

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE
CON MENCIÓN EN
PRODUCCIÓN Y BIENESTAR ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DEL CIEGO EN
CUYES (*Cavia porcellus*) DE LAS RAZAS INTI, PERÚ Y
ANDINA, CHACHAPOYAS-2021**

Autor:

M.Sc. Hugo Frias Torres

Asesor:

Dr. Rainer Marco López Lapa

Registro (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA () / DOCTORADO (X) EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): FRIAS TORRES HUGO
DNI N°: 33960796
Correo electrónico: hugo.frias@untrm.edu.pe
Nombre de la Maestría () / Doctorado (X): CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Nombre de la Maestría () / Doctorado () : _____

2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro () / Doctor (X)

"CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DEL CIEGO EN CUYES (Cavia porcellus) DE LAS ZONAS INTI, PERÚ y ANAIMA, CHOCHAPUYAS - 2023"

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: LOPEZ LARA RAÍNER MARCO
DNI, Pasaporte, C.E.N°: 81229580
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>)
0000-0002-2879-5138

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: _____
DNI, Pasaporte, C.E.N°: _____
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>)

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
1.05.00 -- BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la Licencia creative commons de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación -RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 26 / 04 / 2023

Firma del autor 1

Firma del autor 2

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón este trabajo a mi familia, en especial a mis hijos, esposa y padres; quienes contribuyeron en forjar este anhelo de muchos años el cual permitió acceder a otro nivel en la formación profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a dios en primer lugar, a mi familia como motor y motivo para mi formación profesional; seguidamente a todos los profesores de la Escuela de postgrado de la universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, por las enseñanzas y paciencia en mi formación profesional, al Instituto de Ganadería y Biotecnología (IGBI) y sobre todo al personal de que laboran en los laboratorios de Fisiología Molecular y LABISAN.

Gracias totales a mi asesor Dr. Rainer, Diego, Jhon, Victor y todo el personal de la estación experimental de Chachapoyas/UNTRM, por su inmenso apoyo, sin ustedes no hubiera sido posible.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA
Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES
Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA
Vicerrectora de Investigación

Dr. Manuelito Efraín Castro Alayo
Director de la Escuela de Posgrado

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR ()

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM () / Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DEL CIEGO EN CUYES (Cavia porcellus) DE LAS ZONAS INTI, PERÚ y AWOIMA, CHACHAPOYAS - 2021" cuyo autor HUGO FRIAS TORRES es estudiante del ciclo/egresado (x) de la Escuela de Posgrado, Maestría () / Doctorado (x) en CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE con correo electrónico institucional hugo.frias@untrm.edu.pe

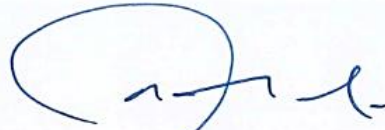
El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 24 de ENERO de 2023

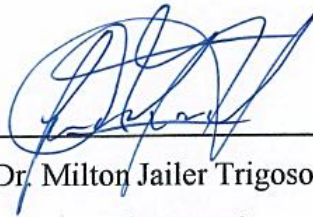

Firma y nombre completo del Asesor



JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dr. Héctor Vladimir Vásquez Pérez
Presidente



Dr. Milton Jailer Trigos Yalta
Secretario



Dr. Rail Rabanal Oyarce
Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 6-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR (X)

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Caracterización del microbioma del ciego en cuyes (Cavia porcellus)
de las razas Inti, Perú y Andina, Chachapoyas-2021

presentada por el estudiante () / egresado (X) _____

de la Escuela de Posgrado, Maestría () / Doctorado (X) en Ciencias para el
desarrollo sustentable - Mención en producción y bienestar animal

con correo electrónico institucional hugo.frias@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 12 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene — % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 26 de ENERO del 2023

[Signature]
SECRETARIO

[Signature]
PRESIDENTE

[Signature]
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR (X)

En la ciudad de Chachapoyas, el día 15 de diciembre del año 2022, siendo las 11:00 horas, el aspirante Hugo Frías Torres, Asesorado por Dr. Rainer Marco López Lapa, defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DEL CIEGO EN CUYES (Cavia porcellus) DE LAS RAZAS INIL, PERÚ Y ANDINA CHACHAPOYAS - 2021, para obtener el Grado Académico de Maestro () / Doctor (X) en CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Héctor Vladimiro Vázquez Pérez

Secretario: Milton Saúl Trigos Yalta

Vocal: Raúl Pabonal Oyarce

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis de Maestría () / Doctorado (X), en términos de:

Aprobado (X) por Unanimidad () / Mayoría ()

Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 13:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro () / Doctor (X).

