



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA  
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

# **Análisis de Genes Candidatos de QTLs para la Composición de la Microbiota Intestinal del Cerdo**

Trabajo final de Master  
Valencia, junio del 2020

**Hernan Dario Laviano Medina**

Director:

**Dr. Josep Maria Folch Albareda**

Universidad de Autónoma de Barcelona

Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG)



El trabajo experimental del presente trabajo final de master fue realizado en los laboratorios del Grupo de Investigación de Genómica Animal del Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG)

**“Que salve la locura al mundo, porque la razón no ha sido capaz de hacerlo.”**

## **DEDICATORIA**

En honor a mi abuela Nubia  
A la memoria de mi abuelo Bernardo

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecerle a Anna Castello y a Betlem Cabrera por el apoyo logístico en el desarrollo de este trabajo de investigación. Gracias especialmente por sus clases intensivas de catalán. Por estar dispuestas siempre a resolverme cualquier duda o incluso, a conversar conmigo. Ustedes fueron más que un apoyo técnico en el laboratorio. porque me ayudaron a mejorar arduamente en mis interacciones sociales, y quizás esto fue el mejor resultado de mi estancia en el centro de investigación. Y eso, se los agradezco de corazón. – Le contare a mi abuela, que conocí dos grandes seres humanos como ustedes.

A mi director de trabajo final de master, Josep Maria Folch. por su confianza en el desarrollo de la investigación y el acompañamiento constante en la dirección de este trabajo de tal complejidad en el abordaje. Gracias por estar siempre pendiente, por su paciencia y por tener voluntad de responder cualquier duda, por más sencilla que fuera.

A Magi Passols por su buena voluntad y apoyo constante en el desarrollo de la parte experimental del trabajo. A Jesús Valdés por su gran amistad, sus sabios consejos, confianza y grandes y divertidas historias a la hora del café. Agradecer también a Lourdes Criado y a Yron Manaig. Y a todos los integrantes del grupo de investigación en genómica animal del CRAG.

A Paola Andrea Labrada, por apoyarme siempre y creer en mí. por convertirse en madre, amiga y hermana en los momentos que más lo necesitaba en este país. Espero sigas siendo luz en la vida de los demás.

Agradezco a Carlos Mirokys Then y Josué Olivares. Mis grandes amigos y compañeros de lucha. Gracias, por contar siempre con disponibilidad para acompañarme a los pruebas y exámenes clínicos en Valencia. Gracias por las agradables, filosóficas y extensas conversaciones sobre el porqué y la estructura del universo. Gracias, por que siempre me demostraron que podría contar con ustedes frente a los complejos momentos que pase durante la pandemia. Gracias por convertirse en esos amigos incondicionales. También quiero agradecer a Ramón Valenzuela por su grata y sincera amistad. A ustedes gracias por todo.

Al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, por la concesión de la beca para poder desarrollar estos estudios de master. Agradecer por su compromiso en la formación de talento humano de países en vía de desarrollo, como la mayoría del continente americano. A la Universidad Autónoma de Barcelona y la Universidad Politécnica de Valencia por sus gran y admirable planta de profesores.

Quiero agradecer especialmente a dos grandes maestros que marcaron mi paso por el master. Agustín Blasco, por recalcar la importancia de tener libertad de hacerse preguntas, el dudar de cualquier afirmación y hasta de corregir errores en la ciencia. y por su sabia filosofía de “estudiar 4 horas diaria”. A Noelia Ibañez-Escriche por su admirable vocación como docente, por esa mágica manera de transmitir tan efectivamente sus conocimientos e inspirar a sus alumnos. ustedes dos llevan consigo una llama, que espero sigan expandiendo en el sistema educativo como un incendio.

A mi abuelita Nubia, por ser mi compañera de luchas constantes. Por creer y apoyarme cuando nadie lo hacía. Gracias abuela porque has esculpido mi rostro con un millón de besos cariñosos, me has enseñado todas las cosas importantes de nuestro mundo, y mi lugar en él. Todo lo he aprendido de ti, mientras te escuchaba y te observaba. Abuela tú has compartido conmigo todos los valores que te hacen tan especial: la bondad, el perdón, la honestidad, la perseverancia, la consideración, y principalmente: La paciencia. Gracias por haberme colmado siempre de abrigo, de seguridad y de amor; por haberme dado todo lo que necesitaba para crecer y desarrollarme. Hoy comprendo cuántas cosas he logrado gracias a ti abuela, y quisiera tener más de una vida para devolverte todo lo que me has dado. Me has mostrado un mundo lleno de amor y maravillas, me enseñaste a encontrar mi propio camino, y me has hecho mucho más feliz, de lo que puedas imaginar. Sin más por que agradecerte, Abuela. Tu eres mi razón de ser, eres todas mis razones.

A mi abuelo Bernardo. Que, aunque ya partiste de este mundo. Darte gracias por alentarme a buscar la belleza dentro de mí y a mantenerme siempre en pie, gracias por asegurarme que podría crecer y alcanzar el éxito en cualquier cosa que me propusiera, si creía en mí, de la misma manera, en que tú lo hacías.

Para finalizar, agradecer a todo aquel que ha creído en mí, y me ha dado su apoyo. y así directa o indirectamente han contribuido en la consecución de cada logro y meta trazada en mi vida. Bien saben, que rendirme, es algo que no debo permitirme nunca.

## Resumen

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo y dinámico con un papel muy importante en el desarrollo del animal en las diferentes etapas en el ciclo productivo. Además, la interacción de estos microorganismos con los receptores en la mucosa gástrica influye en alto grado en la expresión génica del hospedador. Este proyecto parte de una investigación de Crespo-Piazuelo et al., (2019) donde se identificaron regiones genómicas asociadas con la composición de varios géneros bacterianos. Los genes candidatos del genoma porcino se seleccionaron por posición y función para cada género microbiano: *Streptococcus* (*UROS*), *Akkermansia* (*CHST12*), *Phascolarctobacterium* (*ST14*, *IKBKE*, *JAM3*), y *Prevotella* (*MAN2B2*). Se utilizó cDNA para el gen *UROS* Y DNA genómico para los genes *CHST12*, *MAN2B2*, *ST14*, *IKBKE* Y *JAM3* de un material animal Duroc x Ibérico, 16 animales extremos para la abundancia relativa de cada género microbiano (8 de la línea alta, 8 de la línea baja). Para identificar los polimorfismos genéticos ya anotados en estos genes se utilizó la aplicación BioMartTool de Ensembl Project ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) para cada gen y se hizo la correspondiente predicción del efecto de los SNPs. Se seleccionaron preferentemente SNPs de interés que determinaban un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Se diseñaron los primers para amplificar las regiones genómicas de interés por medio de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) mediante la aplicación Web Primer3Plus y se secuenciaron por el método Sanger. Las secuencias obtenidas se alinearon por medio del software SEQUENCHER 5.4.6 y se visualizaron y anotaron los SNPs en el genoma de los genes *UROS*, *IKBKE*, *ST14* y *JAM3*. El gen *UROS* presentó 16 polimorfismos para un solo individuo, sin arrojar información de importancia. Para los demás genes se encontraron 3 SNPs de interés. El primero se encuentra en el gen *JAM3*, común para siete de los ocho animales de la línea alta en abundancia del género bacteriano *Phascolarctobacterium*. Este polimorfismo no está anotado en Ensembl y determina cambio de aminoácido y se encuentra en la posición 9:60706769 bp, en el exón 5. El segundo SNP se localiza en el gen *ST14*, exón 16. Este se encuentra anotado en Ensembl (rs319985414, synonymous\_variant) y no determina un cambio de aminoácido. Es un polimorfismo presente en cuatro animales de la línea baja y cuatro animales de la línea alta para el género *Phascolarctobacterium*. El tercer SNP se localiza en el gen *IKBKE*, exón 8, determina un cambio de aminoácido en la proteína y se encuentra en tres animales de la línea baja y cinco de la línea alta para la abundancia del género *Phascolarctobacterium*. Este SNP se encuentra anotado en Ensembl (rs707345016, missense\_variant). Las variantes genéticas en estos genes podrían ser importantes en la modulación y control de la microbiota intestinal. Sin embargo, es necesario validar en un mayor número de animales la asociación entre la composición de la microbiota y los polimorfismos genéticos encontrados.

**Palabras clave:** microbioma, microbiota, metagenoma, polimorfismo, secuenciación, amplificación.

## Abstract

The gut microbiota is a complex and dynamic ecosystem with a very important role in the development of the animal at different stages in the production cycle. Furthermore, the interaction of these microorganisms with the receptors in the gastric mucosa greatly influences the gene expression of the host. This project starts from an investigation by Crespo-Piazuelo et al., (2019) where genomic regions associated with the composition of various bacterial genera were identified. Porcine genome candidate genes were selected by position and function for each microbial genus: *Streptococcus* (*UROS*), *Akkermansia* (*CHST12*), *Phascolarctobacterium* (*ST14*, *IKBKE*, *JAM3*), and *Prevotella* (*MAN2B2*). CDNA was used for the *UROS* gene and genomic DNA for the *CHST12*, *MAN2B2*, *ST14*, *IKBKE* and *JAM3* genes from a Duroc x Iberian animal material, 16 extreme animals for the relative abundance of each microbial genus (8 from the high line, 8 from the line down). To identify the genetic polymorphisms already noted in these genes, the BioMartTool application from Ensembl Project ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) was used for each gene and the corresponding prediction of the effect of the SNPs was made. SNPs of interest were preferably selected which determined a change in the amino acid sequence of the protein. Primers were designed to amplify the genomic regions of interest by means of the polymerase chain reaction (PCR) using the Primer3Plus Web application and were sequenced by the Sanger method. The sequences obtained were aligned by means of the SEQUENCHER 5.4.6 software and the SNPs in the genome of the *UROS*, *IKBKE*, *ST14* and *JAM3* genes were visualized and annotated. The *UROS* gene presented 16 polymorphisms for a single individual, without yielding important information. For the other genes, 3 SNPs of interest were found. The first is found in the *JAM3* gene, common to seven of the eight abundant high-line animals of the bacterial genus *Phascolarctobacterium*. This polymorphism is not annotated in Ensembl and determines amino acid change and is found at position 9: 60706769 bp, in exon 5. The second SNP is located in the *ST14* gene, exon 16. This is annotated in Ensembl (rs319985414, synonymous\_variant ) and does not determine an amino acid change. It is a polymorphism present in four low line animals and four high line animals for the genus *Phascolarctobacterium*. The third SNP is located in the *IKBKE* gene, exon 8, determines an amino acid change in the protein and is found in three animals from the low line and five from the high line for the abundance of the *Phascolarctobacterium* genus. This SNP is annotated in Ensembl (rs707345016, missense\_variant). The genetic variants in these genes could be important in the modulation and control of the intestinal microbiota. However, it is necessary to validate in a larger number of animals the association between the composition of the microbiota and the genetic polymorphisms found.

**Key words:** microbiome, microbiota, metagenome, polymorphism, sequencing, amplification.

## Resum

La microbiota intestinal és un ecosistema complex i dinàmic amb un paper molt important en el desenvolupament de l'animal en les diferents etapes en el cicle productiu. A més, la interacció d'aquests microorganismes amb els receptors en la mucosa gàstrica influeix en la expressió gènica de l'hoste. Aquest projecte parteix d'una investigació de Crespo-Piazuelo et al., (2019) on es van identificar regions genòmiques associades amb la composició de diversos gèneres bacterians. Els gens candidats del genoma porcí es van seleccionar per posició i funció per a cada gènere microbià: *Streptococcus* (*UROS*), *Akkermansia* (*CHST12*), *Phascolarctobacterium* (*ST14*, *IKBKE*, *JAM3*), i *Prevotella* (*MAN2B2*). Es va utilitzar cDNA per al gen *UROS* i DNA genòmic per als gens *CHST12*, *MAN2B2*, *ST14*, *IKBKE* i *JAM3* d'un material animal Duroc x Ibèric, 16 animals extrems per a l'abundància relativa de cada gènere microbià (8 de la línia alta, 8 de la línia baixa). Per a identificar els polimorfismes genètics ja anotats en aquests gens es va utilitzar l'aplicació BioMartTool de Ensembl Project ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) per a cada gen i es va fer la corresponent predicció de l'efecte dels SNPs. Es van seleccionar preferentment SNPs d'interès que determinaven un canvi en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna. Es van dissenyar els primers per a amplificar les regions genòmiques d'interès per mitjà de la reacció de la cadena de la polimerasa (PCR) mitjançant l'aplicació Web Primer3Plus i es van seqüenciar pel mètode Sanger. Les seqüències obtingudes es van alinear per mitjà del programari SEQUENCHER 5.4.6 i es van visualitzar i van anotar els SNPs en el genoma dels gens *UROS*, *IKBKE*, *ST14* i *JAM3*. El gen *UROS* presenta 16 polimorfismes per a un sol individu, sense llançar informació d'importància. Per als altres gens es van trobar 3 SNPs d'interès. El primer es troba en el gen *JAM3*, comú per a set dels huit animals de la línia alta en abundància del gènere bacterià *Phascolarctobacterium*. Aquest polimorfisme no està anotat en Ensembl i determina canvi d'aminoàcid i es troba en la posició 9:60706769 bp, en l'exó 5. El segon SNP es localitza en el gen *ST14*, exó 16. Aquest es troba anotat en Ensembl (rs319985414, synonymous\_variant) i no determina un canvi d'aminoàcid. És un polimorfisme present en quatre animals de la línia baixa i quatre animals de la línia alta per al gènere *Phascolarctobacterium*. El tercer SNP es localitza en el gen *IKBKE*, exó 8, determina un canvi d'aminoàcid en la proteïna i es troba en tres animals de la línia baixa i cinc de la línia alta per a l'abundància del gènere *Phascolarctobacterium*. Aquest SNP es troba anotat en Ensembl (rs707345016, missense\_variant). Les variants genètiques en aquests gens podrien ser importants en la modulació i control de la microbiota intestinal. No obstant això, és necessari validar en un major nombre d'animals l'associació entre la composició de la microbiota i els polimorfismes genètics oposats.

**Paraules clau:** microbioma, microbiota, metagenoma, polimorfisme, seqüenciació, amplificació.

## TABLA DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION.....  | 1  |
| 1.1. Aspectos generales .....   | 1  |
| 1.2. Desarrollo de la microbiota en el tracto gastrointestinal.....                   | 4  |
| 1.3. Seguimiento y control de una óptima microbiota Intestinal .....                  | 6  |
| 1.3.1. Prebióticos .....  | 7  |
| 1.3.2. <i>Probióticos</i> .....   | 7  |
| 1.3.3. Consideraciones de los prebióticos y probióticos. ....                         | 8  |
| 1.4. La Investigación del microbioma .....  | 8  |
| 1.4.1. Nutrición y salud .....  | 12 |
| 1.4.2. Relación del genoma del huésped con la composición de la microbiota ....       | 12 |
| 2. OBJETIVOS .....  | 16 |
| 2.1. Objetivo General.....  | 16 |
| 2.2. Objetivos Específicos .....  | 16 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 17 |
| 3.1. Lugar de realización del estudio .....   | 17 |
| 3.2. Materiales.....  | 17 |
| 3.2.1. Material animal. ....  | 17 |
| 3.3. Métodos utilizados .....   | 17 |
| 3.3.1. Selección de genes candidatos .....  | 17 |
| 3.3.2. Comparación de la anotación de los genes candidatos entre el cerdo y el hombre | 18 |
| 3.3.3. Identificación de polimorfismos anotados en Ensembl.....                       | 19 |
| 3.3.4. Diseño de <i>primers</i> .....   | 21 |
| 3.3.5. Selección de animales extremos para cada género bacteriano .....               | 23 |
| 3.3.6. Extracción de RNA .....  | 24 |
| 3.3.7. Obtención de cDNA partir de RNA.....   | 25 |
| 3.3.8. Cuantificación del DNA y RNA.....  | 26 |
| 3.3.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....                                | 27 |
| 3.3.10. Electroforesis.....   | 28 |
| 3.3.11. Reacción de purificación del DNA producto de PCR.....                         | 29 |
| 3.3.12. Reacción de secuenciación sanger .....  | 30 |
| 3.3.13. Alineamiento de secuencias y anotación de SNPs .....                          | 31 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 33 |
| 5. CONCLUSIONES.....  | 42 |
| 4. RECOMENDACIONES.....   | 43 |
| 5. BIBLIOGRAFIA.....  | 44 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Transcritos seleccionados de los genes candidatos .....   | 18 |
| <b>Tabla 2.</b> Identificación de SNPs de interés para cada gen candidato, con su ubicación, efecto y consecuencia de la variante ..... | 20 |
| <b>Tabla 3.</b> <i>Primers elaborados para amplificar en la PCR</i> .....   | 23 |
| <b>Tabla 4.</b> Animales extremos seleccionados. ....   | 24 |
| <b>Tabla 5.</b> Componentes de la reacción de retrotranscripción .....  | 25 |
| <b>Tabla 6.</b> Valores indicativos de pureza en muestras de DNA: .....   | 26 |
| <b>Tabla 7.</b> Valores indicativos de pureza en muestras de RNA: .....   | 26 |
| <b>Tabla 8.</b> Principales componentes de la PCR y su concentración de almacenamiento. ....  | 28 |
| <b>Tabla 9.</b> Cantidades de cada componente en una reacción de PCR.....   | 28 |
| <b>Tabla 10.</b> Componentes de la reacción ExoSAP .....  | 29 |
| <b>Tabla 11.</b> componentes de la reacción de secuenciación mediante el kit BigDye™ Terminador v3.1 .....                              | 30 |
| <b>Tabla 12.</b> Primers de secuenciación .....   | 30 |
| <b>Tabla 13.</b> Estructura del ciclo térmico de la reacción de secuenciación .....   | 31 |
| <b>Tabla 14.</b> <i>Genes candidatos Seleccionados por genero bacteriano asociado.</i>  | 33 |
| <b>Tabla 15.</b> <i>Polimorfismos de los genes candidatos de estudio.</i> .....   | 34 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> El complejo de las “OMICAS” .....   | 11 |
| <b>Figura 2.</b> Alineamiento de secuencias.....   | 18 |
| <b>Figura 3.</b> Visualización de RepeatMasker .....   | 19 |
| <b>Figura 4.</b> Visualización de Cpgplot .....  | 19 |
| <b>Figura 5.</b> Ajuste de parámetros para el diseño de Primers con Primer3Plus. .                       | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Diseño de Primers con Primer3Plus.....  | 21 |
| <b>Figura 7.</b> Visualización del Primer-BLAST .....  | 22 |
| <b>Figura 8.</b> Valores de Homo y Hetero - Dímeros.....   | 22 |
| <b>Figura 9.</b> Valor de Hairpin.....   | 22 |
| <b>Figura 10.</b> Perfil térmico típico de una PCR.....  | 27 |
| <b>Figura 11.</b> Ensamblaje de secuencias.....  | 31 |
| <b>Figura 12.</b> Visualización de los electroferogramas de las secuencias y ubicación de los SNPs. .... | 32 |
| <b>Figura 13.</b> Ubicación de los SNPs en el genoma del cerdo.....                                      | 32 |



# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Aspectos generales

La producción de carne de cerdo ha ido al alza a través de los años, según datos del sacrificio de animales, siendo Cataluña el líder en producción de carne porcina, avícola y vacuna en España. En el año 2018, España sacrificó 52,4 millones de animales y produjo unos 4,52 millones de toneladas de carne de cerdo, ubicando a España en el cuarto puesto de la producción mundial, por debajo de China, Estados Unidos y Alemania. Además, en el 2018, la producción creció con respecto a años anteriores en un 5% (MAPA, 2019).

Con respecto a Europa, España ocupa el segundo lugar (19%) de la producción de carne de cerdo, por debajo de Alemania que lidera con un 22,4% la producción de carne de cerdo en la Unión Europea (UE) (IRTA, 2010). Esta producción de carne ha crecido en los últimos 5 años en Europa un 7.6% y en España un 31,45%, mostrando el importante crecimiento del sector a nivel nacional versus al comunitario europeo (MAPA, 2019).

En la actualidad el mercado de la carne de cerdo demanda productos de calidad que reúnan una serie de características (Muñoz et al., 2013). La calidad de la carne es un carácter complejo, pues el mercado exige un alto contenido de canales magras y una carne de calidad satisfactoria con el mejor rendimiento posible (Pérez-Enciso et al., 2000; Puig-Oliveras et al., 2016). La calidad está determinada por factores productivos como la sanidad, la nutrición y los programas de mejora genética, que están enfocados principalmente en la selección de animales con menor espesor de grasa subcutánea y niveles óptimos de infiltración de grasa intramuscular (González, Carrapiso, Noguera, Ibáñez-Escriche, & Tejeda, 2018; Puig-Oliveras et al., 2014; Tejeda, Carrapiso, Noguera, Ibáñez-Escriche, & González, 2018; Hua Yang et al., 2018).

El tracto gastrointestinal (TGI) se ve involucrado en múltiples procesos fisiológicos (Hussey & Bergman, 2014), que no se limitan a la digestión de nutrientes, absorción, y su metabolismo, sino también al desarrollo del sistema inmunitario, su fortalecimiento y la protección contra patógenos (Siegwald & Brüßow, 2019). El contenido del TGI de los animales ha evolucionado con microorganismos simbióticos, en su mayoría bacterias que se han adaptado para vivir plenamente en este ambiente formando interacciones complejas y vitales entre la relación microorganismos-huésped (Estellé & Mach, 2014; Hua Yang et al., 2018).

