31450	26067	23912	66.47
	34064	26545	25940	26164	16420	15066	44.23
	21699	19141	18648	18752	13728	12597	58.05
	30147	25300	24641	24917	19236	17625	58.46
	24478	21625	21069	21221	15852	14439	58.99
	35102	29422	28674	28969	22329	20407	58.14
	27128	24024	23411	23646	19371	17143	63.19
	37029	32682	31960	32251	25014	22885	61.80
	33245	27014	26360	26686	21738	19812	59.59
	36548	31320	30704	30793	24564	21674	59.30
	55564	49536	48731	49009	39069	34196	61.54
	41360	36022	35380	35606	27763	24543	59.34
	43615	36545	36016	36131	28999	24427	56.01
	28328	24105	23547	23745	19351	18027	63.64