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

ÍNDICE

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Ubicación	28
2.1.01. Ubicación Territorial.....	28
2.1.02. Ubicación geográfica y características climáticas	29
2.2. Métodos.....	29
2.2.1. Colecta de muestra.....	29
2.2.2. Análisis bromatológico de la ración alimentaria	30
2.2.3. Extracción de ADN de mucosa de ciego de cuy.....	31

2.2.4. Cuantificación de ADN	32
2.2.5. Reactivos para la amplificación de ADN (PCR)	32
2.2.6. Amplificación de la región 16S	32
2.2.7. Electroforesis	33
2.2.8. Purificación de ADN	33
2.2.9. Secado de ADN	34
2.2.10. Secuenciamiento	34
2.2.11. Diseño experimental	34
2.2.12. Análisis bioinformático.....	37
III. RESULTADOS	40
3.1. Caracterización metagenómica de las bacterias de la mucosa del ciego en (<i>Cavia porcellus</i>) de las razas Inti, Perú y Andina	40
3.1.01. Parámetros de calidad de muestras de ADN extraídas de mucosa de ciego de cuy	40
3.1.02. Composición del microbiota de mucosa de ciego de cuy	40
3.1.03. Identificación de la composición bacteriana.....	43
3.2. Comparar características del perfil microbiano encontrado en el ciego entre las tres razas de cuyes	49
3.3. Diversidad alfa	49
3.4. Diversidad beta	52
3.5. Identificar microorganismos con potencial biológico (probiótico) como alternativa a la mejora de la producción sostenible de <i>Cavia porcellus</i> en la región Amazonas.....	55
3.6. Caracterización de microorganismos asociados a la mejora de digestión y absorción de nutrientes con impacto en el peso y salud de cuyes.....	57
IV. DISCUSIÓN	58
V. CONCLUSIONES	66

VI. RECOMENDACIONES	67
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis Bromatológico de Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), en base seca	31
Tabla 2. Análisis Bromatológico de concentrado	31
Tabla 3. Primers para la amplificación del gen 16S ARNr	32
Tabla 4. Cuadro de distribución de grupos por tratamiento de análisis.....	35
Tabla 5. Muestra el análisis de calidad de lecturas o reads producidas por el secuenciamiento.	41
Tabla 6. Valores estadísticos de los índices de Shannon para los grupos raza y tratamiento.	50
Tabla 7. Valores estadísticos del PERMANOVA por pares para los grupos razas y tratamiento.	52
Tabla 8. Propuesta de géneros y especies bacterianas con potencial probiótico.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cuyes de las razas Perú, Andina e Inti	18
Figura 2. Mapa de ubicación de la Estación Experimental de Chachapoyas, UNTRM – Amazonas	28
Figura 3. Programa en el termociclador de acuerdo a la especificación del primer para gen 16S rRNA	33
Figura 4. Etapas desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos de la tesis.....	36
Figura 5. Flujo de trabajo del análisis bioinformático modificado de Bolyen <i>et al.</i> , 2019.....	39
Figura 6. Secuencias por segmentos para lecturas del forward-R1 (A) y reverse – R2 (B). ..	42
Figura 7. Porcentaje de frecuencias de la composición bacteriana separados por raza.	44
Figura 8. Porcentaje de frecuencias de la composición bacteriana distribuido en Phylum separados por tratamiento. AL (alimentado) y AY (ayuno).....	45
Figura 9. Composición bacteriana distribuido en Phylum separados por raza y tratamiento. AL (alimentado) y AY (ayuno).	46
Figura 10. Composición bacteriana distribuida en géneros por raza y tratamiento. AL (alimentado) y AY (ayuno).	47
Figura 11. Composición bacteriana distribuido por especies separados por raza (A) y tratamiento (B), resaltando las especies de mayor importancia.	48
Figura 12. Diversidad alfa de las muestras de mucosa de ciego de cuy basado en el índice de Shannon, agrupado en raza (A) y tratamiento (B).	51
Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de similaridad de Bray-Curtis para las muestras del ciego de cuy entre las razas: AND (Andino), INT (Inti) y P (Perú).	53
Figura 14. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de similaridad de Bray-Curtis para las muestras del ciego de cuy entre los tratamientos: AL (alimentado) y AY (ayuno).	54
Figura 15. Clasificación taxonómica y abundancia de microorganismos presentes en la muestra RA4.....	57