El microbioma es definido como el conjunto de microorganismos, sus genomas y el ambiente donde residen. La microbiota se refiere al conjunto de microorganismos existentes en un ambiente determinado, como por ejemplo el

tracto gastrointestinal (Ashman & Krishnamurthy, 2019). El metagenoma es el conjunto de genes microbianos presentes en un entorno o ecosistema determinado. Por ende la metagenómica es el estudio de los genomas de una comunidad de microorganismos (Segre, 2020).

La microbiota intestinal puede ser comensal, patogénica o mutualista (Aluthge et al., 2019; Chen et al., 2018; ; Suárez, Fandiño, & Rondón, 2018). La microbiota mutualista da al huésped funciones beneficiosas que él huésped no puede realizar por cuenta propia, como digerir fibra, obtener energía y polisacáridos complejos, y así producir compuestos metabólicos necesarios, y también evitar la colonización de microorganismos patógenos. Asimismo, las poblaciones microbianas comensales modulan la respuesta inmune del huésped, modificando la diversidad de la microbiota para mantener una homeostasis intestinal (Aluthge et al., 2019; Crespo-Piazuelo et al., 2018; Han et al., 2018). En el caso de bacterias patógenas, estas causan diarrea, enterolitos, daño hepático, carcinogenesis y putrefacción intestinal (Bäckhed, Ley, Sonnenburg, Peterson, & Gordon, 2005). Generalmente, estas bacterias se han adaptado para prosperar y habitar bajo ciertas condiciones formando interacciones complejas y vitales entre ellas y su huésped (Chen et al., 2018; Goodrich, Davenport, Waters, Clark, & Ley, 2016).

La microbiota intestinal, en su interacción funcional y metabólica con el epitelio intestinal, estimulan el sistema inmune del huésped. Haciendo así una selección específica de la microbiota intestinal específica usando proteínas microbicidas de producción de cascadas inmunitarias. El huésped tiene la característica de tolerar esta población microbiana no patógena (Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson, & Knight, 2012). Estos en relación a que los Microorganismos mutualistas son los únicos que activan las cascadas inmunitarias del huésped para su propio beneficio (Bäckhed et al., 2005).

El epitelio intestinal actúa como una barrera, protegiendo al organismo ante la entrada bacteriana, actuando como un sistema de defensa, la superficie epitelial intestinal está recubierta con una capa mucosa formada por glucoproteínas de mucina (Ohland & MacNaughton, 2010). El intestino delgado tiene solo una capa, que es permeable a las bacterias intestinales. Por el contrario, la capa mucosa del colon está estructurada en dos partes: una capa interna densa firmemente unida al epitelio intestinal que minimiza las células bacterianas-epiteliales que están en contacto y una capa externa suelta que puede ser descompuesta por bacterias comensales. En esta capa mucosa externa, y mediante la interacción con las bacterias, se producen una serie de metabolitos que interactúan con el huésped, estimulando una respuesta del sistema inmune innato y adaptativo (Sun, Zhou, Fang, Su, & Zhu, 2015).

La microbiota gastrointestinal es un ecosistema complejo y dinámico con un papel muy importante en el desarrollo del animal en las diferentes etapas del ciclo productivo (Suárez et al., 2018). La composición de la microbiota y la

complejidad de las interacciones microbianas dependen de la genética del huésped y otros factores como la edad, la dieta, el medio ambiente, el estado de salud o el efecto materno (Mach et al., 2015).

Se ha descubierto que en ratones la microbiota intestinal puede modificar el metabolismo de los lípidos (Bäckhed et al., 2005). Además, la interacción de estos microorganismos con los receptores en la mucosa gástrica influyen en alto grado en la expresión génica del hospedador, genes relacionado con el metabolismo, composición lipídica de la carne del animal y rendimiento productivo (Aluthge et al., 2019; Crespo-Piazuelo et al., 2018, 2019; Hua Yang et al., 2018).

Se ha reportado que la heredabilidad de la composición de géneros microbianos en el intestino del cerdo varía, de una heredabilidad alta a una heredabilidad baja (Camarinha-Silva et al., 2017; Estellé & Mach, 2014; Ramayo-caldas et al., 2020). La genética del huésped se ha sugerido como un factor importante en la determinación de la composición de la microbiota intestinal (Turpin et al., 2016). Sin embargo, existen estudios limitados que miden la contribución de la variabilidad interindividual, modulando las comunidades bacterianas y el efecto de los polimorfismos del huésped en el establecimiento de microbiota (Goodrich, Davenport, Clark, & Ley, 2017).

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS), se han utilizado ampliamente con la finalidad de para estudiar el vínculo entre el huésped y su composición de microbiota intestinal (Bonder et al., 2016; Crespo-Piazuelo et al., 2019; Goodrich et al., 2017; Ramayo-caldas et al., 2020; Turpin et al., 2016). En humanos la genética del huésped parece tener un impacto menor en la microbiota en comparación con la edad, la dieta o el medio ambiente (Schokker et al., 2014; Spor, Koren, & Ley, 2011; Valeriano, Parungao-Balolong, & Kang, 2014). Estos resultados se pueden explicar porque en estos estudios es casi imposible estandarizar las condiciones entre individuos (Kubasova et al., 2018., Huttenhower et al., 2012; Spor et al., 2011; X. Wang et al., 2020).

En este sentido, los cerdos de producción representan un modelo perfecto para medir el efecto de la genética del huésped en la conformación de la microbiota, debido a su dieta similar y factores ambientales durante todo su ciclo de cría, pero la relación entre el genoma del cerdo y la composición de la microbiota intestinal aún no se han descrito completamente (Estellé & Mach, 2014; Estellé et al., 2017).

La microbiota colabora directamente con la maduración de TGI, así mismo podemos decir que el desarrollo o subdesarrollo de TGI en conjunción con la microbiota puede conllevar a numerosas enfermedades y trastornos agudos o crónicos (Aluthge et al., 2019; Serrano, Cembrero, Gomez, & Leinez, 2007; Suárez et al., 2018). Por lo tanto es de vital importancia el conocimiento de las interacciones del TGI y la microbiota con la utilización de suplementos

alimenticios para avanzar a nivel nutricional en las especies de interés ganadero, aumentando su resistencia a enfermedades y el rendimiento productivo (Hua Yang et al., 2018).

El conocimiento más a fondo del papel y la función de la microbiota nos permitirá aumentar el conocimiento de la relación de la microbiota con enfermedades humanas, que pueden ser de aplicación terapéutica en estas patologías (Chen et al., 2018; Corominas et al., 2013). El estudio del metagenoma y La importancia ha ido en avance en las últimas décadas debido a la secuenciación de los genomas microbianos y el estudio de las “ómicas” como metabolómica, proteómica y transcriptómica (Aluthge et al., 2019 Puig-Oliveras et al., 2014).

## 1.2. Desarrollo de la microbiota en el tracto gastrointestinal

En etapas tempranas de vida del lechón, la microbiota es transmitida al neonato por vía maternal-lactogena y ambiental, siendo así la microbiota un instrumento de importancia para el desarrollo fisiológico, inmunológico del animal, y la maduración intestinal. Las bacterias de la microbiota del lechón son inicialmente microorganismos son inicialmente Aerobios Facultativos, que son principalmente la *Escherichia coli*, *Shigella flexnerii* y *Streptococcus spp.* (Fouhse, Zijlstra, & Willing, 2016; Konstantinov et al., 2006). Estos organismos consumen el oxígeno disponible del ambiente intestinal, creando así un ambiente propicio para el crecimiento de anaerobios como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, y *Lactobacillus spp.* (Fouhse et al., 2016; Konstantinov et al., 2006; Petri, Hill, & Van Kessel, 2010).

Petri et al., (2010) indican que los miembros de las familias *Clostridiaceae* y *Enterobacteriaceae* son los principales colonizadores desde el inicio hasta aproximadamente 0,5 días después del parto. Posteriormente, son desplazados por miembros de la familia *Streptococcaceae*, que son la familia dominante entre el primer y tercer día, hasta que son reemplazados por miembros de la familia *Lactobacillaceae*, que es dominante hasta los 20 días de edad. Este patrón de sucesión fue observado en todo el TGI (estómago, intestino delgado y colon).

Hinkle, (2012) estudio el desarrollo de la microbiota intestinal de los cerdos desde el nacimiento hasta el final del período crecimiento (periodos de lactancia, destete y guardería), donde se observó cambios en la abundancia en el filo *Firmicutes* con la edad de los cerdos, aunque *Firmicutes* denota predominancia en todas las edades. Se ha demostrado que *Firmicutes*, junto con *Bacteroidetes*, son los dos principales filos bacterianos del intestino porcino independientemente de la edad de los animales (Mach et al., 2015).

La abundancia de *Firmicutes* es muy variable en función de la edad. En el periodo de lactancia se reporta una abundancia del 71,2% y del 62,3% en los

días 7 y 14, respectivamente. Esta abundancia va en aumento después del destete, siendo del 87,0% y del 87,3% en los días 26 y 61, respectivamente. Entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* tiende a producirse una relación inversa, observándose en *Bacteroidetes* las mayores abundancias para lechones destetados (16,9% y 26,4% en los días 7 y 14, respectivamente), mientras que los lechones después al destete obtuvieron abundancias más bajas (3,6% y 7,8% en los días 26 y 61, respectivamente). El género *Bacteroides* es dominante en el periodo de lactancia, mientras hay un aumento del género *Prevotella* el día 61, debido posiblemente a la ingesta de dietas altas en proteína y fibra de origen vegetal. También se ha reportado que estos cambios pueden ser determinados por el cambio de una dieta líquida (leche materna) a una dieta con mayor porcentaje de materia seca y contenido de fibra (Hinkle, 2012).

Durante el destete, las familias bacterianas dominantes parecen ser *Bacteroidaceae* y *Veillonellaceae*. Sin embargo, el día 26, después del destete, predomina la familia *Lactobacillaceae* (31,4%) con *Lactobacillus amylovorus* identificado como la especie predominante dentro de este grupo. Otras familias bacterianas con alta representación después del destete son *Lachnospiraceae* (13,4%), *Ruminococcaceae* (13,2%) y *Enterococcaceae* (2,7%). Al final del período de crecimiento (día 61), hay un cambio de dietas con la eliminación de proteínas de origen animal y la sustitución de más proteínas de origen vegetal. Este cambio de proteína deriva a un cambio en la familia *Streptococcaceae* (28,8%), siendo el dominante en la microflora, mientras que para *Lactobacillaceae* (9,8%), *Lachnospiraceae* (8,8%), *Ruminococcaceae* (8,6%), *Clostridiaceae* (5,6%), *Veillonellaceae* (4,9%) y *Erysipelotrichaceae* (3,5%) se observaron concentraciones mucho más bajas. Entre los miembros de *Streptococcaceae*, el más significativo aumento se observó en el género *Streptococcus*, particularmente en la especie *Streptococcus alactolyticus* (Leser et al., 2002). Con respecto a la cantidad del género *Bifidobacterium* hubo un aumento en el día 26 que podría deberse a la presencia de lactosa resultante de la incorporación de proteínas de suero en dietas utilizadas al inicio del período de destete, sin embargo, este aumento no se observó en el día 61 (Hinkle, 2012).

De Rodas, Youmans, Danzeisen, Tran, & Johnson, (2018). estudiaron el microbioma de los cerdos con respecto a las unidades taxonómicas operáticas (OTU) y en relación a etapa productiva, tiempo de muestreo y los diferentes lugares de muestreo y observaron que entre las OTU más abundantes, las especies de *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. johnsonii* / *gasseri*, *L. reuteri* y *L. mucosae*) y las de la clase *Clostridia* (por ejemplo, *Clostridium*) fueron prominentes en todo el TGI y por edad. Esto les llevó a la conclusión de que existe una comunidad bacteriana dominante en todo el TGI, independientemente de la edad y ubicación del muestreo.

El progresivo cambio de la microbiota que se desarrolla en el cerdo también depende de los tipos de exposición y de las prácticas de manejo, como el uso

temprano de antibióticos (Ashman & Krishnamurthy, 2019; Chen et al., 2018). Schmidt et al., (2011) estudiaron el impacto de la higiene excesiva en el desarrollo de la microbiota porcina al criar cerdos en sitios de alta higiene después de que inicialmente se les hubiera permitido colonizar naturalmente por microorganismos en sistemas de cría convencionales. La cría de los animales en sistemas de alta higiene interrumpe la evolución progresiva en el tiempo de la flora microbiana por la falta de exposición a ambientes en sistemas de producciones comunes, en comparación a los eventos homeostáticos cambiantes de la microbiota que se sabe que ocurren en animales criados convencionalmente. Por tanto, el establecimiento y desarrollo temprano normal de la microbiota de cerdo requiere una exposición microbiana continua y las condiciones de higiene excesiva interfieren con este proceso natural (Schmidt et al., 2011).

Se ha analizado el impacto de la exposición temprana a los antibióticos, así como las prácticas de manejo estresantes en la comunidad Microbiana intestinal y en los perfiles del transcriptoma intestinal. Se ha observado que el uso de antibióticos a temprana edad altera la composición y diversidad de la microbiota intestinal y reduce la expresión de genes relacionados con una serie de procesos inmunes (Schokker et al., 2014).

Dou et al., (2017) investigaron el impacto de la microbiota intestinal de los primeros años de vida en la susceptibilidad de los cerdos a la diarrea posterior al destete. Los resultados revelaron que ya en el día 7 postnatal, la diversidad y composición de la microbiota fecal discriminaba entre los cerdos que se mantenían sanos y los que desarrollaban diarrea después del destete. Los cerdos sanos tuvieron mayor abundancia de miembros de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Prevotellaceae* y menor abundancia de las familias *Fusobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*, en comparación con los cerdos que desarrollaron diarrea. Por lo tanto, la microbiota temprana del cerdo puede tener un impacto en la salud y la enfermedad más adelante en la vida y potencialmente puede usarse como un bio-marcador para la susceptibilidad a la enfermedad (Ashman & Krishnamurthy, 2019; Ishiguro, Haskey, & Campbell, 2018; Neuman & Koren, 2016).

### **1.3. Seguimiento y control de una óptima microbiota Intestinal**

En los últimos años, se ha trabajado intensamente en el estudio de los prebióticos y probióticos para así mejorar la comunidad microbiana del TGI, porque una microbiota intestinal equilibrada es beneficiosa para la estructura intestinal y la función productiva e inmunológica del huésped (Bikker et al., 2006; K. F. Cao et al., 2016; F Molist, Segura, Gasa, Hermes, & Manzanilla, 2009). La comunidad científica ha alertado sobre su relación con las bacterias resistentes

a los antibióticos (Ishiguro et al., 2018; Jaramillo, 2012; Neuman & Koren, 2016; Schokker et al., 2014). Los prebióticos, probióticos y Simbióticos representan alternativas potenciales a los antibióticos promotores de crecimiento que pueden mantener o mejorar la productividad y la salud animal (Aluthge et al., 2019; Francesc Molist, Manzanilla, Pérez, & Nyachoti, 2012; Hua Yang et al., 2018).

### **1.3.1. Prebióticos**

Los prebióticos han sido definidos como alimentos funcionales (Aluthge et al., 2019; Fohse et al., 2016; Siegwald & Brüssow, 2019), es un ingrediente selectivo fermentado que permite cambios específicos, tanto en la composición como en la actividad del TGI y su microbiota que confiere beneficios en el bienestar y la salud del animal (Jaramillo, 2012). Durante las dos últimas décadas el almidón resistente, polisacáridos sin almidón, azúcares no absorbibles y los oligosacáridos han sido utilizados como fuentes prebióticas (Gaggìa, Mattarelli, & Biavati, 2010).

Los Fructo-Oligosacáridos, Galacto-Oligosacáridos (GOS) y Manano-Oligosacáridos (MOS) han demostrado tener efectos beneficiosos sobre la microbiota intestinal y el desempeño productivo y salud de los cerdos (McDonnell, Bouwhuis, Sweeney, Shea, & Doherty, 2016; Schokker et al., 2014; Hua Yang et al., 2018; L. Zhao et al., 2012; P. Y. Zhao, Wang, & Kim, 2013). El almidón resistente ha sido estudiado, y es catalogado como un potencial prebiótico. Sin embargo, en la actualidad no está claro como este promueve la proliferación de ciertas bacterias benéficas y como mejora el rendimiento del animal (Heo, Agyekum, Yin, Rideout, & Nyachoti, 2014; Sun, Su, & Zhu, 2016; Sun et al., 2015). Por otro lado, los polisacáridos derivados de extractos de algas marinas (EAM) como laminarina y fucoidan han mostrado resultados muy positivos en cerdos expuestos previamente a bacterias patógenas (McDonnell et al., 2016).

### **1.3.2. Probióticos**

Los probióticos se definen como microbios no patógenos que pueden colonizar el intestino, otorgando al cerdo o al humano múltiples beneficios (Aluthge et al., 2019; Angelakis, 2017; Ohland & MacNaughton, 2010), los Probióticos promueven directamente la función de barrera intestinal y se comunican con el sistema inmunitario del huésped a través de metabolitos bacterianos (De Vrese & Schrezenmeir, 2016). En cerdos, se han desarrollado especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecium* y *E. coli* como probióticos para promover la inmunidad de la mucosa y la función epitelial e inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (Klingspor et al., 2013; Lähteinen et al.,

2010). Sin embargo, los efectos probióticos dependen de las bacterias específicas aisladas, ya que algunos trabajos no sustentan estos beneficios, mientras que otros muestran una respuesta inmune óptima y eficiente y una mejor morfología intestinal al alimentar cerdos con el probiótico *Bacillus cereus* (Scharek-Tedin et al., 2013).

### **1.3.3. Consideraciones de los prebióticos y probióticos.**

Los efectos de los Prebióticos en las estimaciones de digestibilidad y el rendimiento del crecimiento han sido inconsistentes, especialmente en cerdos sanos, ya que otros componentes específicos de las dietas pueden haber contribuido y enmascarado el efecto de los compuestos Prebióticos. Lo contrario ocurre en el uso de Probióticos, debido a que la comunicación es directa entre el microorganismo y la pared intestinal del animal (Gaggia et al., 2010).

Actualmente se está investigando para encontrar estrategias de alimentación estandarizadas para la aplicación de prebióticos y probióticos en cerdos sanos y enfermos y acceder a sus beneficios aplicativos (Scharek-Tedin et al., 2013; Scharek, Guth, Filter, & Schmidt, 2007). Los estudios futuros también podrían apuntar a posibles combinaciones de Prebióticos y Probióticos apropiados (es decir, simbióticos) para mejorar el equilibrio ecológico intestinal y reducir el riesgo de trastornos intestinales (De Vrese & Schrezenmeir, 2016; Fohse et al., 2016; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

## **1.4. La Investigación del microbioma**

La tecnología genómica ha revolucionado nuestra capacidad de caracterizar la microbiota en los seres vivos o de ambientes específicos (Turnbaugh et al., 2007). La implementación de la tecnología de secuenciación de la próxima generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) ha permitido incrementar enormemente la capacidad de secuenciación y reducir los costos. Una de las aplicaciones ha sido la secuenciación del metagenoma, permitiendo el estudio de las poblaciones bacterianas sin realizar cultivos microbianos. La secuenciación del gen microbiano 16S rRNA se utiliza normalmente para estimar la composición de la microbiota intestinal bacteriana o procariota, estos estudios que sirven como reloj molecular de la evolución bacteriana (Scharschmidt, List, Grice, & Szabo, 2009). Mientras que la secuenciación total de los genomas de los microorganismos se utiliza para la caracterización del metagenoma y la identificación de la función de los genes (Hussey & Bergman, 2014; Huttenhower et al., 2012). Los genes del ribosoma de la subunidad pequeña 16S son universales entre los procariotas. Los cebadores de PCR de amplio rango se

recogen en regiones altamente conservadas y permiten la amplificación de la mayoría de las bacterias conocidas (Scharschmidt et al., 2009).

Estos cebadores 16S rRNA flanquean regiones variables específicas de la especie del gen que se usan para inferir relaciones filogenéticas (Pace, 1997). Las especies bacterianas se definen tradicionalmente como que tienen secuencias de rRNA 16S  $\geq 97\%$  idénticas entre sí (Gevers et al., 2005). El análisis de secuencia de los genes 16S rRNA de una muestra determinada o ambiental proporciona una ventana a la diversidad bacteriana de especies que habitan ese nicho ecológico o espacio en particular (Scharschmidt et al., 2009).

Trabajos recientes han comenzado a realizar la secuenciación total del metagenoma para comprender las posibles funciones metabólicas del microbioma de cerdo (Ramayo-caldas et al., 2016; Xiao et al., 2016; Yang, Huang, Fang, He, & Zhao, 2017). En el cerdo, se ha estudiado la composición y dinámica del microbioma intestinal (Ashman & Krishnamurthy, 2019; Crespo-Piazuelo et al., 2018, 2019; Estellé & Mach, 2014; Estellé et al., 2017; Ramayo-caldas et al., 2020; Schokker et al., 2014). La secuenciación del metagenoma completo se ha utilizado para obtener el catálogo de genes de referencia del cerdo del microbioma intestinal (Xiao et al., 2016). Recientemente, se han desarrollado nuevos algoritmos de ensamblaje de genomas microbianos con metagenomas obtenidos por secuenciación de escopeta (Bowers et al., 2018; Sangwan, Xia, & Gilbert, 2016; Stewart et al., 2018; Tully, Graham, & Heidelberg, 2018).