RESUMEN

El cuy (*Cavia porcellus*) es un roedor de alta importancia económica y nutricional con creciente demanda y poca oferta en el mercado nacional. Existiendo una escasa aplicación de biotecnologías que incrementen eficiencia de producción y mejoramiento en la calidad cárnica. La fisiología digestiva de fermentación bacteriana post-gástrica que ocurre dentro del ciego, donde existe un consorcio bacteriano (el microbioma) especializado en la degradación de fibra, asociado a la absorción de nutrientes. El microbioma tiene un papel importante propia de cada raza asociado a su fenotipo, en ese contexto. El objetivo de este estudio fue caracterizar el microbioma de ciego de cuyes de las razas Inti, Perú y Andina mediante metagenómica para identificar posibles microorganismos asociados a la degradación y absorción de nutrientes. Fueron diseñados dos tratamientos de acuerdo a la raza y el suministro de alimento previo al sacrificio (animales con ayuno de 24 horas y sin ayuno). Así mismo se realizó el secuenciamiento de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S ARNr al cual se aplicó un análisis bioinformático mediante el paquete QIIME2-2022.2. Encontrando más de 180 secuencias por muestra, de las cuales el 58.37% pertenecían al Phylum Firmicutes y el 27.99% al Phylum Bacteroidetes. No se encontraron diferencias en la composición bacteriana entre las 3 razas estudiadas, sin embargo, se vio que el ayuno por 24 horas tiene un efecto en la diversidad microbiana. En consecuencia, el ciego de cuy está dominado por bacterias pertenecientes a los Phylum (Firmicutes y Bacteroidetes), y a nivel de género (*Ruminococcus*, *Prevotella* y *Fibrobacter*) y especies (*Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii*, *Prevotella ruminicola* y *Fibrobacter succinogenes*), dichas bacterias implicadas en la degradación de la fibra, candidatos potenciales para usó como probióticos en la producción sostenible del cuy.

Palabras clave: metagenómica, 16S ARNr, secuenciamiento, bioinformática

ABSTRACT

The guinea pig (*Cavia porcellus*) is a rodent of high economic importance, whose digestive physiology makes it an interesting animal model for the study of post-gastric bacterial fermentation that occurs inside the cecum. This process involves a bacterial consortium (the microbiome) specialized in fiber degradation. Due to the physiological and genetic characteristics of the lines of this species, it is possible to find variations in the microbiome. The objective of this study was to characterize the cecum microbiome of guinea pigs from the Inti, Perú and Andina lines by metagenomics. Groups were established according to the line and the feed supply prior to slaughter (animals fasted for 24 hours and without fasting). The V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene were sequenced and bioinformatic analysis was performed using the QIIME2-2022.2 package. More than 180 sequences per sample were found, of which 58.37% belonged to the Firmicutes phylum and 27.99% to the Bacteroidetes phylum. No differences were found in the bacterial composition between the 3 lines studied, however, it was seen that fasting for 24 hours has an effect on microbial diversity. This study concludes that the guinea pig cecum is dominated by bacteria belonging to the Firmicutes and Bacteroidetes phyla, and at the genus level, various bacteria involved in fiber degradation and potential candidates for use as probiotics in the sustainable production of guinea pig have been found.

Keywords: *Cavia porcellus*, cecum, microbiome, metagenomics, 16S rRNA

I. INTRODUCCIÓN

El cuy, cobayo o también conocido como conejillo de indias (*Cavia porcellus*) es un pequeño roedor doméstico nativo de los andes Sudamericanos. Gracias a su carácter dócil, esta especie de roedor se puede encontrar alrededor del mundo y goza de gran popularidad como mascota, siendo además una especie usada comúnmente como modelo animal para estudios en investigación científica (Sachser *et al.*, 2007). El cuy se caracteriza por ser un animal crepuscular, herbívoro, con cuerpo robusto, cuello y extremidades cortas, y sin cola (o una vestigial) (Hargaden & Singer, 2012). Mientras que filogenéticamente esta especie pertenece a la familia Caviidae y guarda un mayor parentesco con la chinchilla y el puercoespín, que con los ratones y las ratas (North, 1999).

En nuestro país el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) mediante la implementación de programas de mejoramiento genético logró obtener 3 razas de cuy con alta productividad: Perú, Andina e Inti. La raza Perú se caracteriza por ser precoz y alcanzar la madurez sexual en un menor tiempo, y está destinada a los cruces terminales. La raza Andina, por su parte, es prolífica, llegando a tener 13.6 crías por año. De igual forma, la raza Inti es criada por su fertilidad (Chauca *et al.*, 2005; Chauca *et al.*, 2004).

La raza Perú se formó a través de un programa de selección de 34 generaciones, y se caracteriza por tener una conformación cárnica, alcanzar 1 kg de peso a los 56 días de edad, ser eficiente convertidor de alimento con conversión alimenticia (CA) de 3.01 y con rendimiento de carcasa de 72%. La raza Andina fue formada mediante selección masal, a través de 35 generaciones, hacia la característica de prolífica en una población (cerrada), teniendo en cuenta el número de crías logradas por parto, esta raza presenta mayor tamaño de camada al nacimiento y destete, mayor frecuencia de presentación de celo posparto y menor intervalo entre partos. La raza Inti fue formada en 43 generaciones mediante un índice que involucra el peso tomado a la edad de comercialización y el número de crías de procedencia del individuo,

ponderando la camada con un coeficiente conformado por la relación de las desviaciones estándar de ambas características (Chauca *et al.*, 2005) (**Figura 1**).

Figura 1. Cuyes de las razas Perú, Andina e Inti



(Ataucusi, 2015).

A nivel mundial nuestro país ocupa el primer lugar como productor y consumidor de carne de cuy, siendo la región andina catalogada como núcleo de las Unidades Domésticas Familiares (UDF), desempeñando funciones trascendentales con beneficios agroecológicos y sociales, ha sido fuente de alimento e ingresos económicos para el poblador andino desde la conquista hasta la actualidad (Chauca 1997; Cajas, 2008).

Mientras que los mamíferos de rumen como las vacas y las ovejas, tienen un tracto digestivo largo o un sistema de re-masticación de la dieta para digerir, el cuy es un herbívoro monogástrico, es decir, es una especie que se caracteriza por tener un estómago simple (sin compartimentos) de poca capacidad de almacenamiento; que se alimenta principalmente de pasto o heno de timothy, avena, trigo, pastos, praderas y/o rey gras (Sakaguchi *et al.*, 1992). Este roedor tiene un tiempo de tránsito intestinal de aproximadamente 20 horas y un tiempo de vaciamiento gástrico de 2 horas (Jilge, 1980). Debido al metabolismo rápido de este animal, no toda la fibra vegetal es aprovechada y, por lo tanto, es común observar la práctica de la cecotrofia, mediante este proceso digestivo los cuyes (que cuenta con un tracto digestivo relativamente corto) obtienen vitaminas (como la vitamina B) y proteínas (reutilización del nitrógeno) mediante la ingesta de cecótrofos (heces blandas) (Hardagen & Singer, 2012). En la anatomía digestiva de esta especie se destaca la presencia de un ciego funcional, donde se da la fermentación por actividad bacteriana y es la porción del

intestino donde se da inicio la digestión enzimática; los herbívoros monogástricos como el cuy dependen de la fermentación bacteriana para cubrir el 30 a 40% sus necesidades energéticas (Tsukahara & Ushida, 2000). El consumo de grandes cantidades de polímeros vegetales sugiere que su microbioma gastrointestinal genera enzimas (hemi) celulolíticas y que los microorganismos correspondientes pueden ser útiles para aplicaciones biotecnológicas (Ayudthaya *et al.*, 2019). De hecho, los polisacáridos encontrados en la fibra vegetal son fermentados por la microbiota del ciego intestinal para descomponerla principalmente en ácidos grasos de cadena corta, los cuales son una fuente primaria de energía (Tsukahara & Ushida, 2000). Por esta particular anatomía y fisiología gastrointestinal y los microorganismos que se encuentran en el ciego intestinal, esta especie es considerada como un fermentador post-gástrico (Guacho, 2009).