Xiao et al., (2016) en su estudio de la secuenciación del metagenoma completo de cerdo observaron que el microbioma intestinal del cerdo comparte más genes no redundantes con el microbioma humano, que entre los microbiomas humano y del ratón. Este resultado refuerza el interés del cerdo como modelo animal para estudios biomédicos. Ambas especies son omnívoras y tienen un tracto digestivo monogástrico, que es parecido en anatomía, inmunología y fisiología (Wang & Donovan, 2015) .

Múltiples investigaciones han proporcionado información valiosa en los cambios composicionales y asociaciones entre la microbiota intestinal y los parámetros de producción (Cao et al., 2020; Chen et al., 2018; Hinkle, 2012; Metzler-zebeli et al., 2010; Muñoz et al., 2013; Schokker et al., 2014; Sun et al., 2015; Hua Yang et al., 2018). El conocer más a fondo el microbioma es de gran importancia por su potencial uso terapéutico y el uso de la “microingeniería del microbioma” o la síntesis de microbiomas a nivel experimental y de laboratorio para una posterior aplicación (Hussey & Bergman, 2014; Ishiguro et al., 2018; Neuman & Koren, 2016; Ohland & MacNaughton, 2010). Sin embargo, para utilizar el microbioma como herramienta terapéutica en la mejora de la salud animal y mejoras en el rendimiento productivo, se necesita mirar más allá de los cambios composicionales de la microbiota y entender más detalladamente los efectos que

modulan e interviene en el microbioma (Ashman & Krishnamurthy, 2019; Hussey & Bergman, 2014; Neuman & Koren, 2016).

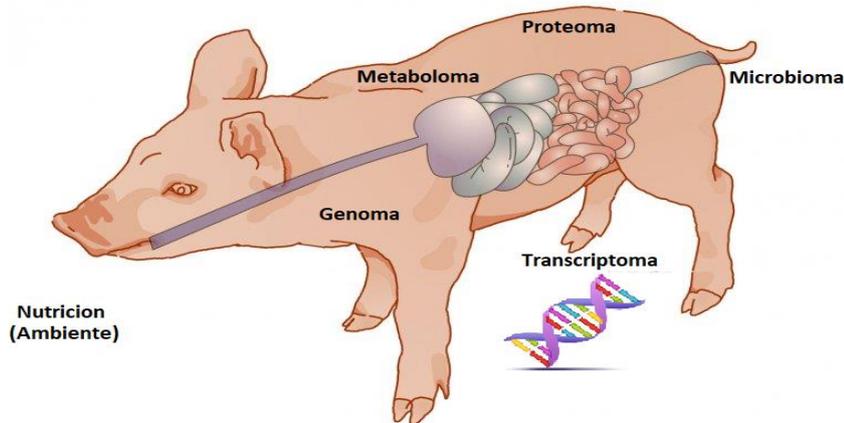
La investigación del papel de la microbiota en la producción porcina se ha visto limitada por la existencia de pocos genomas de referencia de microbiomas especialmente del cerdo que estén disponibles para anotaciones y análisis posteriores (Angelakis, 2017; Crespo-Piazuelo et al., 2018, 2019; Ramayocaldas et al., 2020; Sun et al., 2016). Pero también hay que recalcar que hay múltiples avances en herramientas bioinformáticas para el estudio más completos y de fondo de microbiomas, estos avances han sido gracias principalmente al desarrollo de investigaciones en microbiomas humanos (Angelakis, 2017; Chen et al., 2018; Neuman & Koren, 2016; L. Zhao et al., 2012).

Los estudios del microbioma han tomado últimamente la microbiota intestinal como un sistema orgánico independiente en el organismo (Ashman & Krishnamurthy, 2019; Fouchse et al., 2016; Serra, 2016; Suárez et al., 2018; Hua Yang et al., 2018). El estudio de la microbiota en el cerdo se ha centrado en el análisis de genes, lo que ha dado como resultado una lista de genes y de componentes, relacionados con las funciones de la microbiota (Aluthge et al., 2019), sin embargo se considera de que el enfoque centrado en genes específicos es muy limitado para obtener una comprensión clara de la función compleja de la microbiota intestinal que funciona como un sistema orgánico único, donde sus interacciones conjuntas de microorganismos dan una función como ecosistema (Ashman & Krishnamurthy, 2019; Hussey & Bergman, 2014; Neuman & Koren, 2016).

Por lo tanto, las investigaciones deben tomar enfoques de biología de sistemas, para analizar el comportamiento del microbioma en su conjunto (Aluthge et al., 2019; Camarinha-Silva et al., 2017). Este tipo de investigaciones proporcionaría una nueva visión sobre la comunidad microbiana, la adaptación, la organización y el papel funcional del microbioma y puede proporcionar información sobre los enfoques de selección *in vivo* para desarrollar nuevos microbios de suplementación directa, y para comprender mejor los factores que influyen en la microbiota intestinal en los cerdos y otras especies ganaderas (Aluthge et al., 2019).

Es indispensable el uso de enfoques basados en la biología del sistema, para analizar el microbioma y así tener un mayor potencial para vincular el microbioma con los fenotipos y desarrollar modelos predictivos y de selección (Aluthge et al., 2019; Chen et al., 2018; Fouchse et al., 2016; Hussey & Bergman, 2014; Sun et al., 2015). Sin embargo, para desarrollar modelos predictivos basados en microbiomas, es necesario recolectar los fenotipos asociados con cada microbioma. Por eso, las futuras investigaciones deben recopilar muchos tipos de datos fenotípicos y "ómicos", incluida la información transcriptómica

(Ramayo-Caldas et al., 2012), genómica del huésped y metabolómica (Waldor et al., 2015) (Figura 1.).



**Figura 1.** El complejo de las “OMICAS”

Dicha información se puede utilizar para desarrollar modelos mecanicistas para ayudar a ir más allá de las correlaciones/asociaciones identificadas en la mayoría de los estudios actuales. A pesar de los numerosos estudios que han analizado el microbioma en especies ganaderas, nuestra comprensión de la persistencia microbiana, la co-evolución de las interacciones microbianas del huésped y la adaptación microbiana es limitada (Hussey & Bergman, 2014; Ishiguro et al., 2018; Neuman & Koren, 2016).

Surgen las siguientes incógnitas. ¿Qué especies microbianas de origen externo y autóctonas residen en los cerdos?, ¿Qué características poseen estos microbios para persistir en este entorno? ¿Por qué/cómo fluctúan las poblaciones microbianas y cuál es la consecuencia de tales fluctuaciones?. Estas preguntas son de gran importancia para comprender qué fuerzas evolutivas y ambientales dan forma a la comunidad microbiana y su función dentro del huésped. Dicha información puede ayudar a comprender si los factores del huésped o los conjuntos microbianos ayudan a la persistencia microbiana (Aluthge et al., 2019; Uzbay, 2019).

Con este fin, la utilización de un modelo de cerdo gnotobiótico puede proporcionar información sin precedentes sobre el ensamblaje microbiano, la persistencia y las interacciones del microbio-huésped. Así podemos decir que el modelo del cerdo gnotobiótico ayudará a comprender mejor el papel causal del microbioma y el desarrollo nuevos tratamientos Probióticos.

### **1.4.1. Nutrición y salud**

El estudio del microbioma podría proporcionar información sobre la alimentación de cerdos y otras especies de interés ganadero, bajo diferentes parámetros fisiológicos y condiciones metabólicas, y durante estados de enfermedad, brindando oportunidades para una "nutrición de precisión" y programas de selección para especies ganaderas. Por lo tanto, es de importancia fomentar y encaminar los estudios de la microbiota intestinal del cerdo y hacer el énfasis en las relaciones microbio-fenotipo (Aluthge et al., 2019; Chen et al., 2018; Hussey & Bergman, 2014; Ramayo-caldas et al., 2016; Sun et al., 2015; Surana & Kasper, 2017) y así poder aprovechar mejor los beneficios del microbioma para desarrollar nuevas estrategias en los sistemas de producción porcinos.

### **1.4.2. Relación del genoma del huésped con la composición de la microbiota**

El estudio del microbioma se ha centrado principalmente en su biología y como el efecto ambiental lo modula. Es aquí donde se ha planteado que la genética del huésped forma parte de la modulación homeostática del microbioma, mientras que los factores ambientales pueden cambiar el curso original de la evolución del microbioma. Se ha sugerido el efecto genético del huésped en relación a variantes genéticas y las poblaciones microbianas (Wang, 2018).

Es difícil imaginar que el genoma con su conjunto de genes no actúe frente a amenazas o coordinara beneficios propios con el microbioma. De hecho, hay bastantes indicaciones de la coordinación gen-microbioma en los humanos como en los animales (Kurilshikov, Wijmenga, Fu, & Zhernakova, 2017; Rothschild et al., 2018). Todo indica que esta modulación y regulación es a causa de genes del sistema inmunitario (Crespo-Piazuelo et al., 2019; Hooper, Littmann, & Macpherson, 2012; Ramayo-caldas et al., 2020; Rothschild et al., 2018), regulando microorganismos patógenos o reacciones inflamatorias del organismo (Wang, 2018). El sistema inmune siendo así la barrera de control de microorganismo por excelencia, pues de este sistema depende la biología, el control y la supervivencia de los microbios que componen la microbiota (Kau, Philip, Nicholas, Goodman, & Gordon, 2011).

El proceso de regulación mediado por la genética del huésped frente a los microorganismos patógenos, y la regulación mediada por genes Y/o modulación de interacciones optimas de la microbiota. explica la evolución de las especies, pues con el tiempo se generan variantes genéticas y/o mutaciones de resistencia y supervivencia para grupos específicos de microorganismo individuos. Estas

mutaciones o variantes genéticas determinadas tienden a heredar entre generaciones, aumentando la frecuencia de las mismas en el tiempo y esto. Conduce a cambios en la genética poblacional (Barreiro & Quintana-Murci, 2010; Novembre & Han, 2012; Prugnolle et al., 2005).

Sabemos que la microbioma intestinal produce sustancias como vitaminas, serotoninas y muchas otras moléculas funcionales de señalización que modulan varios sistemas en el cuerpo del huésped, especialmente el sistema inmune (Kau et al., 2011; Kostic et al., 2015). El microbioma estimula la maduración del sistema inmune en edades tempranas mientras que este mantiene las funciones inmunes normales de los adultos; así muchas de las enfermedades relacionadas con el sistema inmune son principalmente causada por disbiosis en el microbioma (Kamada, Seo, Chen, & Núñez, 2013). El concepto de hologenoma, puede definirse como la inclusión integral de toda esta interacción, cooperación y selección mutua en el nivel genómico y metagenómico, donde el huésped y su microbioma componen una entidad funcional y la base para selección natural y evolutiva (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

Se conocen una serie de genes de importancia para mantener el sistema inmune del huésped contra los patógenos como el complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*) (Neefjes, Jongstra, Paul, & Bakke, 2011) y los receptores tipo Toll (*TLR*), que detectan una amplia gama de moléculas producidas por microorganismo intestinales (Kieser & Kagan, 2017), o han estado involucrados en procesos de enfermedad por pérdida de función biológica a causa de mutaciones en ratones y humanos en estado de enfermedad., esta pérdida de función repercute en la comunicación cruzada huésped-microbio en relación al control inmunitario. Recientemente se ha reportado como los polimorfismos en todo el genoma, y su asociación con el efecto de modulación sobre el microbioma (Bonder et al., 2016; Goodrich et al., 2016, 2014; Hov et al., 2015; Turpin et al., 2016; Wang et al., 2016).

Se han observado similitudes entre la composición microbiana de individuos emparentados, sugiriendo que las diferencias de la composición Microbiana podrían estar determinadas por la genética del huésped (Moeller et al., 2014; Nishida, 2016). En el estudio entre diferentes líneas de ratón se observó que el microbioma era muy similar entre individuos de la misma línea, concluyendo que la variabilidad genética del huésped puede explicar gran parte de la variación de la microbiota en el intestino (Org et al., 2015). Este postulado del efecto genético aún no tiene una evidencia clara al no tener en cuenta la deriva natural de las poblaciones del microbioma, las condiciones ambientales del huésped y hasta sus hábitos alimenticios (Wang, 2018).

Es de importancia resaltar que existen pocos estudios que miden la contribución de la variabilidad genética en la modulación de las comunidades bacterianas y el efecto de los polimorfismos del huésped en el establecimiento de microbiota (Goodrich et al., 2017), pero la relación entre el genoma del cerdo y su

composición de microbiota intestinal aún no se han descrito completamente (Estellé & Mach, 2014).

Las herramientas de estudio de genética cuantitativa son útiles cuando pretendemos examinar las asociaciones entre el microbioma y todo el genoma del huésped. Hay dos términos utilizados usualmente como los *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) o los estudios de asociaciones de todo el genoma (GWAS). En los estudios GWAS, generalmente se requieren individuos no emparentados, y un número efectivo de muestra lo suficientemente grande para distinguir señales estadísticamente significativas entre individuos, grupos, o poblaciones. Los estudios genéticos se basan en encontrar asociaciones significativas entre variaciones genéticas, ya sea un único SNP o una gran región cromosómica. Ambos casos consideran la información en desequilibrio de ligamiento y las variaciones en un fenotipo definido y diferentes tipos de parámetros que pueden afectar el modelo de las herramientas de asociación (Wang, 2018; Wang et al., 2016).

Hay que tener en cuenta que la similitud de un rasgo podría deberse a la relación de parentesco. Por ejemplo, animales hermanos de padre y comparten en gran medida el mismo entorno de crecimiento y podrían tener un microbioma compartido de transmisión materna (Benson et al., 2010; Wang et al., 2015). Si se estudian poblaciones divergentes, las diferencias entre un individuo y otro podrían no deberse a los efectos de genéticos, sino a un historial más largo de evolución, separación, derivas, etc. (Yatsunenکو et al., 2012).

Siendo estos los factores de confusión los más importantes del GWAS, y es esencial para cualquier estudio genético tenerlos en cuenta, por que las repercusiones de no hacerlo conducirían a errores de trabajo como falsos *loci* significativos y falsos *loci* no significativos. En especial esos picos que no llegan a ser significativos que hipotéticamente podrían ser significativos pero cubiertos por ruido en el análisis y tenencia en cuenta de las factores que intervienen en el análisis (Moeller et al., 2014; Nishida, 2016; Ochman et al., 2010; Wang, 2018). En estos análisis estadísticos se utiliza un modelo lineal para eliminar los efectos en los análisis genéticos, estos siendo relativamente sencillos. pero es de tenerse en cuenta de la existencia de variables del microbioma que no son lineales al momento del procesamiento de la información (Lahti, Salojärvi, Salonen, Scheffer, & De Vos, 2014).

Ramayo-caldas et al., (2020) detalla limitaciones en los estudios de asociación como. por ejemplo, el tamaño limitado de la muestra o la falta de grados de libertad para estimar todos los efectos, pero también de metodología como la elección de cebadores o el uso de protistas y hongos en investigación, que es un área poco estudiada de los eucariotas en comparación con los bacterianos, que junto con la reducida cantidad y disponibilidad de genomas de referencia comprometen la precisión de la clasificación taxonómica en estos estudios. También recomienda que futuros estudios incluyan validaciones funcionales y

meta-secuenciación alternativa para establecer el papel de los de otros microorganismos asociados de las comunidades microbianas en el desempeño productivo, bienestar y salud de los cerdos.

Investigaciones sugieren fuertemente que la genética del huésped es un factor importante en la determinación de la composición microbiana intestinal. Muchas enfermedades en humanos se relacionan con las pérdidas de diversidad microbiana intestinal (Karlsson et al., 2013). Esto nos plantea la posibilidad de que el genotipo del huésped pueda influir en la diversidad del microbioma (Karlsson et al., 2013; Wang et al., 2012).

Las asociaciones GWAS encontradas podrían ser específicas de la población de cerdos de trabajo, ya que los polimorfismos que se encuentran y están asociados a la composición de la microbiota intestinal pueden no segregarse en otras poblaciones. Además, la microbiota intestinal puede verse afectada por diferentes factores como la raza, la edad, y la dieta. Por tanto, es necesario el estudio de diferentes poblaciones porcinas para determinar qué combinaciones genéticas favorecen el enriquecimiento de proliferación de una microbiota óptima hablando de salud y productividad (Crespo-Piazuelo et al., 2019).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

- Identificar genes y polimorfismos genéticos asociados con la composición de la microbiota Intestinal en el cerdo.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Anotar y amplificar por PCR genes candidatos localizados en regiones del genoma del cerdo asociadas con la composición de la microbiota intestinal.
- Detectar polimorfismos genéticos en los genes candidatos para la composición de la microbiota intestinal.
- Determinar el genotipo de las variantes genéticas más interesantes en cerdos con datos de composición de la microbiota intestinal y realizar estudios de asociación para su validación genética.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Lugar de realización del estudio

Este estudio fue realizado en el Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), en el grupo de Genómica Animal. El CRAG está ubicado en el campus de la Universidad Autónoma de Barcelona.

### 3.2. Materiales

#### 3.2.1. Material animal.

El material animal utilizado fue una población comercial de cerdos F1 (Iberico x Duroc). A partir de muestras de músculo conservadas a  $-80^{\circ}$  C, se extrajo DNA y RNA. Para el análisis de genes candidatos asociados a la composición de la microbiota se seleccionaron 16 animales extremos en abundancia para el análisis de cada género microbiano (8 de la línea alta, 8 de la línea baja).

### 3.3. Métodos utilizados

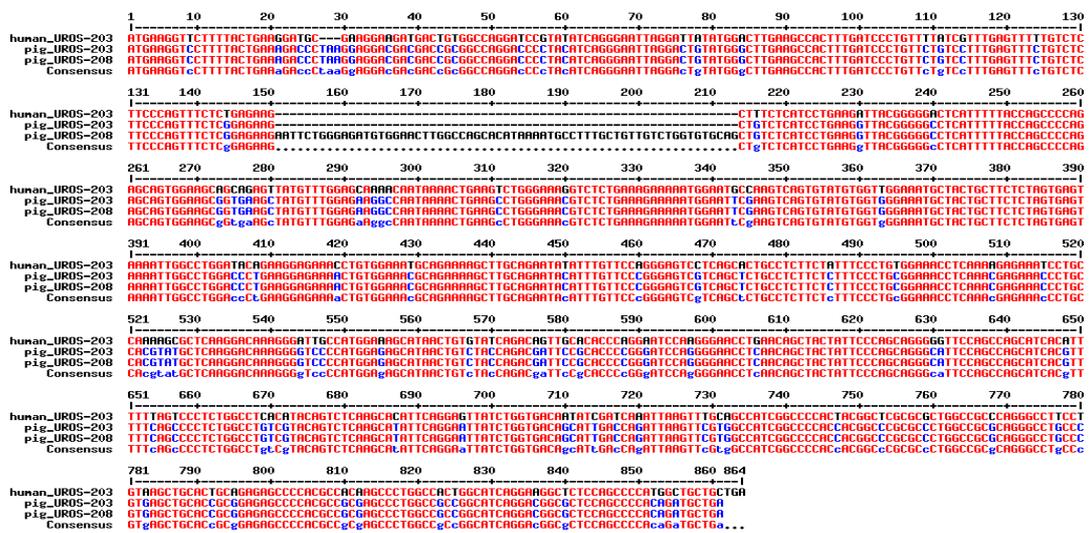
#### 3.3.1. Selección de genes candidatos

Este estudio partió de un trabajo previo del grupo de investigación, en el que se caracterizó la composición del microbioma del colon distal en 285 cerdos de la población comercial Ibérico x Duroc utilizando la secuenciación masiva de una región del gen 16S rRNA (Crespo-Piazuelo et al., 2019). En este trabajo se identificaron regiones genómicas del cerdo asociadas con la composición de varios géneros bacterianos. En estas regiones se determinó un intervalo de referencia de 1 Mb para cada lado del SNP significativo de la región por medio de la herramienta BioMart (Kinsella et al., 2011) del proyecto Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) usando el genoma de referencia Sscrofa11.1.

Los genes candidatos se seleccionaron por posición y función para cada género microbiano: *Streptococcus* (UROS), *Akkermansia* (CHST12), *Phascolarctobacterium* (ST14, IKBKE, JAM3), y *Prevotella* (MAN2B2).

### 3.3.2. Comparación de la anotación de los genes candidatos entre el cerdo y el hombre

Antes de comenzar el diseño de primers, se hizo una comparación de la anotación de estos genes del cerdo con los de humano reportados y anotados en [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org). Se descargaron las secuencias de los diferentes transcritos de DNA genómico y cDNA para cada gen del cerdo y del hombre y se alinearon mediante la herramienta bioinformática multAling (Corpet, 1988). Este programa funciona con un algoritmo de alineación múltiple de secuencias (Figura 2), ya sea para proteínas o ácidos nucleicos.