La microbiota es el consorcio o comunidad microbiana que hace referencia al conjunto de microorganismos que coexisten en un tiempo determinado, y que a su vez está formado por diversas poblaciones o agrupaciones que interactúan entre ellas y su hospedero (Cruz-Leyva *et al.*, 2015). Mientras que el metagenoma es la colección de genomas y genes de las especies que conforman un microbiota (Marchesi & Ravel, 2015). En cuanto al término “microbioma”, Lederberg & McCray (2001) lo definen como una comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patogénicos que comparten un nicho específico dentro de los humanos. Esta comunidad de microorganismos interactúa sinérgicamente entre sus miembros y con sus organismos hospederos e incluye aspectos temporales, espaciales, funcionales, genéticos y evolutivos (Berg *et al.*, 2020). Actualmente, el microbioma hace alusión al conjunto total de los genomas de los microorganismos correspondientes a la microbiota que se desarrolla dentro y sobre la superficie de humanos, animales y plantas; y que mediante su interacción desempeñan un papel protagónico en la fisiología y el desarrollo de enfermedades de sus hospederos (Schulfer & Blaser, 2015; Blaser *et al.*, 2014).

La microflora de especies animales es de gran complejidad, se estima que el número de células microbianas, particularmente las bacterianas, supera 10 veces la cantidad

de células somáticas, y este número aumenta considerablemente cuando se compara el número de genes totales del microbioma y su hospedero (100-150 veces) (Bahrndorff *et al.*, 2016). Dada la abundancia de la microbiota, es entendible que este sea vital en la supervivencia y fisiología de organismos eucariotas multicelulares desde humanos hasta invertebrados. Por ejemplo, metazoos simples como las esponjas de mar necesitan de la asociación simbiótica con comunidades bacterianas para llevar a cabo procesos de fijación de CO₂, producción de metabolitos secundarios y la conversión de materia orgánica (Thomas *et al.*, 2016). En general, los consorcios bacterianos son importantes en la homeostasis, metabolismo y fisiología de un sin número de especies animales (Munoz-Benavent *et al.*, 2021).

Si bien los microorganismos han colonizado gran parte de los nichos ecológicos de sus hospederos como la piel, cavidad oral, tracto reproductor, pulmones, entre otros; el microbioma gastrointestinal es el más importante por su diversificación y abundancia (Heil *et al.*, 2019). El microbioma gastrointestinal cumple diversas funciones relacionadas al comportamiento, sistema nervioso, sistema inmunológico y procesos digestivos (Bosco & Noti, 2021); además la diversidad microbiana varía de acuerdo al segmento del tracto evaluado, especies e, incluso, entre individuos de una misma especie (Ye *et al.*, 2021). A diferencia del genoma constante del hospedero, el microbioma es dinámico y su composición es susceptible a cambios constantes consecuencia del propio desarrollo del organismo hospedero y factores ambientales como el tipo de dieta o uso de antibióticos y probióticos (Amon & Sanderson, 2017).

Los microorganismos que se alojan en las superficies del tracto gastrointestinal cumplen funciones beneficiosas tales como la síntesis de vitaminas y moléculas que funcionan como fuente de energía (Ej. ácidos grasos), así como la degradación de componentes recalcitrantes o de difícil digestión. En animales de ganado, las bacterias anaerobias obligadas o facultativas son las que se encuentran en mayor abundancia (lactobacilos, estreptococos, eubacterias, entre otras) en el tracto intestinal, sin embargo, es importante señalar que cada especie animal se caracteriza por tener una

comunidad bacteriana única, la cual varía en abundancia y diversidad según la región del tracto digestivo, e incluso entre individuos de una misma especie o raza (Rosmini *et al.*, 2004). Para el estudio de las bacterias presentes en el sistema digestivo, su función e interacción con su hospedero y entre estas (su ecología) se han desarrollado técnicas de cultivo anaerobios que permite caracterizar entre un 10 a un 50% del ecosistema bacteriano. A pesar de ello, estas fracciones de bacterias cultivables representa la minoría del total de bacterias del tracto gastrointestinal, por lo cual, el desarrollo de técnicas independientes de cultivo como la identificación de la diversidad de secuencias del gen 16S ARNr y su análisis mediante metagenómica permite alcanzar una mayor cobertura de las comunidades bacterianas en mamíferos (Zoetendal *et al.*, 2004).

A diferencia de los animales carnívoros y omnívoros, la dieta de los herbívoros consiste en alimentos con alto contenido de celulosa y lignina, los cuales solo son capaces de digerirlos a través de la fermentación llevada a cabo por los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal. La necesidad de llevar a cabo este tipo de proceso digestivo se debe a que más del 50% de la energía se encuentra resguardada como carbohidratos complejos cuya degradación en su totalidad es imposible por la falta de enzimas digestivas capaces de romper estas moléculas recalcitrantes (Dearing & Kohl, 2017). Por esta razón, ciertas regiones del sistema digestivo de los herbívoros están adaptadas, especialmente, para llevar a cabo la fermentación microbiana. Mientras que en los rumiantes esta fermentación ocurre en el intestino anterior, en animales herbívoros monogástricos esto se da en el ciego intestinal. Justamente, esta clasificación dentro de los animales herbívoros también refleja una marcada diferencia en la microbiota (Bomba *et al.*, 2006).

En rumiantes, el rumen se considera una cámara de fermentación microbiana ya que ofrece las condiciones óptimas para que se de este proceso efectivamente: temperatura estable, constante suministro de alimento y un pH entre 6.2 a 6.8 (Bryant, 1959). Ya que el rumen cumple una función fundamental en la digestión de la fibra, este está dotado de un microbioma de alta complejidad, el cual consiste en un 95% en

especies bacterianas y se estima que al menos existen 5000 especies microbianas en el sistema digestivo de los rumiantes; cifras muy por encima de los valores encontrados en carnívoros y omnívoros (alrededor de 1464) (Cholewińska *et al.*, 2020). De esta gran cantidad de bacterias, la gran mayoría pertenece a los Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, y Fibrobacters, y en menor medida Tenericutes y Actinobacteria (Khafipour *et al.*, 2009). La microbiota de rumiantes se especializa en la hidrólisis de la celulosa para la producción de ácidos grasos volátiles y vitaminas y síntesis de aminoácidos. De acuerdo, al tipo de sustrato que las bacterianas son capaces de degradar se pueden clasificar en: 1) celulolíticas: *Fibrobacter succinogenes*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*. ; 2) hemicelulolíticas: *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium xylanophilum*, *Eubacterium uniformis*; 3) amilolíticas: *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*; 4) sacarolíticas: *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium ruminale* y 5) proteolíticas: *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Clostridium bifermentans* (Choudhury *et al.*, 2015; Bomba *et al.*, 2006). El proceso de fermentación depende del trabajo coordinado de estas especies microbianas y también se pueden dividir de acuerdo al papel que desempeñan durante este proceso: a) fermentadoras primarias: especies bacterianas capaces de degradar la celulosa y otros carbohidratos complejos en ácidos grasos volátiles que puedan ser usados por el hospedero como fuente de energía; b) fermentadores secundarios: estos degradan los ácidos grasos volátiles en subproductos como el acetato, hidrógeno, metano y dióxido de carbono (compuestos requeridos por los fermentadores primarios); y c) bacterias proteolíticas: producen nitrógeno indispensable para el trabajo de los fermentadores primarios (Dearing & Kohl, 2017).

Por su parte, los herbívoros monogástricos presentan una mayor complejidad microbiológica en el ciego intestinal, el cual suele presentar un mayor tamaño pues aquí ocurren los procesos de fermentación bacteriana. Sin embargo, en comparación a los rumiantes existe una menor cantidad de estudios metagenómicos relacionados al microbioma. En caballos, por ejemplo, al igual que en otros animales existe una