**Figura 2. Alineamiento de secuencias**

La anotación del genoma humano es mucho más completa que la del cerdo y la comparación permite detectar posibles errores en porcino, asumiendo conservación entre las dos especies. A partir del alineamiento de secuencias se identificó el transcrito de cada gen del cerdo que se parecía más con la anotación del gen humano (Tabla 1).

Para la selección de transcritos se tuvo en cuenta el número de pares de bases y de aminoácidos.

**Tabla 1. Transcritos seleccionados de los genes candidatos**

| Gen    | Transcrito | Transcrito ID                        | Cromosoma | Posición de inicio pb | Posición final pb |
|--------|------------|--------------------------------------|-----------|-----------------------|-------------------|
| CHST12 | 201        | <a href="#">ENSSSCT00000008301.3</a> | 3         | 1,720,500             | 1,745,338         |
| MAN2B2 | 201        | <a href="#">ENSSSCT00000023041.2</a> | 8         | 4,137,035             | 4,181,195         |
| ST14   | 201        | <a href="#">ENSSSCT00000065952.1</a> | 9         | 56,888,246            | 56,929,767        |
| JAM3   | 203        | <a href="#">ENSSSCT00000041986.2</a> | 9         | 60,629,306            | 60,712,502        |
| IKBKE  | 201        | <a href="#">ENSSSCT00000030765.3</a> | 9         | 67,123,265            | 67,147,992        |
| UROS   | 203        | <a href="#">ENSSSCT00000063380.2</a> | 14        | 135,101,609           | 135,131,072       |

pb: pares de bases

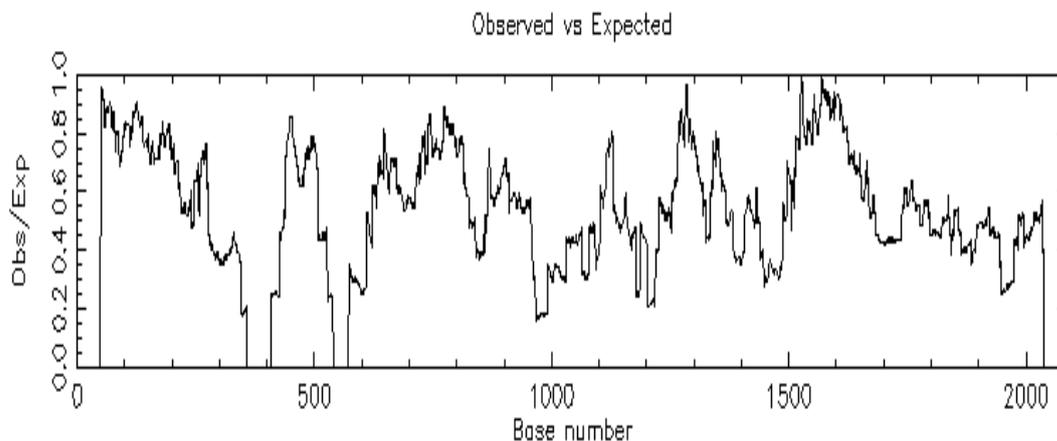
Una vez seleccionados los transcritos de cada gen se utilizó la herramienta RepeatMasker para identificar las zonas repetitivas intercaladas (Figura 3) de las secuencias analizadas (Smit & Hubley, 2020). Después se utilizó la aplicación bioinformática Cpgplot para localizar zonas ricas en guaninas y citosinas (Figura 4) de la secuencia analizada (Madeira et al., 2019). Estas herramientas ayudaron en el posterior diseño de los *Primers* de PCR y secuenciación.

```

AGGTGAGCCTAAGGGTTTGAAGTCTAATAAGTAGAAGGAAGAGGAC
TTCTATTTGGGTTTGATATCAAAATACGCCTCCCTCACCACCCACCATGA
GCGCAGTCCAACAATGGCCAAAGCCCAAGACTTACTTCTCCATGGGTGAA
ACTTCAATCAGTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
TCAGATAAATAAACACATGTATAGCTAGAGCCCTCCTGGATATTAGAGGG
AGCCCTGAATGGTCAGCATCCCTCGGACCAGTGAATCAGGGTAAAGCGC
TCCAGCAGAGGGACCCTCAGGAGCAAGGAGTGGCACGCTGGAAGTGGCAG
GGACCTCAGCACATAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CACCCAAGAGATGTGACTGGCAGAGGCCATCGGCGGCGTCAGGGGTGAGC

```

**Figura 3.** Visualización de RepeatMasker



**Figura 4.** Visualización de Cpgplot

### 3.3.3. Identificación de polimorfismos anotados en Ensembl

Para cada gen candidato se identificaron los polimorfismos genéticos ya reportados en estos genes (Tabla 2). Para esto se utilizó la aplicación BioMartTool de Ensembl Project ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). También se realizó la correspondiente predicción del efecto de los SNPs mediante el programa SIFT, que predice si una sustitución de aminoácidos afecta o no a función de la proteína y las propiedades físicas de los aminoácidos (Sim et al., 2012). Se

seleccionaron los SNPs de interés y paralelamente los exones donde se ubicaban los correspondientes SNPs en cada gen, y así proceder al diseño de los *primers*.

**Tabla 2.** Identificación de SNPs de interés para cada gen candidato, con su ubicación, efecto y consecuencia de la variante

| <u>Nombre del gen</u> | <u>Exón</u> | <u>Cromosoma</u> | <u>Nombre de la variante</u> | <u>Posición</u> | <u>Alelos</u> | <u>Predicción SIFT</u>       | <u>Consecuencia de la variante</u> |
|-----------------------|-------------|------------------|------------------------------|-----------------|---------------|------------------------------|------------------------------------|
| IKBKE                 | 8           | 9                | rs707345016                  | 67130917        | G/T           | deleterious                  | missense_variant                   |
|                       | 10          |                  | rs788178428                  | 67132087        | T/A           | tolerated                    |                                    |
|                       | 10          |                  | rs690630354                  | 67132142        | T/C           | tolerated                    |                                    |
|                       | 12          |                  | rs713684564                  | 67133616        | G/A           | tolerated                    |                                    |
| JAM3                  | 5           | 9                | rs698368766                  | 60706781        | C/G           | deleterious                  | missense_variant                   |
|                       | 7           |                  | rs786648255                  | 60708864        | G/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 7           |                  | rs333088233                  | 60708865        | C/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 8           |                  | rs703755029                  | 60709038        | G/T           | deleterious                  |                                    |
|                       | 8           |                  | rs709040079                  | 60709054        | T/C           | deleterious                  |                                    |
| ST14                  | 2           | 9                | rs1111317617                 | 56912021        | C/T           | deleterious                  | missense_variant                   |
|                       | 2           |                  | rs690376130                  | 56912039        | G/A           | deleterious                  |                                    |
|                       | 3           |                  | rs696910204                  | 56912280        | G/A           | tolerated                    |                                    |
|                       | 10          |                  | rs327621342                  | 56916588        | G/A           | tolerated                    |                                    |
|                       | 11          |                  | rs790875176                  | 56916715        | G/A           | tolerated                    |                                    |
|                       | 11          |                  | rs332737421                  | 56916726        | A/G           | tolerated                    |                                    |
|                       | 16          |                  | rs698488136                  | 56920512        | C/T           | deleterious                  |                                    |
| UROS                  | 6           | 14               | rs788854328                  | 135119512       | C/A           | tolerated                    | missense_variant                   |
|                       | 9           |                  | rs694646328                  | 135115274       | G/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 9           |                  | rs322990155                  | 135115269       | C/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 9           |                  | rs341493855                  | 135115244       | T/C           | tolerated                    |                                    |
|                       | 9           |                  | rs709832061                  | 135115224       | C/A           | deleterious                  |                                    |
|                       | 11          |                  | rs340645142                  | 135107202       | C/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 12          |                  | rs322070016                  | 135106256       | T/C           | tolerated                    |                                    |
|                       | 13          |                  | rs337796413                  | 135105272       | C/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 10          |                  | rs331280168                  | 135102075       | C/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 10          |                  | rs318288727                  | 135102048       | G/A           | tolerated                    |                                    |
|                       | 10          |                  | rs336102452                  | 135102034       | T/C           | tolerated - low confidence   |                                    |
| CHST12                | 2           | 3                | rs341521137                  | 1741908         | G/T           | deleterious                  | missense_variant                   |
|                       | 2           |                  | rs343003111                  | 1741748         | C/T           | tolerated                    |                                    |
|                       | 2           |                  | rs696586947                  | 1742570         | C/A           | tolerated                    |                                    |
|                       | 2           |                  | rs1108271931                 | 1741574         | G/C           | deleterious - low confidence |                                    |
| MAN2B2                | 7           | 8                | rs325527722                  | 4150487         | A/G           | deleterious                  | missense_variant                   |
|                       | 8           |                  | rs788527764                  | 4153704         | A/G           | deleterious                  |                                    |
|                       | 11          |                  | rs793179860                  | 4164178         | C/T           | deleterious                  |                                    |
|                       | 13          |                  | rs787846410                  | 4173325         | C/G           | deleterious                  |                                    |
|                       | 13          |                  | rs332511424                  | 4173375         | C/T           | deleterious                  |                                    |
|                       | 13          |                  | rs693053144                  | 4173417         | A/G           | deleterious                  |                                    |

Nota: SIFT (siglas en inglés: sorting intolerant from tolerant ): clasificación intolerante vs tolerante

### 3.3.4. Diseño de *primers*

Una vez identificados los SNPs se procedió al diseño de *Primers* por medio de la aplicación Web Primer3Plus (<https://primer3plus.com>). En esta aplicación es necesario ajustar los parámetros y el diseño de la reacción (Figura 5), por ejemplo, la longitud del amplicon, la longitud del primer (mínima, óptima y máxima), la temperatura de fusión (mínima, óptima y máxima), y el porcentaje (%) de GC. Una pareja de *primers* debe tener temperaturas de alineamiento o fusión muy cercanas para maximizar el rendimiento (máximo 2 grados), y un contenido en GC, entre 50% y 70% (Pérez, 2011). Una vez de ajusten los parámetros procedemos al diseño de los cebadores (Figura 6).

Product Size Ranges: 501-600 601-700 401-500 701-850 851-1000 1001-1500 1501-3000 3001-5000 401-500 301-400 21

Primer Size: Min: 18 Opt: 20 Max: 27

Primer Tm: Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 63.0 Max Tm Difference: 100.0

Primer GC%: Min: 20.0 Opt: 50.0 Max: 80.0

Concentration of monovalent cations: 50.0 Annealing Oligo Concentration: 50.0

Concentration of divalent cations: 1.5 Concentration of dNTPs: 0.6

Mispriming/Repeat Library: NONE

Figura 5. Ajuste de parámetros para el diseño de *Primers* con Primer3Plus.

|      |            |             |            |            |            |
|------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 7401 | GCCTGGATGT | GTGGTCAGGG  | ATTAGGAAGT | GGAAGGAGAC | GAGAGCCTGT |
| 7451 | GGAGACGAGA | GCTGTGTGCC  | TAGCTGGGGA | GTAGCAGGAC | TGCAAGCCAG |
| 7501 | GACTCCCGAA | TTCCATTTTC  | AGGCTGCCTC | AGAGCGGGAG | GAGCTGGGTG |
| 7551 | GCTGGCCCTC | CAAGCTGAGT  | CCATCATCCC | TTGGAGTGGG | ATGGGCTGGG |
| 7601 | GGTCCCGCTG | ACCTGGCCCT  | GCCTCCCTCA | GGTACCGGAT | CACCTCGGAG |
| 7651 | AAGCCAGCCG | GGGCCATCGC  | AGGCATCCAG | AAGCCGGAGA | ACGGGCCCTT |
| 7701 | GGAGTGGAGT | TACACCCTCC  | CGGTCACTTG | CCAGCTGTCC | AGCTGGGTGG |
| 7751 | GACCCGTGTT | GAGGACAGA   | CACAGAGCTG | CGTGTGGGCC | AATGTCTTTT |
| 7801 | TCTCAGCTGA | GGGTCCTCTG  | GGTGCCTTGG | GCTTGGGCAC | ACCACCTTGC |
| 7851 | CTTCCCGCC  | TCCATTCTC   | CGCCTGGATG | CTGGAAGACC | CTCCACGCTC |
| 7901 | TTCTCCCGCA | CCCTGCCCCAC | CCCCACGGTC | CCAGCTCTTT | AGGATGTTCT |
| 7951 | CACGGAGGGA | CCTCCATCAC  | CTGATCAAGG | AAGACGAGGC | TGGGCCCTGG |
| 8001 | CCCCTGATAG | TCTCCATGTC  | TTGGGTGCAG | GGGACTGCAG | AGCCAGCTGG |
| 8051 | TGCCCATCCT | AGCCAAACATC | CTGGAGGTGG | AGCAGGCCAA | ATGCTGGGGT |
| 8101 | TTCCAGCAAT | TCTTTGCCGA  | GACCACTGAC | ATCCTCCAGC | GAGTCTGGCT |
| 8151 | CCACGTCTTC | TCCCTGCCCC  | AGGCCGTCTT | GCACCATGTC | TACGTCCACA |
| 8201 | CACATAACAC | GTGAGCAGGC  | ATCAGCCTCC | TCTTCCCAAG | CACAGGGGTG |

Pair 1:

Left Primer 1: Primer\_F

Sequence: TGTGTGCCTAGCTGGGGAGTAG

Start: 7463 Length: 22 bp Tm: 63.8 °C GC: 59.1 % ANY: 6.0 SELF: 2.0

Right Primer 1: Primer\_R

Sequence: GGTCCCTCCGTGAGAACATCCT

Start: 7962 Length: 22 bp Tm: 63.9 °C GC: 54.5 % ANY: 4.0 SELF: 2.0

Product Size: 500 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 2.0

Figura 6. Diseño de *Primers* con Primer3Plus

Una vez diseñados los *primers* (Tabla 3), se analizó su calidad mediante aplicaciones bioinformáticas WEB como Primer-BLAST que permite ver la especificidad de los *primers* (Figura 7). La amplificación específica del amplicon

deseado requiere que los *primers* no tengan coincidencias con otras regiones del genoma, como mínimo en orientaciones y distancias que permitan una amplificación no deseada (Ye et al., 2012).

| Primer pair 1  |                        |        |       |       |                      |                         |
|----------------|------------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
|                | Sequence (5'>3')       | Length | Tm    | GC%   | Self complementarity | Self 3' complementarity |
| Forward primer | GCCTGATGCCGAACCTTGACCC | 22     | 65.96 | 63.64 | 3.00                 | 0.00                    |
| Reverse primer | TAGTAGGTGCACAGCCCCGGAC | 22     | 65.98 | 63.64 | 6.00                 | 3.00                    |

Products on target templates

>NC\_010451.4 Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc chromosome 9, Sscrofa11.1

product length = 537

Forward primer 1 GCCTGATGCCGAACCTTGACCC 22  
 Template 56920382 ..... 56920403

Reverse primer 1 TAGTAGGTGCACAGCCCCGGAC 22  
 Template 56920918 ..... 56920897

**Figura 7. Visualización del Primer-BLAST**

También se utilizó la herramienta OligoAnalyzer para analizar la posible formación de estructuras secundarias en la PCR. Los dímeros, Homo y Hetero dímeros, (Figura 8) son evaluados en general por  $\Delta G$ , que es un valor que debe oscilar entre 0 y -9. Valores más negativos pueden producir problemas en la PCR.

|   |   |
|---|---|
| <b>Dimer Sequence:</b><br>5'- TGGACCAGGGACTTGCTTCTCAG -3'<br>Maximum Delta G: -44.1 kcal/mole                         | <b>Primary Sequence:</b> 5'- GCCTGATGCCGAACCTTGACCC -3'<br><b>Secondary Sequence:</b> 5'- TAGTAGGTGCACAGCCCCGGAC -3'<br>Maximum Delta G: -47.07 kcal/mole |
| <b>Delta G: -5.02 kcal/mole Base Pairs: 3</b><br>5' TGGACCAGGGACTTGCTTCTCAG<br>    :::<br>3' GACTCTTCGTTTCAGGGACCAGGT | <b>Delta G: -6.68 kcal/mole Base Pairs: 3</b><br>5' GCCTGATGCCGAACCTTGACCC<br>    :::<br>3' CAGGCCCGACACGTGGATGAT   |

**Figura 8. Valores de Homo y Hetero - Dímeros.**

En esta misma aplicación podemos analizar el *hairping* (horquilla), otra forma de estructura secundaria. Para los *hairpins*, la temperatura de fusión o Melting (TM) debe ser inferior a la temperatura de hibridación de la PCR, la TM más alta debe ser como máximo 5°C inferior a la temperatura de hibridación (Figura 9).

### Structures

| structure | Image   | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | T <sub>m</sub> (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> .mole <sup>-1</sup> ) | Output   |
|-----------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---|--|
| 1         |  | 0.07                                  | 19.6                | -4.1                                  | -14   | <input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det |
| 2         |  | 0.91                                  | 7                   | -14.1                                 | -50.34  | <input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det |

**Figura 9. Valor de Hairpin**

**Tabla 3. Primers elaborados para amplificar en la PCR**

| Gen    | Nombre             | Primer  | Secuencia (5' - 3')          | Long . (pb) | Tm opt. | Producto (pb) |
|--------|--------------------|---------|------------------------------|-------------|---------|---------------|
| UROS   | UROS_E6_E7.8       | Forward | TGCCCTATAAGGACGGCC           | 18          | 60      | 189           |
|        |                    | Reverse | CAGGATGAGACAGCTTCTCCG        | 21          |         |               |
|        | UROS_E7.8_E13.14   | Forward | CAGTTTCTCGGAGAAGCTGTCTCA     | 24          | 60      | 543           |
|        |                    | Reverse | CCGATGGCCACGAACCTTAATCT      | 22          |         |               |
|        | UROS_E13.14_E14    | Forward | ATTGACCAGATTAAGTTCGTGGC      | 23          | 56      | 567           |
|        |                    | Reverse | TCCTTCACACACAGCAAACCTTTATTAG | 27          |         |               |
| IKBKE  | IKBKE_EXON08       | Forward | TGTGTGCCTAGCTGGGGAGTAG       | 22          | 68      | 500           |
|        |                    | Reverse | GGTCCTTCCGTGAGAACATCCT       | 22          |         |               |
|        | IKBKE_EXON10       | Forward | GCCTTTGTCTCCCCATCCTGCG       | 22          | 66      | 530           |
|        |                    | Reverse | AGCAGGGAAGTCGGGTCACAGG       | 22          |         |               |
|        | IKBKE_EXON11.12.13 | Forward | TGATGGCTGAGTGTGAGCTGAG       | 22          | 66      | 655           |
|        |                    | Reverse | AAGAAGTGGGTGGAGGCAAGAC       | 22          |         |               |
| CHST12 | CHST12_EXON02      | Forward | TCATGGTCGTGCTCATCATCGT       | 22          | 66      | 1179          |
|        |                    | Reverse | GGCTTGGGGTAGCCAAAGAGAA       | 22          |         |               |
| JAM3   | JAM3_EXON05        | Forward | TGGAGCCTCATTCCCTGAGAGTG      | 22          | 68      | 580           |
|        |                    | Reverse | CAGAGACGTCTGCATCCTCACA       | 22          |         |               |
|        | JAM3_EXON07.08     | Forward | TGATGTTCCAGGACGTGTTTCCAG     | 22          | 68      | 538           |
|        |                    | Reverse | GCTTCTCTGGGGGAATGTCATC       | 22          |         |               |
| ST14   | ST14_EXON02.03     | Forward | TTCCTGAAGGGCAGTGCTTTGC       | 22          | 68      | 644           |
|        |                    | Reverse | GGCATCAGGGAGCAGAGAGGAG       | 22          |         |               |
|        | ST14_EXON10_11     | Forward | ACTGCCCTCACACCATCCAGTT       | 23          | 66      | 769           |
|        |                    | Reverse | GTGTGTGCCAACCTTCACTGCCA      | 23          |         |               |
|        | ST14_EXON16_FW     | Forward | GCCTGATGCCGAACCTTGACCC       | 22          | 68      | 537           |
|        |                    | Reverse | TAGTAGGTGCACAGCCCCGGAC       | 22          |         |               |
| MAN2B2 | MAN2B2_EXON07      | Forward | TTGTGGCTTCCAGAGGTGAGGCT      | 23          | 66      | 722           |
|        |                    | Reverse | AGACATGGAGAGAGGAACCCGCC      | 23          |         |               |
|        | MAN2B2_EXON08      | Forward | CACCCTGCCCTACATCCCCTCTG      | 23          | 66      | 656           |
|        |                    | Reverse | GGAGGCCCAATCCTGCTACAGT       | 23          |         |               |
|        | MAN2B2_EXON11      | Forward | TGTCTTCCAACCCTGACAGCCAT      | 23          | 68      | 462           |
|        |                    | Reverse | TGGCCTAGACTCACACAACCAGG      | 23          |         |               |
|        | MAN2B2_EXON13      | Forward | AGGCAGGAGGGAGTGAGCGAAAC      | 23          | 68      | 436           |
|        |                    | Reverse | TGTCTAGCCTTCTGGAGCAGGGC      | 23          |         |               |

Tm Opt.: Temperatura de hibridación óptima, Long.: Longitud del primer, pb: Pares de bases

### 3.3.5. Selección de animales extremos para cada género bacteriano

Los animales extremos fueron seleccionados de acuerdo a la abundancia relativa normalizada de cada género bacteriano a analizar (Tabla 4). Se seleccionaron 16 animales, de los cuales 8 tenían una menor abundancia (grupo Low) y 8 una mayor abundancia (grupo High) del género bacteriano. En la selección de los animales se equilibraron los animales de cada sexo.