mayor riqueza microbiológica en el colón (de aproximadamente 10^{15} células), y la gran mayoría reside en el ciego intestinal por el papel de este órgano en la digestión del forraje (Kauter *et al.*, 2019). El 20 al 59% de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal pertenece al grupo de los Firmicutes; y dentro de estos grupos filogenéticos destacan los géneros Ruminococcaceae, Fibrobacteraceae y Clostridium por su actividad fibrolítica y celulolítica (Kauter *et al.*, 2019). Específicamente en el ciego intestinal, los filos Firmicutes y Bacteroidetes son las más comunes (como se espera de regiones donde ocurre fermentación bacteriana), y a nivel de género se describe a *Prevotella*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Treponema*, *Eubacterium*, *Butyrivibrio*, *Alistipes* y *Desulfovibrio* como los más frecuentes dentro de la microflora microbiana de esta porción del tracto gastrointestinal (Aleman *et al.*, 2022). Otra especie representativa de animales herbívoros monogástricos, es el conejo. Los Phylum predominantes en esta especie son Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, y Tenericutes (representan al menos el 99% del perfil microbiano en conejo) (Fang *et al.*, 2020). A nivel de género, 16 de los 19 géneros bacterianos más comunes pertenecen al grupo de los Firmicutes (Ye *et al.*, 2021). Al igual que en otros animales, la presencia de miembros del Phylum Firmicutes (con una abundancia relativa entre el 60 y 70%) está relacionada a la degradación de la fibra (Zhu *et al.*, 2015).

Un aspecto importante a señalar, es que, si bien existen ciertos perfiles microbianos “core” en cada especie, se ha descrito diferencias significativas entre razas e individuos, a raíz de características fisiológicas o genéticas inherentes de cada individuo o raza. Ye *et al.* (2021) describen que la diferencia en la producción de ácidos grasos de cadena corta producto de la fermentación bacteriana de dos razas de conejos productores de carne tiene un efecto en el microbioma en diferentes niveles taxonómicos, especialmente de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Mientras que, en rumiantes, el estudio metagenómico en 3 razas de ganado vacuno (Angus, Charolais, Kinsella) reveló que el 50% de los taxas microbianos estaban influenciados por la raza, los que incluían 8 Phylum, 55 géneros y 10 especies bacterianas; posiblemente diferencias en la producción de saliva, tamaño del rumen

y hábitos alimenticios propios de cada raza explican la divergencia en el perfil microbiano dentro de una misma especie (Li *et al.*, 2019).

Dado el evidente crecimiento en la producción de cuy, es necesario que se mejore también la eficiencia productiva. Por las particularidades de la anatomía gastrointestinal de esta especie, el mejoramiento de la productividad se puede realizar a través de estrategias que involucren la regulación de la disponibilidad y la utilización de los componentes nutricionales en el tracto digestivo (Puente *et al.*, 2019). El primer paso a considerar en el avance de biotecnologías orientadas al estudio de la nutrición animal es realizar la caracterización del microbioma gastrointestinal. Hasta la actualidad se ha realizado de forma exitosa la caracterización con métodos moleculares de la microflora bacteriana en diversos animales domésticos como perros (Herstad *et al.*, 2017), conejos (Linaje *et al.*, 2004), ganado bovino (Tajima *et al.*, 1999); pero aún son pocos los estudios de caracterización de la población bacteriana existente en el tracto gastrointestinal de cuy. El hecho de que los cuyes consuman grandes cantidades de polímeros vegetales sugiere que cuentan con gran microbioma gastrointestinal especializado, el cual lo convierte en un modelo útil para estudiar la producción de ácidos orgánicos, como acetato, lactato y succinato. Los estudios comparativos de metagenoma han demostrado que los Phylum bacterianos más abundantes en el intestino del cuy son los Bacteroidetes y Firmicutes, además que la diversidad en la microbiota intestinal del cuy es mucho mayor a la del ser humano y su identificación tiene un grado de dificultad (Hildebrand *et al.*, 2012). La investigación de la diversidad microbiana y la producción de ácidos orgánicos utilizando muestras fecales de cuy podría ser fundamental para revelar el mecanismo de digestión de la fibra en este animal y conducir al descubrimiento de nuevas bacterias que son capaces de degradar la celulosa u otros componentes en ácidos orgánicos valiosos (Palakawong *et al.*, 2017).

Porturas *et al.* (2011) como posible alternativa al uso de antibióticos, mediante un método molecular realizó el aislamiento e identificación de géneros de poblaciones bacterianas con potencial probiótico presente en el tracto intestinal del cuy. El 85.18%

de las bacterias que lograron identificar pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*; y el 14.81% restante correspondió a géneros de bacterias gram (+).