**Tabla 4.** Animales extremos seleccionados.

| Genero bacteriano    |      |                    |      |                              |      |                   |      |                    |
|----------------------|------|--------------------|------|------------------------------|------|-------------------|------|--------------------|
| <i>Streptococcus</i> |      | <i>Akkermansia</i> |      | <i>Phascolarctobacterium</i> |      | <i>Prevotella</i> |      | Extremo bacteriano |
| Animal               | Sexo | Animal             | Sexo | Animal                       | Sexo | Animal            | Sexo |                    |
| 224                  | M    | 150                | F    | 206                          | F    | 121               | M    | Low                |
| 158                  | M    | 267                | F    | 127                          | F    | 103               | F    |                    |
| 95                   | M    | 248                | M    | 78                           | F    | 206               | F    |                    |
| 196                  | F    | 179                | F    | 133                          | F    | 46                | M    |                    |
| 97                   | M    | 291                | F    | 33                           | M    | 148               | M    |                    |
| 164                  | F    | 283                | M    | 165                          | M    | 82                | F    |                    |
| 226                  | F    | 242                | M    | 198                          | M    | 116               | M    |                    |
| 94                   | F    | 38                 | F    | 40                           | M    | 78                | F    |                    |
| 33                   | M    | 196                | F    | 208                          | M    | 168               | M    | High               |
| 42                   | M    | 126                | F    | 22                           | F    | 172               | M    |                    |
| 28                   | F    | 137                | M    | 124                          | F    | 253               | M    |                    |
| 267                  | F    | 315                | F    | 95                           | M    | 282               | F    |                    |
| 38                   | F    | 28                 | F    | 172                          | M    | 237               | M    |                    |
| 39                   | F    | 15                 | F    | 58                           | F    | 157               | F    |                    |
| 9                    | F    | 96                 | M    | 273                          | F    | 180               | F    |                    |
| 14                   | M    | 213                | M    | 184                          | M    | 291               | F    |                    |

### 3.3.6. Extracción de RNA

El protocolo de extracción de RNA se basó en la utilización del kit invitrogen Trizol®. Para la homogenización de la muestra se utilizaron *beads*, que son un tipo de tubos con unas pequeñas partículas sólidas de cerámica con el fin de contribuir a la fragmentación y homogenización del tejido. En cada tubo con *beads* se añadió 1 ml de Trizol y un pequeño trozo del tejido, entre 50 y 100 mg, con la ayuda de un bisturí y pinzas. Se colocaron estos tubos *beads* en el precellys, que es una máquina de laboratorio de homogenización mecánica de tejidos. Durante este proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen, permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Para homogenizar en el precellys se configura la maquina a 6500 rpm durante 30 segundos. El tubo *beads* se centrifuga posteriormente durante 15 minutos a 4°C a 12000 rpm. Se extrae el sobrenadante y se deposita en un tubo Eppendorf. Se añade 100 µl de 1-Bromo-3-chloropropane (BCP) al Eppendorf en campana, se hace un vortex

por 10 segundos y se deja a temperatura ambiente 5 minutos. Después se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm a 4°C.

Se extrae del Eppendorf la parte superior traslucida (400 µl), en dos pipeteos de 200 µl con mucho cuidado para no mezclar las fases y se pone en otro Eppendorf. A este Eppendorf se le añade 100 µl de etanol al 100% y se hace vortex, se pasa esta solución al tubo del kit Reagen con su debido filtro y se centrifuga a 12000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente, se hace de nuevo este paso una segunda vez. Después el filtro es retirado y es centrifugado en seco por 30 segundos a 12000 rpm. Se retira este filtro y se obtiene una solución de 20 a 100 µl. Se deja 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga este tubo y veremos en la parte inferior del tubo el RNA (Invitrogen, 2019). Se estandarizaron las concentraciones de las muestras de RNA (200ng/µl).

### 3.3.7. Obtención de cDNA a partir de RNA

La transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA, usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA. En esta técnica se mezcla de cebadores de ocho nucleótidos con secuencias generadas al azar (Random primers) para iniciar la síntesis de la hebra de cDNA. Los random primers aseguran que la primera hebra de síntesis se produzca eficientemente a partir de todas las moléculas de RNA presentes, tanto mRNA (mensajero) como rRNA (ribosómico). Los componentes de esta reacción se visualizan en la Tabla 5. El ciclo térmico de esta reacción se compone de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C y 4°C infinito (Martínez, Mena, Herrera, & Martínez, 2010).

El DNA genómico que se utilizó para el análisis de ciertos genes fue extraído previamente por el grupo de investigación en genómica animal del CRAG. Estos DNA fueron estandarizados a una concentración de 25 ng/µl.

**Tabla 5.** Componentes de la reacción de retrotranscripción

| <b>Componente</b>         | <b>Volumen/reacción (µl)</b> |
|---------------------------|------------------------------|
| 10x buffer                | 2,00                         |
| 25x dNTPs                 | 0,80                         |
| 10x Random primers        | 2,00                         |
| MsRT (Retrotranscriptasa) | 1,00                         |
| Agua DEPC                 | 9,20                         |
| cDNA (200ng/ µl)          | 5                            |
| <b>Volumen final</b>      | <b>20</b>                    |

Este cDNA obtenido, fue diluido ½ para ser utilizado en la PCR.

### 3.3.8. Cuantificación del DNA y RNA

La cuantificación se realizó por espectrofotometría, ya que esta nos permite confirmar que contamos con la concentración suficiente de ácidos nucleicos (DNA/RNA) para realizar la PCR, análisis de SNPs o la secuenciación. La principal ventaja de trabajar con el espectrofotómetro NanoDrop es la facilidad de la técnica, dado que solo se necesitan 1 o 1,5  $\mu$ l de muestra para tener resultados en tiempo real y que la muestra se pipetea directamente sobre la superficie de medición.

La espectrometría se basa en la ley de Beer-Lambert que indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica de los ácidos nucleicos es que absorben la luz ultravioleta (UV) a 260 nm, permitiendo estimar su concentración mediante espectrofotometría.

Para estimar la pureza de los ácidos nucleicos se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm y la 260/230 (Tablas 6 y 7).

**Tabla 6.** Valores indicativos de pureza en muestras de DNA:

| Ratio    | Valor   | Pureza  |
|----------|---------|---|
| 260/280  | 1.8-2   | DNA de pureza óptima                            |
|          | 1.6-1.8 | DNA pureza aceptable                            |
|          | < 1,6   | presencia de compuestos aromáticos              |
|          | > 2.1   | contaminación con ARN                           |
| A260/230 | < 1,5   | contaminación con sales, carbohidratos, fenoles |

**Tabla 7.** Valores indicativos de pureza en muestras de RNA:

| Ratio    | Valor   | Pureza  |
|----------|---------|---|
| 260/280  | 2.0-2.2 | RNA de pureza óptima                            |
|          | > 1.7   | RNA pureza aceptable                            |
|          | < 1.7   | presencia de compuestos aromáticos              |
| A260/230 | < 1.5   | contaminación con sales, carbohidratos, fenoles |

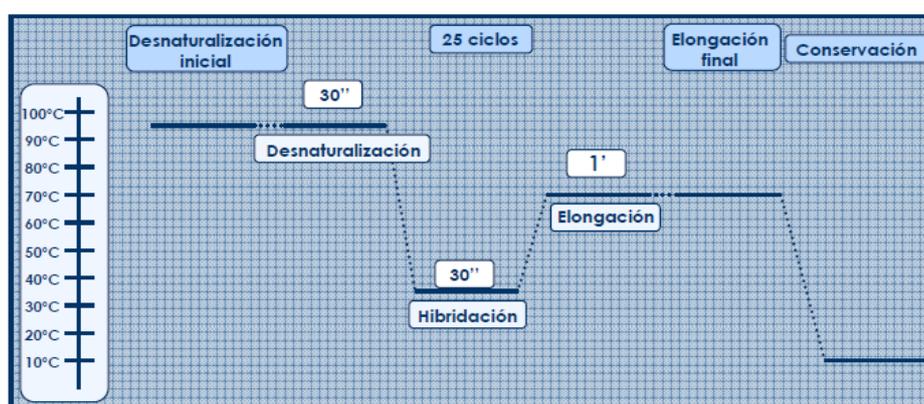
El rango de medida de concentración para muestras de DNA es de 2-3700 ng/ $\mu$ l y para RNA de 2-3000 ng/ $\mu$ l (Somma, 2019; USAL, 2019).

### 3.3.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida y económica utilizada para amplificar segmentos de DNA y permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA. El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde.

Esta reacción requiere cuatro componentes básicos, la DNA polimerasa, el DNA molde, oligonucleótidos y un par de cebadores. En primer lugar, es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas del DNA se separen. Esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 95°C. El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 68°C.

se puede ver los componentes y sus cantidades determinadas para una PCR al detalle en las Tablas 8 y 9. Y un ejemplo de su perfil térmico en la Figura 10.



**Figura 10.** Perfil térmico típico de una PCR.

*Fuente:* Pérez, 2011

Los tiempos de cada fase son orientativos. La temperatura de hibridación puede variar en función de la especificidad de la reacción.

Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq DNA polimerasa la temperatura de elongación suele ser entre 70-74°C.

**Tabla 8.** Principales componentes de la PCR y su concentración de almacenamiento.

| Componente | Concentración |
|------------|---------------|
| Cebador    | 10Mm          |
| Buffer     | 10x           |
| dNTPs      | 25Mm          |
| MgCL2      | 25Mm          |
| AmpliTAQ   | 5 u/μl)       |
| H2O        | -             |

**Tabla 9.** Cantidades de cada componente en una reacción de PCR

| Componente                    | Concentración | Volumen/reacción (μl) |
|-------------------------------|---------------|-----------------------|
| Buffer                        | 10x           | 1,50                  |
| dNTPs                         | 25Mm          | 0,15                  |
| MgCl2                         | 25Mm          | 1,50                  |
| AmpliTaq                      | 5 u/μl)       | 0,15                  |
| H <sub>2</sub> O              | -             | 9,30                  |
| Cebador Forward               | 10Mm          | 0,45                  |
| Cebador Reverse               | 10Mm          | 0,45                  |
| DNA                           | 25 ng/μl      | 1,50                  |
| <b>Volumen Total Reacción</b> |               | <b>15,00</b>          |

En ocasiones en el desarrollo de la investigación se encontraron zonas del genoma que son difíciles de amplificar (zonas ricas en GC >65%). En este caso se utilizó sistema denominado comercialmente como GC-RICH. En este tipo de PCR varía la composición enzimática: dado que tiene una mezcla enzimática de Taq DNA Polimerasa termoestable y Tgo DNA Polimerasa, una enzima termoestable con actividad de corrección de pruebas (Exonucleasa 3'-5').

### 3.3.10. Electroforesis

La electroforesis es una técnica que se utiliza de forma generalizada en la que, fundamentalmente, se aplica corriente eléctrica a moléculas biológicas, ya sean DNA, proteínas o RNA y se separan en función del tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel. Para esto se necesitó de un gel de agarosa elaborado con una solución Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, agarosa y Bromuro de Etidio como agente intercalante en la hebra de DNA.

En base al tamaño de DNA amplificado decidimos que porcentaje de agarosa se preparara el gel. Si sabemos que es un amplicon menor de 500 pares de bases, podemos preparar geles por encima del 1% para mayor resolución, y cuando son amplicones de más de 500 pares de bases se pueden preparar geles por debajo de 1%. La cantidad de agarosa pesada se disuelve en un volumen (ml) determinado de TAE 1X en un Erlenmeyer y va al microondas hasta hervir sin quedar rastros de cristales de agarosa, luego se añade el bromuro de etidio en el mismo número de volumen que el TAE pero este en  $\mu$ l. Dejamos un poco que baje la temperatura y depositamos en la cámara de electroforesis con el peine puesto y esperamos hasta que condense.

Una vez condensado el gel quitamos el peine para dejar expuestos los pocillos y colocamos el gel en el aparato de electroforesis que contiene en su cámara tampón TAE. A continuación, se cargan cada uno los pocillos del gel. La muestra a verter en cada pocillo está compuesta por 5  $\mu$ l de producto de PCR, 3  $\mu$ l de agua y 2  $\mu$ l de tampón de carga (10 $\mu$ l). Se añade un marcador de tamaño del DNA y un control negativo. Se pone en marcha la fuente de alimentación de la electroforesis a 120 voltios y dejamos correr esta entre 25 y 30 minutos. Una vez pasado este tiempo se procede a la lectura del gel visualizando la migración de las hebras de DNA amplificadas.

### 3.3.11. Reacción de purificación del DNA producto de PCR

Para la secuenciación se necesita que el DNA producto de PCR sea lo más puro posible. Esta reacción se hace con el fin de eliminar cualquier rastro de *Primers* y dNTPs (nucleótidos) presente en el producto de PCR con el fin de que no interfieran en los resultados de la secuenciación Sanger. Para ello se realiza una reacción enzimática ExoSAP (Tabla 10) para eliminar estas impurezas. La Exonucleasa I degrada los primers de PCR residuales mientras que la fosfatasa alcalina defosforila los dNTPs sobrantes.

**Tabla 10.** Componentes de la reacción ExoSAP

| Componente                                   | Volumen/Reacción ( $\mu$ l) |
|--|-----------------------------|
| PCR buffer 1X *                              | 1,13                        |
| Exonuclease I (Exo I)                        | 0,12                        |
| FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase | 0,25                        |
| Producto de PCR                              | <b>5</b>                    |
| <b>Total Volumen/Reacción</b>                | <b>6.5</b>                  |

Esta reacción comprende un solo ciclo de 30 minutos que se divide en dos partes: 1) 15 minutos a 37°C, 2) y 15 minutos a 85°C.

### 3.3.12. Reacción de secuenciación sanger

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del DNA y el uso de dideoxinucleótidos que sirven como terminadores de la reacción. En la reacción de secuenciación se utilizan dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos y se separan los fragmentos mediante una electroforesis capilar (Dorado, 2009). Primeramente, se realiza una reacción de secuenciación mediante el kit BigDye™ Terminador v3.1 (Tabla 11, 12 y 13).

**Tabla 11.** componentes de la reacción de secuenciación mediante el kit BigDye™ Terminador v3.1

| Componente                   | Volumen/Reacción (µl) |
|------------------------------|-----------------------|
| Big Dye terminator (Premix)  | 0,50                  |
| Buffer x5                    | 1,75                  |
| Agua                         | 5,92                  |
| Primer 10µM de secuenciación | 0,33                  |
| DNA PCR                      | 1,50                  |
| Volumen total                | 10,00                 |

**Tabla 12.** Primers de secuenciación

| Gen    | Nombre primer    | Exones secuenciados | Primer secuenciación | Secuencia 5' 3'             |
|--------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|
| URO5   | URO5_E6_E7.8     | 6, 7 y 8            | Forward              | TGCCCTATAAGGACGGCC          |
|        |                  |                     | Reverse              | CAGGATGAGACAGCTTCTCCG       |
|        | URO5_E7.8_E13.14 | 7, 8, 13 y 14       | Forward              | CAGTTTCTCGGAGAAGCTGTCTCA    |
|        |                  |                     | Reverse              | CCGATGGCCACGAACTTAATCT      |
|        | URO5_E13.14_E14  | 13 y 14             | Forward              | ATTGACCAGATTAAGTTCGTGGC     |
|        |                  |                     | Reverse              | TCCTTCACACACAGCAAACCTTATTAG |
| CHST12 | CHST12_E02       | 2                   | Forward              | TCATGGTCGTGCTCATCATCGT      |
|        |                  |                     | Reverse              | GGCTTGGGGTAGCCAAAGAGAA      |
| IKBKE  | IKBKE_E08        | 8                   | Reverse              | GGTCCTCCGTGAGAACATCCT       |
|        | IKBKE_E10        | 10                  | Reverse              | AGCAGGGAAGTCGGGTCACAGG      |
|        | IKBKE_E11.12.13  | 11, 12 y 13         | Reverse              | AAGAAGTGGGTGGAGGCAAGAC      |
| JAM3   | JAM3_E05         | 5                   | Forward              | TGGAGCCTCATTCTGAGAGTG       |
|        | JAM3_E07.08      | 7 y 8               | Forward              | TGATGTTCCAGGACGTGTTCCAG     |
| ST14   | ST14_E02.03      | 2 y 3               | Reverse              | GGCATCAGGGAGCAGAGAGGAG      |
|        | ST14_E16         | 16                  | Reverse              | GTGTGTGCCAACCTTCACTGCCA     |
|        | ST14_E10.11      | 10 y 11             | Reverse              | TAGTAGGTGCACAGCCCCGGAC      |
| MAN2B2 | MAN2B2_E7        | 7                   | Reverse              | AGACATGGAGAGAGGAACCCGCC     |
|        | MAN2B2_E8        | 8                   | Forward              | CACCCTGCCCTACATCCCCTCTG     |
|        | MAN2B2_11        | 11                  | Reverse              | TGGCCTAGACTCACACAACCAGG     |
|        | MAN2B2_13        | 13                  | Forward              | AGGCAGGAGGGAGTGAGCGAAAC     |

**Tabla 13.** Estructura del ciclo térmico de la reacción de secuenciación

|                         |           |      |      |      |   |
|-------------------------|-----------|------|------|------|---|
| <b>Temperatura °C</b>   | 96        | 96   | 50   | 60   | 4 |
| <b>Tiempo (min)</b>     | 1:00      | 0:10 | 0:05 | 4:00 | ∞ |
| <b>Numero de ciclos</b> | 25 ciclos |      |      |      |   |

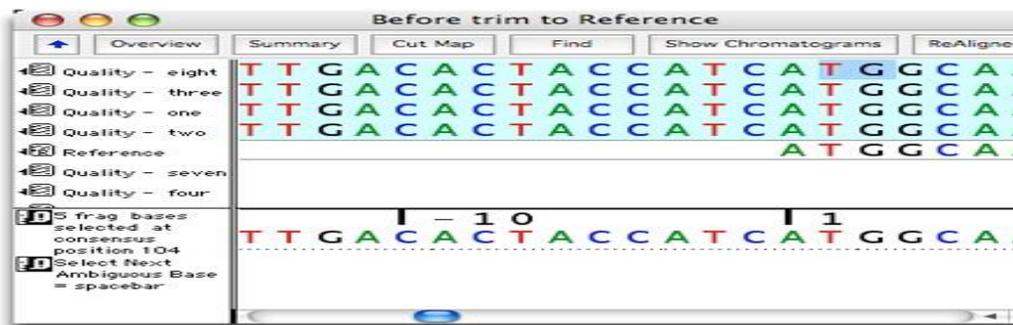
Posteriormente, se realizó una purificación por exclusión de tamaño mediante una placa de filtración SEQ de Millipore, con resina SEPHADEX con tres horas de hidratación previa. Esta placa una vez rellena con resina fue hidratada con 300 ul de agua miliQ durante el tiempo descrito anteriormente.

A continuación, la placa es centrifugada durante 2 minutos a 3400 RPM para eliminar el exceso de agua. Después la reacción de secuenciación es depositada en el punto medio del pocillo donde está la resina con pipeta y con la precaución de que la pipeta no toque la resina. Con este proceso se asegura que las sales o el etanol no afecten a los resultados finales de secuenciación.

La electroforesis y detección fluorescente se realizó en el servicio de secuenciación del CRAG y parte de las reacciones de secuenciación en MACROGEN.

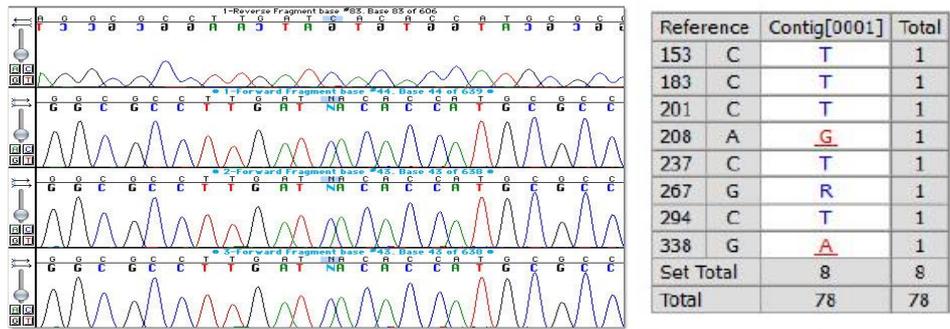
### 3.3.13. Alineamiento de secuencias y anotación de SNPs

Una vez entregadas las secuencias. Se alinearon mediante el software, SEQUENCHER 5.4.6 (Figura 11).



**Figura 11.** Ensamblaje de secuencias.

En esta alineación se utiliza una secuencia de referencia para cada gen o fragmento del gen. Y Se procedió a anotar la ubicación de los SNPs en relación a la secuencia de referencia (Figura 12).



**Figura 12.** Visualización de los electroferogramas de las secuencias y ubicación de los SNPs.

Luego estos polimorfismos se ubicaron en el genoma con la ayuda de la herramienta BLAST de Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) (Figura 13).

```

:      690  TTCGTGGCCATCGGCCCCACCCAGGCCCGCGCCCTGGCCGCAGGGCCTGCCCGTGAGC 749
          1  |||
14:135102160 TTCGTGGCCATCGGCCCCACCCAGGCCCGCGCCCTGGCCGCAGGGCCTGCCCGTGAGC 14:135102101

:      750  TGCACCGGGAGAGCCCCACGCCGCGAGCCCTGGCCCGGGCATCAGGACGGCGCTCCAG 809
          61  |||
14:135102100 TGCACCGGGAGAGCCCCACGCCGCGAGCCCTGGCCCGGGCATCAGGACGGCGCTCCAG 14:135102041

:      810  CCCCACAGATGCTGAGCCAGCTGCCCTGGGTCTTGCTGCTCCCCGGGGCCAGGCAGC 869
          121  |||
14:135102040 CCCCACAGATGCTGAGCCAGCTGCCCTGGGTCTTGCTGCTCCCCGGGGCCAGGCAGC 14:135101981

:      870  TGTGGTGCCTCCGGTGGGGCCAGGCCTCCGGCGGGGATCCAGGAAGCTGTCACCTCCT 929
          181  |||
14:135101980 TGTGGTGCCTCCGGTGGGGCCAGGCCTCCGGCGGGGATCCAGGAAGCTGTCACCTCCT 14:135101921

:      930  CACCCCTGCCTCCGCCCGGAGGGAGCCACCCGGACACCGGGGAGCTGCAGGGGACCCG 989
          241  |||
14:135101920 CACCCCTGCCTCCGCCCGGAGGGAGCCACCCGGACACCGGGGAGCTGCAGGGGACCCG 14:135101861

:      990  AGGCCAGCATCAGGCCACATGCACCTGCCCTGCCCTCCGAGAGGCAACTCGGACCTCG 1049
          301  |||
14:135101860 AGGCCAGCATCAGGCCACATGCACCTGCCCTGCCCTCCGAGAGGCAACTCGGACCTCG 14:135101801

:      1050 GCCGGCACTCAGGGCTCCTCTGGCAGCAGGAAGGAGATCAAATACAGTGCCTGGACACT 1109
          361  |||
14:135101800 GCCGGCACTCAGGGCTCCTCTGGCAGCAGGAAGGAGATCAAATACAGTGCCTGGACACT 14:135101741

```

**Figura 13.** Ubicación de los SNPs en el genoma del cerdo

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los genes candidatos analizados en este trabajo se seleccionaron a partir de los resultados de un estudio previo del grupo de investigación realizado por Crespo-Piazuelo et al., (2019), donde se identificaron regiones genómicas del cerdo asociadas con la composición de varios géneros bacterianos. La selección de los genes se hizo con base a su posición y su función biológica, analizando su efecto directo e indirecto sobre la microbiota intestinal y sustentado en una revisión bibliográfica (Tabla 14).

**Tabla 14.** Genes candidatos Seleccionados por genero bacteriano asociado

| <u>Gen Candidato</u> | <u>Cromosoma</u> | <u>Posición en pb</u><br><u>Inicio – final</u> | <u>SNP asociado</u>   | <u>Genero bacteriano asociado</u> |
|----------------------|------------------|--|-----------------------|-----------------------------------|
| CHST12               | 3                | 1,720,500-1,745,338                            | rs81335357;rs81246645 | Akkermansia                       |
| MAN2B2               | 8                | 4,137,035-4,181,195                            | rs326174858           | Prevotella                        |
| ST14                 | 9                | 56,888,246-56,929,767                          | rs81328676            | Phascolarctobacterium             |
| JAM3                 | 9                | 60,629,306-60,712,502                          | rs81344495            | Phascolarctobacterium             |
| IKBKE                | 9                | 67,123,265-67,147,992                          | rs81223434            | Phascolarctobacterium             |
| UROS                 | 14               | 135,101,609-135,131,072                        | rs337448241           | Streptococcus                     |

pb: pares de bases

Para estos genes seleccionados, fue amplificada y secuenciada sus zonas codificantes, en los exones de interés previamente seleccionado. Frente a la observación detallada de las secuencias realizadas, se anotaron una serie de polimorfismos (Tabla 15) ubicados en zonas exónicas e intrónicas de los genes de estudio. Se buscó detectar polimorfismos con frecuencias diferentes entre grupos de animales extremos (línea baja y alta) para el contenido y/o abundancia intestinal del género bacteriano previamente asociado con la región genómica donde se localiza el gen.

El gen *UROS* (*uroporfirinógeno III sintasa*) se relacionó con la abundancia *Streptococcus*. Este gen está involucrado en el metabolismo de una molécula llamada hemo (Tsai, Bishop, & Desnick, 1988). Este grupo hemo es vital para los mamíferos, pues de este se compone la hemoglobina que oxigena los órganos del cuerpo a través de la sangre (NIH, 2019). Es de importancia saber que, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus suis*, contienen proteínas de unión al grupo hemo en su pared celular (Wan, Zhang, Li, Chen, & Zhou, 2017) que contiene hemolisina y le otorga su naturaleza hemolítica (Edwards, Nizet, & Baker, 2011), que les permiten apropiarse del grupo hemo del huésped (Eichenbaum, Muller, Morse, & Scott, 1996; Franza et al., 2016; Morris, 2013; Wan et al., 2017). La función del gen uros podría modular la abundancia de *Streptococcus spp* por relación en el metabolismo del grupo hemo, componente vital para colonización de este género bacteriano.

En la visualización de las secuencias realizadas a este gen, se pudieron identificar dieciséis polimorfismos en un solo individuo (Tabla 15), de estos 4 determinan cambio de aminoácido: rs322990155 (E/K), rs322070016 (N/S),

rs337796413 (S/N), rs336102452 (R/G). uno no determina cambio de aminoácido: rs319487339, y los otros trece restantes son variantes de la región 3 prima UTR: rs321433339, rs326243317, rs343562413, rs324852383, rs332381689, rs705482583, rs705482583, rs343866398, rs343866398, rs330497989, rs80895682. Por tanto, esta información no es suficiente y concluyente para relacionar el efecto del gen *UROS* sobre la abundancia del genero bacteriano *Streptococcus spp.*

**Tabla 15. Polimorfismos de los genes candidatos de estudio**

| gen   | animal | línea       | Código ID    | Ubicación    | Ref | Cambio nucleotídico | Consecuencia de la variante | Cambio Aminoácido |
|-------|--------|-------------|--------------|--------------|-----|---------------------|-----------------------------|-------------------|
| UROS  | 97     | Low         | rs322990155  | 14:135115269 | G   | A/G                 | missense varian             | E/K               |
|       | 97     | Low         | rs322070016  | 14:135106256 | A   | G/A                 | missense varian             | N/S               |
|       | 97     | Low         | rs337796413  | 14:135105272 | G   | A/G                 | missense varian             | S/N               |
|       | 97     | Low         | rs319487339  | 14:135102119 | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 97     | Low         | rs336102452  | 14:135102034 | A   | G/A                 | missense varian             | R/G               |
|       | 97     | Low         | rs321433339  | 14:135102005 | C   | G/C                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs345258858  | 14:135101984 | G   | A/G                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs326243317  | 14:135101968 | G   | A/G                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs343562413  | 14:135101938 | A   | G/A                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs324852383  | 14:135101907 | C   | T/C                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs332381689  | 14:135101901 | G   | A/G                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs705482583  | 14:135101900 | A   | G/A                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
|       | 97     | Low         | rs343866398  | 14:135101871 | A   | G/A                 | 3 prime UTR variant         | -                 |
| 97    | Low    | rs330497989 | 14:135101740 | T            | C/T | 3 prime UTR variant | -                           |                   |
| 97    | Low    | rs80895682  | 14:135101677 | A            | G/A | 3 prime UTR variant | -                           |                   |
| JAM3  | 78     | Low         | -            | 9:60706524   | C   | T**                 | intron variant              | -                 |
|       | 184    | High        | -            | 9:60706569   | G   | C/G                 | intron variant              | -                 |
|       | 22     | High        | -            | 9:60706569   | G   | C/G                 | intron variant              | -                 |
|       | 22     | High        | -            | 9:60706769   | G   | T/G                 | missense varian             | G/V               |
|       | 124    | High        | -            | 9:60706769   | G   | T/G                 | missense varian             | G/V               |
|       | 95     | High        | -            | 9:60706769   | G   | T/G                 | missense varian             | G/V               |
|       | 172    | High        | -            | 9:60706769   | G   | T/G                 | missense varian             | G/V               |
|       | 58     | High        | -            | 9:60706769   | G   | T/G                 | missense varian             | G/V               |
|       | 273    | High        | -            | 9:60706769   | G   | T/G                 | missense varian             | G/V               |
| 184   | High   | -           | 9:60706769   | G            | T/G | missense varian     | G/V                         |                   |
| ST14  | 127    | Low         | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 78     | Low         | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 133    | Low         | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 165    | Low         | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 208    | High        | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 172    | High        | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 58     | High        | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
|       | 184    | High        | rs319985414  | 9:56920553   | G   | A/G                 | synonymous variant          | -                 |
| IKBKE | 78     | Low         | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 133    | Low         | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 40     | Low         | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 22     | High        | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 95     | High        | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 58     | High        | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 273    | High        | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |
|       | 184    | High        | rs707345016  | 9:67130917   | G   | A/G                 | missense varian             | K/N               |

\* Adhesión de un nucleótido, E: Acido Glutámico, K: Lisina, N: Aspargina, S: Serina, R: Arginina, G: Glicina, V: Valina.

En relación a *Phascolarctobacterium* se asociaron tres genes candidatos a la modulación homeostática de este género bacteriano. Esos genes corresponden a: *JAM3*, *ST14* y *IKBKE*, que proseguiremos a discutir y mostrar sus hallazgos en la investigación presente.

El gen *JAM3* (*Molécula de adhesión de unión 3*) participa en la morfología epitelial, y se concentra en las uniones estrechas para establecer la polaridad celular en las células epiteliales (Zhou, Tang, Zhang, & An, 2019). Estas uniones representan un modo de adhesión de célula a célula en láminas de células epiteliales o endoteliales, formando sellos continuos alrededor de las células y sirviendo como una barrera física para evitar que los solutos y el agua pasen libremente a través del espacio paracelular (Edelblum & Turner, 2015). La proteína codificada por *JAM3*, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, también media las interacciones leucocitos-plaquetas y participa en la regulación de la migración transepitelial de neutrófilos polimorfonucleares, dando a funcionalidad a *JAM3* en el sistema inmune (GeneCards, 2020; Miranda-ribera, Ennamorati, Serena, & Cetinbas, 2019).

*Phascolarctobacterium spp* es una bacteria mutualista (Del Dot, Osawa, & Stackebrandt, 1993), productora sustancial de ácidos grasos de cadena corta como acetato y propionato (Watanabe, Nagai, & Morotomi, 2012). También es especialista en la utilización de succinato producido por otras bacterias como los *bacteroidetes* (*Prevotella*) (Watanabe et al., 2012; Wu et al., 2017). El gen *JAM3* podría influenciar la abundancia de *Phascolarctobacterium spp* en la medida que este gen participa en la morfología epitelial intestinal compuesto por enterocitos, que estarían directamente relacionados con la absorción de ácidos grasos de cadena corta para incluirlos en sus diferentes vías metabólicas para el beneficio del huésped. Variantes genéticas de este gen pueden promover la proliferación de *Phascolarctobacterium* que se beneficia en una interacción biológica mutualista. Además, *JAM3* confiere un grado de permeabilidad que determina la respuesta inmune del hospedador, mediante la migración epitelial de células inmunitarias. Así *Phascolarctobacterium spp*, podría tener una determinada función comensal, modulando la respuesta inmune para promover indirectamente su propio beneficio y una flora microbiana benéfica en el TGI.

En la búsqueda de polimorfismos en *JAM3* en el presente trabajo (Tabla 15), se encontraron tres SNPs no anotados en Ensembl. El primero es un SNP del intron 4 para un solo individuo de la línea baja ubicado en posición 9:60706524, el segundo SNP, también del intron 4, para dos individuos en la posición 9:60706569. En ambos no está claro su papel sobre la microbiota intestinal. El tercer polimorfismo, es un SNP del exón 5. Este polimorfismo está en la posición 9:60706769 y determina cambio de aminoácido (G/V). Este es común para siete de los ocho animales de la línea alta para la abundancia del género bacteriano con el cual están asociados, que es *Phascolarctobacterium*. Por tanto, este SNP podría estar asociado con la composición de *Phascolarctobacterium* en la microbiota intestinal. Este polimorfismo es un buen candidato para explicar la modulación de la de la biología microbiana en el intestino del cerdo.

El gen *ST14* (supresor de tumorigenicidad 14) codifica matriptasa, una serina proteasa, que fortalece la barrera epitelial intestinal al promover la formación de

uniones estrechas (Scharschmidt et al., 2009). Un estudio en ratones evidenció que un defecto intrínseco en la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal producto de la falta de función de *ST14*, contribuye a una respuesta inmune inapropiada a la microbiota intestinal comensal o mutualista, puede llevar a enfermedad inflamatoria intestinal. Por este motivo en ratones Knock-out para el gen *ST14*, se ha postulado este gen como crítico en el TGI (Kosa, Szabo, Molinolo, & Bugge, 2011). También es de tenerse en cuenta que la matriptasa está involucrada en el metabolismo del hierro, asumiendo un papel directo en la oxigenación de los organismos por medio de la síntesis de hemoglobina y un efecto indirecto en la promoción del sistema inmune (Barrios, Delgado, & Ramirez, 2009; Rosolen, Eberle, Torres, & Musso, 2010; Toxqui et al., 2010). En relación a *Phascolarctobacterium*, al igual que el anterior gen, *ST14* estaría relacionado con la permeabilidad del epitelio intestinal. Con un efecto directo en la respuesta inmune al contacto con *Phascolarctobacterium*. Sumando al efecto pro inmune, la función de la matriptasa en el metabolismo del hierro. En el análisis de la secuencia de este gen, se encontró un polimorfismo anotado en Ensembl (rs319985414, synonymous variant), en el exón 16 (Tabla 15). que no determina un cambio de aminoácido y que es común para 4 animales de la línea baja y 4 animales de la línea alta para el género bacteriano asociado *Phascolarctobacterium*. Por tanto, no parece asociado al contenido de *Phascolarctobacterium*.

Los genes relacionados con el metabolismo del hierro, en este caso *UROS* y *ST14*, aunque están asociados para géneros bacterianos diferentes, juegan un papel muy importante en la respuesta inmune del huésped frente a la modulación de la microbiota intestinal. El déficit en el metabolismo del hierro puede provocar un aumento de células polimorfonucleares, eosinófilos, alteraciones del complejo monocitos/ macrófagos, citocinas, interleucinas, factor de necrosis tumoral, alteraciones linfocitarias (linfocitos B y T) y de las subpoblaciones linfocitarias, linfocitos CD3, CD4, CD8, CD19, etc (Rosolen et al., 2010). El descenso del número de células T (CD3), generalmente a causa de la reducción de linfocitos T colaboradores (CD4) (Barrios et al., 2009).

La deficiencia en el metabolismo del hierro afecta a la función leucocitaria, a través de la disfunción del sistema enzimático que contiene hierro (mieloperoxidasas) (Olivares & Walter, 2003). Se ha demostrado que las concentraciones bajas de hierro causan inhibición de las células T CD4 y aumento de la función de las células T supresoras (Toxqui et al., 2010). Estos postulados sugieren la importancia de los genes relacionados directa e indirectamente con el metabolismo del hierro. En nuestro caso el gen *UROS* y *ST14*, que son grandes protagonistas en la respuesta inmune reguladora de la microbiota intestinal del cerdo.

El control homeostático de la microbiota intestinal también puede ser explicado por la función de cada uno de los componentes de la barrera intestinal, tanto su

parte epitelial como su cubierta de mucina (Ohland & MacNaughton, 2010). Esta hipótesis proviene principalmente de investigaciones en ratones donde se ha inactivado el gen *MUC2* que codifica la mucina, que es el principal componente que protege el epitelio intestinal y que está en contacto directo con la microbiota, donde los ratones han presentado colitis mediada por la microbiota intestinal (Velcich et al., 2014).

El gen *IKBKE* (*inhibidor del factor nuclear kappa B quinasa subunidad épsilon*) (GeneCards, 2020), tiene un papel importante en el sistema inmune pues este inhibe la función de respuesta de las células T (Zhang et al., 2016). El mecanismo de acción de este gen es la inhibición de la activación por fosforilación del factor NFAT (factor nuclear de activación de células T) consecuentemente dificultando la respuesta de las células T, identificando a *IKBKE* como un regulador crucial negativo del sistema inmune (Crespo-Piazuelo et al., 2019). Este gen también tiene un papel muy importante con las citosinas inflamatorias como la interleucina 1 (IL-1). La pérdida de expresión y función de IL-1 aumenta la inmunidad antitumoral y la función de las células T (Zhang et al., 2016). Este gen también fosforila los factores reguladores de interferón (IRF), IRF3 e IRF7, así como DDX3X. Esta actividad permite la posterior homodimerización y translocación nuclear del IRF3 que conduce a la activación transcripcional de genes pro inflamatorios y antivirales, incluido IFN $\beta$ . *IKBKE* promueve varios complejos del sistema inmune diferentes cuya composición, interacción y acción depende del tipo de estímulo celular (GeneCards, 2020). Es en este caso donde este gen podría estar asociado con la composición de microbiota debido a su relación con el sistema inmune (Crespo-Piazuelo et al., 2019).

En humanos se ha reportado una relación de un gen de la familia de *IKBKE*. *IKBKAP* (*Inhibidor del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en células B, proteína asociada al complejo de quinasa*), y que está involucrado en la transducción de señales de citocinas proinflamatorias en la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Hughes et al., 2020). También reportándose la presencia de mutaciones que determinan un cambio de aminoácido en la proteína IKAP sintetizada por *IKBKAP*. Siendo estas mutaciones determinantes en la pérdida de función total o parcial de la proteína IKAP, afectado las vías de señalización proinflamatoria y la respuesta inmune del hospedador en la medida que IKAP tiene un profundo efecto en la transcripción de genes involucrados en la migración de células inmunes (Rubin & Anderson, 2017).

En *IKBKE* se encontró un solo polimorfismo. Este determina un cambio de aminoácido en la proteína y se encuentra en tres animales de la línea baja y cinco de la línea alta para la abundancia del género *Phascolarctobacterium*. Este SNP se encuentra anotado en Ensembl (rs707345016, missense\_variant) en el exón 8. Este cambio en la expresión de la proteína nos podría dar alguna respuesta al papel de *IKBKE* en la respuesta del sistema inmune, y así en la modulación de la microbiota intestinal y en especial de *Phascolarctobacterium*.

El gen *CHST12* (*Sulfotransferasa de carbohidratos 12*) está relacionado con el metabolismo de los glicosaminoglicanos (GeneCards, 2020; Zhou et al., 2016).

Los glicosaminoglicanos también se denominan mucopolisacáridos y a menudo se encuentran en la capa de mucina junto con los glicanos y el ácido siálico (Ouwkerk, De Vos, & Belzer, 2013). La especie más común del filo Verrucomicrobia que se encuentra en el intestino, *Akkermansia muciniphila*, coloniza la capa mucosa y es un gran degradador de mucina (Ottman, Geerlings, Aalvink, de Vos, & Belzer, 2017). Crespo-Piazuelo et al., (2019) reportó que la regulación de los genes del huésped relacionados con la biosíntesis de glicosaminoglicanos podría tener un efecto directo en la aparición de bacterias que degradan la mucina. La identificación de variantes genéticas del gen *CHST12* podría ayudar a seleccionar alguna variante genética que enriquezca la presencia de *Akkermansia muciniphila*, ya que esta especie microbiana es beneficiosa para el huésped al restaurar la función de barrera intestinal al ser degradador potencial de esta capa de mucina y al ayudar a reducir la obesidad en humanos (Everard et al., 2013).

El gen *MAN2B2* (*Alfa-manosidasa, Clase 2B, miembro 2*) codifica una proteína implicada en el metabolismo de los glicanos, componentes endógenos de la mucina y los glicosaminoglicanos y glicanos excretados de al tracto de origen alimentario (Koropatkin, Cameron, & Martens, 2012). Pero también se han relacionado variantes genéticas que en homocigosis determinan la falta de expresión de este gen y provocan inmunodeficiencia, anomalías en la glicosilación y afectaciones lisosómicas. Aunque estas anomalías fueron revertidas mediante la introducción en laboratorio de la variante no mutada del gen, observándose una mejora en la función de las células T CD8 y CD4 y natural killer y en la producción de inmunoglobulinas (Verheijen et al., 2020).

Por causa de la pandemia no se pudo completar la secuenciación de los genes *CHST12* y *MAN2B2*. Pero la búsqueda de variantes que interfieran en la importante función metabólica y en el sistema inmune de estos genes sería interesante para entender la biología funcional de estos genes. El metabolismo de los glicanos es de gran importancia para el sistema inmune en la medida que el producto de este metabolismo modifica muchas de las proteínas del sistema inmune (Lin, 2012). Los glicanos son importantes en el reconocimiento de las amenazas y en la intensidad y duración de la respuesta inmune (Desai, Seekatz, Koropatkin, Stappenbeck, & Martens, 2016; Koropatkin et al., 2012). Básicamente, los azúcares unidos a las proteínas controlan cuándo, cómo y durante cuánto tiempo el sistema inmunitario debe combatir una amenaza específica (Ouwkerk et al., 2013). En los pacientes con deficiencias en la glicosilación, el mecanismo que elabora las cadenas de azúcares que se unen a las proteínas y a las grasas es defectuoso, por lo tanto, la respuesta inmune puede estar alterada (Koropatkin et al., 2012; Verheijen et al., 2020). Crespo-Piazuelo et al., (2019) sugirió que las variaciones en genes involucrados en la degradación de los glicanos como los genes *CHST12* Y *MAN2B2* podría modular la presencia de *Prevotella spp* y *Akkermansia muciniphila*. Estos géneros bacterianos tienen una gran contribución a la degradación de la mucina y a los glicanos de origen vegetal. Este postulado nos da una idea clara de cómo hay una función benéfica conjunta entre los géneros bacterianos.

Con respecto a los estreptococos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*), estos crecen en medios ricos en glucosa (Franza et al., 2016). Y es aquí donde *Prevotella spp* y *Akkermancia spp* tiene un papel importante en la regulación conjunta de los estreptococos, pues estos son los mayores degradadores de estos azúcares disponibles. En esta actividad metabólica producen un ácido graso denominado succinato, cuyo principal especialista, degradador es *Phascolarctobacterium spp*, para la producción de ácidos grasos de cadena corta como acetato y propionato. y estos ser absorbidos por el huésped como fuente de energía metabólica.

En humanos, se ha reportado la relación entre la abundancia de *Bifidobacterium* y los SNP cerca del gen de la lactasa. Por ende, los individuos recesivos no persistentes de lactasa que toman leche no pueden descomponer la lactosa y, por lo tanto, *Bifidobacterium* prospera utilizando este azúcar disponible (Blekhman et al., 2015; Goodrich et al., 2016). Se ha asociado al igual mutaciones de pérdida de función génica o polimorfismos en genes que codifican interleucinas, receptores de interleucina, quimiocinas, receptores similares a los del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), receptores tipo Toll 4, receptores tipo intelectinas (moléculas bio-activas decisivas en la señalización y respuesta inflamatoria) y receptores de prostaglandinas en la colitis ulcerosa, para la enfermedad de Crohn (Kaser, Zeissig, & Blumberg, 2010; Saleh & Trinchieri, 2010).

Se ha descrito una lista de genes relacionados con enfermedades en humanos, como en la enfermedad inflamatoria intestinal como: *NOD2*, *CARD9*, *ATG16L1*, *IRGM* y *FUT2*, entre otros (Xavier & Podolsky, 2007). En este caso se encuentra el gen *FUT2* que juega un papel muy importante en la interacción célula-célula, incluida la interacción huésped-microbio (Rausch et al., 2011). El gen *FUT2* que codifica una enzima fucosiltransferasa-2 implicada en la producción de secreciones gastrointestinales y en la expresión de antígeno H (FuC-alfa ((1,2) Galbeta-) que se encuentra en la mucosa (McGovern et al., 2010). Se han descrito dos genotipos determinados por una mutación, uno funcional y otro no funcional del gen (McGovern et al., 2010; Rausch et al., 2017), el antígeno funcional tiene una influencia significativa en la modulación de la microbiota intestinal (Rausch et al., 2011)

En ratones, el gen *B4galnt2* que codifica la glicosiltransferasa ( $\beta$ -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2, es un precursor del antígeno CAD y determina la composición de azúcares de las secreciones intestinales. Su expresión en el intestino está fuertemente asociada a la composición de la microbiota intestinal en el ratón (Staubach et al., 2012). Hay genes del sistema inmunitario innato que son responsables del reconocimiento de microorganismos y activan la señalización celular. Otros genes codifican para receptores frente a microorganismos, como los Toll-like receptor (TLR), receptores similares como los NOD-like (Kieser & Kagan, 2017), y el gen MYD88 como un receptor que

modula la ruta de la señal transduccional de sistema inmune innato y adaptativo de la interleucina-1 y del TLR (Kostic et al., 2015; Kostic, Xavier, & Gevers, 2014; Wen et al., 2008). La señalización mediada por MyD88 en las células epiteliales intestinales es crucial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal y controla la expresión de la lectina antimicrobiana REG3G en el intestino delgado (Kostic et al., 2015).

Benson et al., (2010) localizo variaciones genéticas en regiones cromosómicas en humanos que determinan la variación composicional de microbioma del intestino en relación a *Coriobacteriaceae* y *Lactococcus*. Algunos genes en estas zonas están relacionados con la conformación de la barrera epitelial intestinal y con el sistema inmune, responsables de detectar bacterias gram-positivas como Irak3, Lyz1, Lyz2, IL-22, e IFN-gamma.

La mitad de las asociaciones son transgresivas, lo que significa que los heterocigotos para un *locus* genético particular puede tener valores anormalmente altos o bajos en un carácter, en comparación a los homocigotos (Wang et al., 2015). Esto puede sugerir una potencial interacción epistática, un modelo de incompatibilidad genética denominado Dobzhansky-Muller. Dándonos la ideas de como el microbioma da forma a la evolución del genoma de los huéspedes (Bordenstein & Theis, 2015; Brucker & Bordenstein, 2013).

En humanos se han identificado genes candidatos a la composición de la microbiota como son los genes *UBR3* asociado con *Rikenellaceae*, *CNTN6* asociado con *Faecalibacterium*, *DMRTB1* asociado con *Lachnospira* y *SALL3* asociado con *Eubacterium*. Todos estos genes están relacionados con la respuesta del sistema inmune, incluido el reconocimiento y la eliminación de patógenos, la *presentación* de antígenos y la activación del sistema inmune adaptativo (Jiang & Chen, 2012). Los polimorfismos de estos genes podrían desencadenar una modificación de la regulación inmune, lo que podría dar lugar a ciertas particularidades a nivel bacteriano que difieren en su presencia o abundancia entre los individuos (Turpin et al., 2016).

Crespo-Piazuelo et al., (2019) sugirieron 39 genes candidatos que pueden estar modulando la composición de la microbiota del cerdo. La mayoría de los genes candidatos encontrados codifican proteínas que están involucradas en el sistema de defensa del huésped. incluyendo el sistema inmune, barreras físicas como la capa de mucina o las uniones celulares, mientras que otras proteínas participan en el metabolismo de mucopolisacáridos o ácidos biliares. Estos resultados confirman la importancia de la genética del huésped en la modulación de la composición de microbiota.

Ramayo-caldas et al., (2020) encontraron SNPs significativos asociados con la composición y diversidad de la microbiota intestinal eucariota en cerdos. Los genes anotados para estos SNPs fueron: el gen de la Interleucina 23 (*IL23R*) que se asoció con la diversidad de hongos y los genes *PIK3C3* y *HNF4A* que se

asociaron con la abundancia de *Blastocystis spp*, también otros genes del sistema inmune fueron anotados como *TNF 9 (TNFRSF9)*, *IL12RB2* y el *PIK3CD*, así como genes relacionadas con vías de las cascadas inmunitarias como *CDH1*, *CDH11*, *CDH3*, *CDH5*, *LPAR3*, *PIK3C3*, *CCL17*, *CCL22*, *CDH5*, *CKLF* y *MMP15*. estos polimorfismos reportados, ubicados en desequilibrio de ligamiento y en genes relacionados con el sistema inmune. Sistema que puede modular la diversidad y composición de las comunidades intestinales eucariotas en cerdos.

Se han asociado variantes genéticas en humanos en el gen *IL23R* con diferente susceptibilidad a infecciones fúngicas (Carvalho et al., 2010) y en trabajos experimentales con ratones se evidencio que la deficiencia de *IL-23R* producía susceptibilidad a la infección sistémica por *Cándida albicans* (Nur et al., 2019). Además, se ha reportado que este gen está involucrado en la diversidad de la microbiota del íleon en humanos (Zakrzewski et al., 2019).

Finalmente, podemos decir que, existe una gran asociación entre la funcionalidad de los genes seleccionados con los géneros bacterianos con que se asociaron. A su vez es de importancia conocer las interacciones entre los microorganismos que componen la microbiota intestinal del cerdo para poder entender este enigma biológico de control y/o modulación de la microbiota intestinal. Se sugiere que estas interacciones pueden tener una función comensal y mutualista con respecto a la relación bacteria-bacteria y huésped-bacteria. En esta ultima interacción son los microorganismos que estimulan una expresión génica determinada. Muchos de estos genes que han sido seleccionados directamente en este estudio de asociación y relacionados con el metabolismo y con la conformación de barreras físicas, enmascaran un rol de gran importancia de regulación en la respuesta inmune del huésped para la modulación o el equilibrio homeostático de la microbiota intestinal.

## 5. CONCLUSIONES

1. En nuestra investigación se encontraron 16 polimorfismos para el gen *UROS* relacionado con la abundancia con *Streptococcus spp.* Estos no arrojan suficiente información al ser anotados en un solo animal de la línea baja. Algunos de estos codificando cambio de aminoácido, otro no codificando cambio de aminoácido y el resto anotados en la región 3 prima UTR.
2. Se anotaron tres polimorfismos, en tres genes diferentes asociados con un género bacteriano en común *Phascolarctobacterium*. El primero se localiza en el gen *JAM3* y segrega en la mayoría de animales de la línea alta y codificando cambio de aminoácido. El segundo en el gen *ST14*, un polimorfismo anotado en Ensembl que no codifica cambio de aminoácido y que se encuentra en igual número de animales de las diferentes líneas. El tercero en el gen *IKBKE* que determina un cambio aminoácido de la proteína. Este polimorfismo esta anotado en Ensembl, codificando cambio de aminoácido y se encuentra en mayor proporción en los animales de la línea alta.
3. El análisis funcional de los genes seleccionados en relación a los géneros bacterianos asociados sugiere que los polimorfismos de los genes *JAM3*, *ST14* y *IKBKE* podrían estar influenciando directa o indirectamente la regulación de la microbiota intestinal.

## 4. RECOMENDACIONES

- Para conocer un poco mejor la función y regulación biológica de la microbiota intestinal. Proponemos una búsqueda exhaustiva de variantes genéticas de los genes de estudio y demás analizar otros genes relacionados directa o indirectamente en sus rutas metabólicas y/o biológicas con los genes de estudio.
- Recomendamos hacer estudios de asociación de las variantes genéticas con la composición de la microbiota intestinal en un número elevado de animales para su validación genética.
- Es de importancia en futuras investigaciones estudiar detalladamente los mecanismos biológicos y moleculares mediante los cuales estas variantes genéticas afectan a la composición de la microbiota intestinal del cerdo.
- En futuros estudios es de gran relevancia ir más allá de genes candidatos, y asumir un rol de interacciones epistáticas entre estos. siendo este una alternativa para explicar de una manera más abstracta y precisa las estructuras genéticas de una asociación completa de la microbiota intestinal o con un microorganismo determinado. Y, además, es de importancia. abordar para cada uno de los genes de estudio, su vía biológica, metabólica y/o funcional para dar un sustento más completo a la asociación del genoma con la microbiota intestinal del cerdo.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Aluthge, N. D., van Sambeek, D. M., Carney-Hinkle, E. E., Li, Y. S., Fernando, S. C., & Burkey, T. E. (2019). The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health. *Journal of Animal Science*, 97(9), 3741–3757. <https://doi.org/10.1093/jas/skz208>
- Angelakis, E. (2017). Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*, 106, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002>
- Ashman, S., & Krishnamurthy, H. (2019). The gut microbiome. *Effects of Lifestyle on Men's Health*, 61–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816665-9.00004-4>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Barreiro, L. B., & Quintana-Murci, L. (2010). From evolutionary genetics to human immunology: How selection shapes host defence genes. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 17–30. <https://doi.org/10.1038/nrg2698>
- Barrios, M., Delgado, N., & Ramirez, P. (2009). Matriptasa 2: nuevo eslabón en el metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 25(3), 60484.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., ... Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 18933–18938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>
- Bikker, P., Dirkwager, A., Fledderus, J., Trevisi, P., Hue, I., & Awati, A. (2006). The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *American Society of Animal Science*, 84, 3337–3345. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-076>
- Blekhman, R., Goodrich, J. K., Huang, K., Sun, Q., Bukowski, R., Bell, J. T., ... Clark, A. G. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0759-1>
- Bonder, M. J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E. F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A. V., ... Zhernakova, A. (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature Genetics*, 48(11), 1407–1412. <https://doi.org/10.1038/ng.3663>
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology*, 13(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>

- Bowers, R. M., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Harmon-smith, M., Doud, D., Reddy, T. B. K., ... Perry, A. C. F. (2018). Corrigendum: Minimum information about a single amplified genome ( MISAG ) and a metagenome-assembled genome ( MIMAG ) of bacteria and archaea Corrigendum: Assisted reproductive technologies to prevent human mitochondrial disease transmission Corrigendum. *Nature Publishing Group*, 36(2), 196. <https://doi.org/10.1038/nbt0218-196a>
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2013). The hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science*, 341(6146), 667–669. <https://doi.org/10.1126/science.1240659>
- Camarinha-Silva, A., Maushammer, M., Wellmann, R., Vital, M., Preuss, S., & Bennewitz, J. (2017). Host genome influence on gut microbial composition and microbial prediction of complex traits in pigs. *Genetics*, 206(3), 1637–1644. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.200782>
- Cao, K. F., Zhang, H. H., Han, H. H., Song, Y., Bai, X. L., & Sun, H. (2016). Effect of dietary protein sources on the small intestine microbiome of weaned piglets based on high-throughput sequencing. *Letters in Applied Microbiology*, (2014). <https://doi.org/10.1111/lam.12559>
- Cao, Y., Liu, H., Qin, N., Ren, X., Zhu, B., & Xia, X. (2020). Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 99(November 2019), 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.006>
- Carvalho, A., Cunha, C., Di Ianni, M., Pitzurra, L., Aloisi, T., Falzetti, F., ... Romani, L. (2010). Prognostic significance of genetic variants in the IL-23/Th17 pathway for the outcome of T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 45(11), 1645–1652. <https://doi.org/10.1038/bmt.2010.28>
- Chen, C., Huang, X., Fang, S., Yang, H., He, M., Zhao, Y., & Huang, L. (2018). Contribution of Host Genetics to the Variation of Microbial Composition of Cecum Lumen and Feces in Pigs. *Frontiers in Microbiology*, 9(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02626>
- Corominas, J., Ramayo-Caldas, Y., Puig-Oliveras, A., Estellé, J., Castelló, A., Alves, E., ... Folch, J. M. (2013). Analysis of porcine adipose tissue transcriptome reveals differences in de novo fatty acid synthesis in pigs with divergent muscle fatty acid composition. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-843>
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Crespo-Piazuelo, D., Estellé, J., Revilla, M., Criado-Mesas, L., Ramayo-Caldas, Y., Óvilo, C., ... Folch, J. M. (2018). Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30932-6>

- Crespo-Piazuelo, D., Migura-Garcia, L., Estellé, J., Criado-Mesas, L., Revilla, M., Castelló, A., ... Folch, J. M. (2019). Association between the pig genome and its gut microbiota composition. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45066-6>
- De Rodas, B., Youmans, B., Danzeisen, J., Tran, H., & Johnson, T. (2018). Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. *Journal Animal Science*, 96, 1778–1794. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irx057/4711272>
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2016). Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Functional Foods: Sources, Health Effects and Future Perspectives*, (May), 143–207. <https://doi.org/10.1201/b15561-2>
- Del Dot, T., Osawa, R., & Stackebrandt, E. (1993). *Phascolarctobacterium faecium* gen. nov, spec. nov., a Novel Taxon of the Sporomusa Group of Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(3), 380–384. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80269-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80269-9)
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Stappenbeck, T. S., & Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, 1339–1353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>
- Dorado, G. (2009). Secuenciación del DNA. *Universidad de Córdoba*, pp. 1–35. Retrieved from [http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/47\\_SECUENCIACION\\_DNA.pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/47_SECUENCIACION_DNA.pdf)
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., ... Abdennebi-Najar, L. (2017). Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. *PloS One*, 12(1), e0169851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169851>
- Edelblum, K. L., & Turner, J. R. (2015). Epithelial Cells : Structure , Transport , and Barrier Function. In *Mucosal Immunology* (Fourth Edi, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00012-4>
- Edwards, M. S., Nizet, V., & Baker, C. J. (2011). Group B Streptococcal Infections. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* (7th ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00012-2>
- Eichenbaum, Z., Muller, E., Morse, S. A., & Scott, J. R. (1996). Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus. *Infection and Immunity*, 64(12), 5428–5429. <https://doi.org/10.1128/iai.64.12.5428-5429.1996>
- Estellé, J., & Mach, N. (2014). The influence of host's genetics on the gut microbiota composition in pigs and its links with immunity traits. *10th World Congress on ...*, (August), 2–4. Retrieved from [https://www.asas.org/docs/default-source/wcgalp-proceedings-oral/358\\_paper\\_9784\\_manuscript\\_952\\_0.pdf?sfvrsn=2](https://www.asas.org/docs/default-source/wcgalp-proceedings-oral/358_paper_9784_manuscript_952_0.pdf?sfvrsn=2)
- Estellé, J., Mach, N., Ramayo-Caldas, Y., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., ... Rogel-Gaillard, C. (2017). Host genetics influences gut microbiota composition in pigs. In *36th International Society for Animal Genetics Conference*. Retrieved from

[https://www.isag.us/2017/docs/ISAG2017\\_Proceedings.pdf](https://www.isag.us/2017/docs/ISAG2017_Proceedings.pdf)

- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., ... Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(22), 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>
- Fouhse, J. M., Zijlstra, R. T., & Willing, B. P. (2016). The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*, *6*(3), 30–36. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0031>
- Franza, T., Delavenne, E., Derré-Bobillot, A., Juillard, V., Boulay, M., Demey, E., ... Gaudu, P. (2016). A partial metabolic pathway enables Group B *Streptococcus* to overcome quinone deficiency in a host bacterial community. *Molecular Microbiology*, *81*–91. <https://doi.org/10.1002/mmi.13447>
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). International Journal of Food Microbiology Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, *141*, S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- GeneCards. (2020a). CHST12 Gene. *CHST12 Gene - GeneCards | CHSTC Protein | CHSTC Antibody*. Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHST12>
- GeneCards. (2020b). *Gen IKBKE (Inhibidor Del Factor Nuclear Kappa B Quinasa Subunidad Epsilon)* (pp. 2–8). pp. 2–8. Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IKBKE>
- GeneCards. (2020c). *Gene JAM3*. Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAM3>
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., ... Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Microbiology*, *3*(September), 733–739. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1236>
- González, E., Carrapiso, A. I., Noguera, J. L., Ibáñez-Escriche, N., & Tejeda, J. F. (2018). Efecto de la genética y de la dieta sobre el lomo fresco del cerdo Ibérico (m. *Longissimus dorsi*). *Archivos de Zootecnia*, *2018*(March 2019), 185–187. <https://doi.org/10.21071/az.v67iSupplement.3234>
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2017). The Relationship Between the Human Genome and Microbiome Comes into View. *Annual Review of Genetics*, *51*(1), 413–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155532>
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Waters, J. L., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2016). Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. *Science*, *352*(6285), 532–535. <https://doi.org/10.1126/science.aad9379>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., ... Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*,

159(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>

- Han, G. G., Lee, J. Y., Jin, G. D., Park, J., Choi, Y. H., Kang, S. K., ... Choi, Y. J. (2018). Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24508-7>
- Heo, J. M., Agyekum, A. K., Yin, Y. L., Rideout, T. C., & Nyachoti, C. M. (2014). Feeding a diet containing resistant potato starch influences gastrointestinal tract traits and growth performance of weaned pigs 1. *Journal of Animal Science*, 3906–3913. <https://doi.org/10.2527/jas2013-7289>
- Hinkle, E. E. (2012). The effect of dam parity on progeny growth performance, passive immunity, and gastrointestinal microbiota (University of Nebraska). Retrieved from [https://search.proquest.com/docview/1238238819?accountid=26646%0Ahttp://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url\\_ver=Z39.88-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&genre=dissertations+%26+theses&sid=ProQ:ProQuest+Dissertations+%26+Theses+Globa](https://search.proquest.com/docview/1238238819?accountid=26646%0Ahttp://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&genre=dissertations+%26+theses&sid=ProQ:ProQuest+Dissertations+%26+Theses+Globa)
- Hooper, L., Littmann, D., & Macpherson, A. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, (June), 1268–1274.
- Hov, J. R., Zhong, H., Qin, B., Anmarkrud, J. A., Holm, K., Franke, A., ... Karlsen, T. H. (2015). The influence of the autoimmunity-associated ancestral HLA haplotype AH8.1 on the human gut microbiota: A cross-sectional study. *PLoS ONE*, 10(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133804>
- Hughes, D. A., Bacigalupe, R., Wang, J., Rühlemann, M. C., Tito, R. Y., Falony, G., ... Raes, J. (2020). Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0743-8>
- Hussey, S., & Bergman, M. (2014). The Gut Microbiota and Effects on Metabolism. In *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.02009-8>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Invitrogen. (2019). *TRIzol™ Reagent*.
- IRTA. (2010). *Informacion Sectorial del porcino* (pp. 6–9). pp. 6–9. Retrieved from [https://www.agronoms.cat/media/upload/editora\\_24/INFORMACION\\_SECTORIAL\\_editora\\_241\\_150.pdf](https://www.agronoms.cat/media/upload/editora_24/INFORMACION_SECTORIAL_editora_241_150.pdf)
- Ishiguro, E., Haskey, N., & Campbell, K. (2018). Genetic and Environmental Influences on Gut Microbiota. *Gut Microbiota*, 91–104. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810541-2.00005-1>
- Jaramillo, A. (2012). Evaluation of a prebiotic and an organic acid-supplemented diets on the performance and allometric parameters of broiler chickens with

- controlled feeding. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 47–51.
- Jiang, X., & Chen, Z. J. (2012). The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nature Reviews Immunology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nri3111>
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 321–335. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
- Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 28, 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>
- Kau, A. L., Philip, P., Nicholas, W., Goodman, A. L., & Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474. <https://doi.org/10.1038/nature10213>
- Kieser, K. J., & Kagan, J. C. (2017). Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 376–390. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.25>
- Kinsella, R. J., Kähäri, A., Haider, S., Zamora, J., Proctor, G., Spudich, G., ... Flicek, P. (2011). Ensembl BioMarts: A hub for data retrieval across taxonomic space. *Database*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1093/database/bar030>
- Klingspor, S., Martens, H., Çaushi, D., Twardziok, S., Aschenbach, J. R., & Lodemann, U. (2013). Characterization of the effects of *Enterococcus faecium* on intestinal epithelial transport properties in piglets. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1707–1718. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5648>
- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., ... De Vos, W. M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1191–1199. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x>
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5), 323–335. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Kosa, P., Szabo, R., Molinolo, A. A., & Bugge, T. H. (2011). Suppression of Tumorigenicity-14 , encoding matriptase , is a critical suppressor of colitis and colitis-associated colon carcinogenesis. *Oncogene*, 31(32), 3679–3695. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.545>
- Kostic, A. D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Hämäläinen, A. M., ... Xavier, R. J. (2015). The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host and Microbe*, 17(2), 260–273. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.001>
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6), 1489–1499. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>

- Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Babak, V., Cejkova, D., Montagne, L., Le-Floc'h, N., & Rychlik, I. (2018). Effects of host genetics and environmental conditions on fecal microbiota composition of pigs. *PLoS ONE*, *13*(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201901>
- Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Fu, J., & Zhernakova, A. (2017). Host Genetics and Gut Microbiome : Challenges and Perspectives. *Trends in Immunology*, *xx*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.06.003>
- Lähteinen, T., Malinen, E., Koort, J. M. K., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., ... Palva, A. (2010). Probiotic properties of Lactobacillus isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe*, *16*(3), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.002>
- Lahti, L., Salojärvi, J., Salonen, A., Scheffer, M., & De Vos, W. M. (2014). Tipping elements in the human intestinal ecosystem. *Nature Communications*, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5344>
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., & Møller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: The pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(2), 673–690. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.673-690.2002>
- Lin, G. (2012). *Elucidación de nuevos O- glicanos mucínicos de la capa laminar de Echinococcus granulosus* (Universidad de la Republica). Retrieved from <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/256bb21ff635c41dd661cc4c759f2532.pdf>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, *489*(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Mach, N., Berri, M., Estellé, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., ... Lepage, P. (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports*, *7*(3), 554–569. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12285>
- Madeira, F., Park, young mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., ... Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(April), 636–641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- MAPA. (2019). *El Sector de la Carne Porcina en Cifras* (p. 114). p. 114. Retrieved from [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomico/ssectorporcinoano2018\\_tcm30-379728.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomico/ssectorporcinoano2018_tcm30-379728.pdf)
- Martínez, A., Mena, M., Herrera, A., & Martínez, P. (2010). Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista Latinoamericana de Química*, *52*(March), 21–44.
- Mcdonnell, M. J., Bouwhuis, M. A., Sweeney, T., Shea, C. J. O., & Doherty, J. V. O. (2016). Effects of dietary supplementation of galactooligosaccharides and seaweed-derived polysaccharides on an experimental Salmonella

- Typhimurium challenge in pigs. *Journal Animal Science*, 94, 153–156. <https://doi.org/10.2527/jas2015-9779>
- McGovern, D. P. B., Jones, M. R., Taylor, K. D., Marciante, K., Yan, X., Dubinsky, M., ... Rotter, J. I. (2010). Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(17), 3468–3476. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq248>
- Metzler-zebeli, B. U., Hooda, S., Pieper, R., Zijlstra, R. T., Kessel, A. G. Van, Mosenthin, R., & Ga, M. G. (2010). Nonstarch Polysaccharides Modulate Bacterial Microbiota, Pathways for Butyrate Production, and Abundance of Pathogenic Escherichia coli in the Pig Gastrointestinal Tract □ †. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3692–3701. <https://doi.org/10.1128/AEM.00257-10>
- Miranda-ribera, A., Ennamorati, M., Serena, G., & Cetinbas, M. (2019). *Exploiting the Zonulin Mouse Model to Establish the Role of Primary Impaired Gut Barrier Function on Microbiota Composition and Immune Profiles*. 10(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02233>
- Moeller, A. H., Li, Y., Ngole, E. M., Ahuka-Mundeke, S., Lonsdorf, E. V., Pusey, A. E., ... Ochman, H. (2014). Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 16431–16435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419136111>
- Molist, F., Manzanilla, E. G., Pérez, J. F., & Nyachoti, C. M. (2012). Coarse, but not finely ground, dietary fibre increases intestinal Firmicutes:Bacteroidetes ratio and reduces diarrhoea induced by experimental infection in piglets. *British Journal of Nutrition*, 108(1), 9–15. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005216>
- Molist, F., Segura, A. G. De, Gasa, J., Hermes, R. G., & Manzanilla, E. G. (2009). Effects of the insoluble and soluble dietary fibre on the physicochemical properties of digesta and the microbial activity in early weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology Journal*, 149, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.06.015>
- Morris, J. G. (2013). Streptococcal Disease. In *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 223–227). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416041-5.00013-5>
- Muñoz, M., Rodríguez, M. C., Alves, E., Folch, J. M., Ibañez-Escriche, N., Silió, L., & Fernández, A. I. (2013). Genome-wide analysis of porcine backfat and intramuscular fat fatty acid composition using high-density genotyping and expression data. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-845>
- Neefjes, J., Jongasma, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nri3084>
- Neuman, H., & Koren, O. (2016). The Gut Microbiome. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20083-7>

- NIH. (2019). *UROS gene* (p. a-4). p. a-4.
- Nishida, A. (2016). Rates of Gut Microbiome Divergence in Mammals. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Novembre, J., & Han, E. (2012). Human population structure and the adaptive response to pathogen-induced selection pressures. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1590), 878–886. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0305>
- Nur, S., Sparber, F., Lemberg, C., Guiducci, E., Schweizer, T. A., Zwicky, P., ... LeibundGut-Landmann, S. (2019). IL-23 supports host defense against systemic *Candida albicans* infection by ensuring myeloid cell survival. *PLoS Pathogens*, 15(12), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008115>
- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C. H., Ndjango, J. B. N., Peeters, M., Hahn, B. H., & Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000546>
- Ohland, C. L., & MacNaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009>
- Olivares, M., & Walter, T. (2003). consecuencias de la deficiencia de hierro. *Revista Chilena de Nutrición*, 3(5), 1–8.
- Org, E., Parks, B. W., Joo, J. W. J., Emert, B., Schwartzman, W., Kang, E. Y., ... Lusic, A. J. (2015). Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Research*, 25(10), 1558–1569. <https://doi.org/10.1101/gr.194118.115>
- Ottman, N., Geerlings, S. Y., Aalvink, S., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2017). Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 31(6), 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.10.001>
- Ouwerkerk, J. P., De Vos, W. M., & Belzer, C. (2013). Glycobiome: Bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 27(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.001>
- Pace, N. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, 276(734). <https://doi.org/10.1126/science.276.5313.734>
- Pérez-Enciso, M., Clop, A., Noguera, J. L., Óvilo, C., Coll, A., Folch, J. M., ... Sánchez, A. (2000). A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from an Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science*, 78(10), 2525–2531. <https://doi.org/10.2527/2000.78102525x>
- Pérez, A. M. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). *Repositorio Institucional de La Universitat Politècnica de València*, 10. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción en cadena de](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción%20en%20cadena%20de)

- Petri, D., Hill, J. E., & Van Kessel, A. G. (2010). Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. *Livestock Science*, *133*(1–3), 107–109. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.037>
- Prugnotte, F., Manica, A., Charpentier, M., Guégan, J. F., Guernier, V., & Balloux, F. (2005). Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology*, *15*(11), 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.050>
- Puig-Oliveras, A., Ballester, M., Corominas, J., Revilla, M., Estellé, J., Fernández, A. I., ... Folch, J. M. (2014). A co-association network analysis of the genetic determination of pig conformation, growth and fatness. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114862>
- Puig-Oliveras, A., Revilla, M., Castelló, A., Fernández, A. I., Folch, J. M., & Ballester, M. (2016). Expression-based GWAS identifies variants, gene interactions and key regulators affecting intramuscular fatty acid content and composition in porcine meat. *Scientific Reports*, *6*(August), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep31803>
- Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Esteve-Codina, A., Corominas, J., Castelló, A., Ballester, M., ... Folch, J. M. (2012). Liver transcriptome profile in pigs with extreme phenotypes of intramuscular fatty acid composition. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-547>
- Ramayo-caldas, Y., Mach, N., Lepage, P., Levenez, F., Denis, C., Lemonnier, G., ... Estellé, J. (2016). Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *Nature Publishing Group*, 1–5. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.77>
- Ramayo-caldas, Y., Prenafeta-boldú, F., Zingaretti, L. M., Gonzalez-rodriguez, O., Dalmau, A., Quintanilla, R., & Ballester, M. (2020). Gut eukaryotic communities in pigs : diversity , composition and host genetics contribution. *Animal Microbiome*, *4*, 1–12.
- Rausch, P., Künzel, S., Suwandi, A., Grassl, G. A., Rosenstiel, P., & Baines, J. F. (2017). Multigenerational influences of the Fut2 gene on the dynamics of the gut microbiota in mice. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00991>
- Rausch, P., Rehman, A., Künzel, S., Häsler, R., Ott, S. J., Schreiber, S., ... Baines, J. F. (2011). Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(47), 19030–19035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106408108>
- Rosolen, G., Eberle, E., Torres, F., & Musso. (2010). Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro. *Hematología*, *14*, 48–57.
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., ... Wijmenga, C. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature Publishing Group*, *555*(7695), 210–215. <https://doi.org/10.1038/nature25973>

- Rubin, B. Y., & Anderson, S. L. (2017). IKBKAP/ELP1 gene mutations: Mechanisms of familial dysautonomia and gene-targeting therapies. *Application of Clinical Genetics*, 10, 95–103. <https://doi.org/10.2147/TACG.S129638>
- Saleh, M., & Trinchieri, G. (2010). Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nature Publishing Group*, 11(1), 9–20. <https://doi.org/10.1038/nri2891>
- Sangwan, N., Xia, F., & Gilbert, J. A. (2016). Recovering complete and draft population genomes from metagenome datasets. *Microbiome*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0154-5>
- Scharek-Tedin, L., Pieper, R., Vahjen, W., Tedin, K., Neumann, K., & Zentek, J. (2013). *Bacillus cereus* var. *toyoi* modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhea in piglets challenged with salmonella typhimurium DT104. *Journal of Animal Science*, 91(12), 5696–5704. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6382>
- Scharek, L., Guth, J., Filter, M., & Schmidt, M. F. G. (2007). Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 61(4), 223–234. <https://doi.org/10.1080/17450390701431540>
- Scharschmidt, T. C., List, K., Grice, E. A., & Szabo, R. (2009). Matriptase-Deficient Mice Exhibit Ichthyotic Skin with a Selective Shift in Skin Microbiota. *Investigative Dermatology*, (May 2014), 1–8. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.104>
- Schmidt, B., Mulder, I. E., Musk, C. C., Aminov, R. I., Lewis, M., Stokes, C. R., ... Kelly, D. (2011). Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028284>
- Schokker, D., Zhang, J., Zhang, L. L., Vastenhouw, S. A., Heilig, H. G. H. J., Smidt, H., ... Smits, M. A. (2014). Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100040>
- Segre, J. (2020). Metagenomica. Retrieved from National Human Genome Research Institute (NHGRI) website: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Metagenomica>
- Serra, J. (2016). Microbiota intestinal. *Atencion Primaria*, 48(6), 345–346. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2016.04.003>
- Serrano, P., Cembrero, P., Gomez, E., & Leinez, M. (2007). Microbiota gastrointestinal y utilización de probióticos en lechones en transición. *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.CITA Segorbe(Castello). Anaporc*, 30–41. Retrieved from [https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:yYXzLrsMT9MJ:https://www.archivo-anaporc.com/app/download/7235466511/40\\_NUTRICION1.pdf%3Ft%3D1](https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:yYXzLrsMT9MJ:https://www.archivo-anaporc.com/app/download/7235466511/40_NUTRICION1.pdf%3Ft%3D1)

524587072+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx

- Siegwald, L., & Brüssow, H. (2019). Gut microbiota and healthy aging. In *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.62168-2>
- Sim, N. L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), 452–457. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
- Smit, A., & Hubley, R. (2020). *RepeatMasker Web Server. Current Version: open-4.0.9*. Retrieved from <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>
- Somma, M. (2019). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- Spor, A., Koren, O., & Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(4), 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2540>
- Staubach, F., Künzel, S., Baines, A. C., Yee, A., McGee, B. M., Bäckhed, F., ... Johnsen, J. M. (2012). Expression of the blood-group-related glycosyltransferase B4galnt2 influences the intestinal microbiota in mice. *ISME Journal*, *6*(7), 1345–1355. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.204>
- Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Wiser, A. H., Press, M. O., Langford, K. W., ... Watson, M. (2018). Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nature Communications*, *9*(870), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03317-6>
- Suárez, R. A., Fandiño, L. C., & Rondón, I. S. (2018). Evaluación del perfil metabólico lipídico en cerdas suplementadas con *Lactobacillus casei* durante un ciclo reproductivo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *29*(4), 1278. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14358>
- Sun, Y., Su, Y., & Zhu, W. (2016). Microbiome-Metabolome Responses in the Cecum and Colon of Pig to a High Resistant Starch Diet. *Frontiers in Microbiology*, *7*(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00779>
- Sun, Y., Zhou, L., Fang, L., Su, Y., & Zhu, W. (2015). Responses in colonic microbial community and gene expression of pigs to a long-term high resistant starch diet. *Frontiers in Microbiology*, *6*(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00877>
- Surana, N. K., & Kasper, D. L. (2017). Moving beyond microbiome-wide associations to causal microbe identification. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nature25019>
- Tejeda, J. F., Carrapiso, A. I., Noguera, J. L., Ibáñez-Escriche, N., & González, E. (2018). Efecto de la línea genética y de dietas enriquecidas en ácido oleico sobre los parámetros productivos del cerdo Ibérico. *Archivos de Zootecnia*, *2018*(March 2019), 41–43.

<https://doi.org/10.21071/az.v67iSupplement.3203>

- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., & Vaquero, M. P. (2010). Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, 25(3), 350–365. <https://doi.org/10.3305/nh.2010.25.3.4583>
- Tsai, S. F., Bishop, D. F., & Desnick, R. J. (1988). Human uroporphyrinogen III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(19), 7049–7053. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7049>
- Tully, B. J., Graham, E. D., & Heidelberg, J. F. (2018). Data Descriptor: The reconstruction of 2,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans. *Nature*, 1–8.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(October). <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Turpin, W., Espin-Garcia, O., Xu, W., Silverberg, M. S., Kevans, D., Smith, M. I., ... Croitoru, K. (2016). Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nature Genetics*, 48(11), 1413–1417. <https://doi.org/10.1038/ng.3693>
- USAL. (2019). *PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS* (pp. 2–7). pp. 2–7. salamnxa: BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III.
- Uzabay, T. (2019). Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies. *Current Opinion in Pharmacology*, 49, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.016>
- Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., & Kang, D. K. (2014). In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 485–497. <https://doi.org/10.1111/jam.12539>
- Velcich, A., Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Kucherlapati, R., Lipkin, M., & Yang, K. (2014). Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. *Science*, 326(5912), 1069–1074. <https://doi.org/10.1126/science.1253394>
- Verheijen, J., Wong, S. Y., Rowe, J. H., Raymond, K., Stoddard, J., Delmonte, O. M., ... Morava, E. (2020). Defining a new immune deficiency syndrome: MAN2B2-CDG. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(3), 1008–1011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.016>
- Waldor, M. K., Tyson, G., Borenstein, E., Ochman, H., Moeller, A., Finlay, B. B., ... Nelson, K. E. (2015). Where Next for Microbiome Research? *PLOS BIOLOGY*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002050>
- Wan, Y., Zhang, S., Li, L., Chen, H., & Zhou, R. (2017). Characterization of a novel streptococcal heme-binding protein SntA and its interaction with host antioxidant protein AOP2. *Microbial Pathogenesis*, 111, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.018>

- Wang, J., Chen, L., Zhao, N., Xu, X., Xu, Y., & Zhu, B. (2018). Of genes and microbes: solving the intricacies in host genomes. *Protein & Cell*, 16. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0532-9>
- Wang, J., Kalyan, S., Steck, N., Turner, L. M., Harr, B., Künzel, S., ... Baines, J. F. (2015). Analysis of intestinal microbiota in hybrid house mice reveals evolutionary divergence in a vertebrate hologenome. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7440>
- Wang, J., Thingholm, L. B., Skiecevičie, J., Rausch, P., Kummen, M., Hov, J. R., ... Franke, A. (2016). Genome-wide association analysis identifies variation in Vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nature Genetics*, 48(11), 1396–1406. <https://doi.org/10.1038/ng.3695>
- Wang, M., & Donovan, S. M. (2015). Human microbiota-associated swine: Current progress and future opportunities. *ILAR Journal*, 56(1), 63–73. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv006>
- Wang, X., Tang, B., Luo, X., Ke, C., Huang, M., You, W., & Wang, Y. (2020). Effects of temperature, diet and genotype-induced variations on the gut microbiota of abalone. *Aquaculture*, 524(March), 735269. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735269>
- Watanabe, Y., Nagai, F., & Morotomi, M. (2012). Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. Nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 511–518. <https://doi.org/10.1128/AEM.06035-11>
- Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C., ... Chervonsky, A. V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455(7216), 1109–1113. <https://doi.org/10.1038/nature07336>
- Wu, F., Guo, X., Zhang, J., Zhang, M., Ou, Z., & Peng, Y. (2017). *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(4), 3122–3126. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4878>
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
- Xiao, L., Estellé, J., Kiilerich, P., Ramayo-caldas, Y., Xia, Z., Feng, Q., ... Wang, J. (2016). A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology*, (September), 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.161>
- Yang, H., Huang, X., Fang, S., He, M., & Zhao, Y. (2017). Unraveling the Fecal Microbiota and Metagenomic Functional Capacity Associated with Feed Efficiency in Pigs. *Frontiers in Microbiology*, 8(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01555>
- Yang, H., Xiang, Y., Robinson, K., Wang, J., Zhang, G., Zhao, J., & Xiao, Y. (2018). Gut Microbiota Is a Major Contributor to Adiposity in Pigs. *Frontiers*

in *Microbiology*, 9(December), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03045>

- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zakrzewski, M., Simms, L. A., Brown, A., Appleyard, M., Irwin, J., Waddell, N., & Radford-Smith, G. L. (2019). IL23R-Protective Coding Variant Promotes Beneficial Bacteria and Diversity in the Ileal Microbiome in Healthy Individuals Without Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13(4), 451–461. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy188>
- Zhang, J., Feng, H., Zhao, J., Akbari, O., Tibbetts, S. A., Zhang, J., ... Akbari, O. (2016). IκB Kinase ε Is an NFATc1 Kinase that Inhibits T Cell Article I κ B Kinase ε Is an NFATc1 Kinase that Inhibits T Cell Immune Response. *Cell Reports*, 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.083>
- Zhao, L., Nicholson, J. K., Lu, A., Wang, Z., Tang, H., Holmes, E., ... Lindon, J. C. (2012). Targeting the Human Genome – Microbiome Axis for Drug Discovery: Inspirations from Global Systems Biology and Traditional Chinese Medicine. *Journal of Proteome Research*, 11, 3509–3519.
- Zhao, P. Y., Wang, J. P., & Kim, I. H. (2013). Evaluation of dietary fructan supplementation on growth performance , nutrient digestibility , meat quality , fecal microbial flora , and fecal noxious gas emission in finishing pigs. *Journal Animal Science*, 91, 5280–5286. <https://doi.org/10.2527/jas2012-5393>
- Zhou, D., Tang, W., Zhang, Y., & An, H.-X. (2019). JAM3 functions as a novel tumor suppressor and is inactivated by DNA methylation in colorectal cancer. *Cancer Management and Research*, 11, 2457–2470.
- Zhou, H., Li, Y., Song, X., Zhao, Y., Cheng, L., Zhao, L., & Jia, L. (2016). CHST11/13 Regulate the Metastasis and Chemosensitivity of Human Hepatocellular Carcinoma Cells Via Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(7), 1972–1985. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4114-5>
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>