Mediante un análisis comparativo de los metagenomas intestinales que se encuentran en el cuy y los humanos (*Homo sapiens*), realizaron la identificación de los genes microbianos con su respectiva afiliación Phylumgenética, revelando en promedio una abundancia genética de 353833 reads para cuyes en el microbioma fecal, y 402831 reads por muestra fecal de humanos. En ambos casos la composición de la microbiota intestinal muestra una mayor proporción de los Phylum *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, sin embargo, a nivel de género, 320 de 376 muestran niveles de abundancia diferentes en ambos hospedadores. En el cuy hubo una mayor presencia de la bacteria *Akkermansia*, responsable de la degradación de la mucina, y la arquea metanogénica *Methanobrevibacter* (también presente en humanos), las categorías funcionales del microbioma en los cuyes tienen menor abundancia que en los humanos (Hildebrand *et al.*, 2012).

Crowley *et al.* (2017), al realizar la comparación de la población microbiana en conejos y cuyes por NGS, sugieren que estos animales no poseen una población microbiana común. Así mismo, describen un elevado número de *Bacteroides* en los conejos, y diferencias de población bacteriana entre regiones del tracto digestivo, siendo la mayoría *Firmicutes*, otras especies no clasificadas, y en menor cantidad se encuentran los *Fibrobacteres*. Esto significa que posiblemente en el tracto intestinal del conejo, los organismos responsables de digerir la fibra (además de los *Firmicutes*) sean las especies no identificadas, y por la elevada cantidad de *Bacteroidetes* observados también da la posibilidad de que en el intestino del conejo este Phylum cumpla un rol protagónico en la digestión (Crowley *et al.*, 2012). Las diferencias en la composición de la población del microbioma del espacio digestivo de conejos y cuyes puede estar dado por las particularidades en la dieta entre ambos animales, pero también indica que hay una baja probabilidad que el causante de que un animal tenga

un tipo de vida cecotofágico esté determinado por una sola población microbiana (Crowley *et al.*, 2012).

Un grupo de investigadores en el año 2017 realizaron la amplificación del ADN bacteriano a partir de muestras fecales de cuyes luego de una dieta alta en azúcar y grasas (dieta occidental), como resultado el análisis molecular permitió agrupar al consorcio bacteriano en 11 Phylum, 19 clases, 29 órdenes, 45 familias y 73 géneros. El índice de Shannon (Shannon, 1948; Haegeman *et al.*, 2013) se utilizó para medir la diversidad de las muestras individuales, encontrando que los Phylum más abundantes en todas las muestras de heces de cuyes fueron Bacteroidetes y Firmicutes. Además, la dieta no tuvo un efecto significativo en el aumento de la proporción relativa de Bacteroidetes y la proporción relativa de Firmicutes fue significativamente menor en el grupo que pasó por una dieta occidental en comparación con el control, Por último, este estudio muestra que los taxones Bacteroidetes y Firmicutes son los más representativos en cuyes, siendo que la dieta podría tener un efecto en la composición bacteriana (Al *et al.*, 2017).

Ayudthaya *et al.* (2019) investigaron la diversidad microbiana de las muestras fecales de 2 cuyes, las comunidades microbianas de las muestras fecales estuvieron dominadas por los Phylum Bacteroidetes con una presencia de 40% y Firmicutes con 36%, el orden Bacteroidales S24-7 fue el orden más abundante, registrando un 11% en uno de los cuyes y 21% en el otro, por otro lado, a nivel de género, muchos microorganismos permanecieron sin clasificar. Se obtuvieron ocho aislamientos filogenéticamente diferentes, incluida una nueva especie de *Streptococcus*, la cepa denominada Cavy grass 6, esta nueva cepa es una bacteria heteroláctica de rápido crecimiento que fermenta la celobiosa a lactato, acetato, formiato y etanol; finalmente, los autores indican que las muestras fecales de cuy se pueden aplicar como fuente microbiana para la producción de ácido orgánico a partir de sustratos orgánicos complejos.

Como se hace mención en los antecedentes de investigación por la importancia que tiene la producción de cuyes en nuestro país y la escasez de trabajos de investigación

enfocados en el análisis metagenómico de la población bacteriana intestinal de cuy, realizados en nuestro país y región, cabe mencionar que solo se ha reportado un estudio por Posturas *et al.*, 2011 utilizando un método molecular realizó el aislamiento e identificación de géneros de poblaciones bacterianas con potencial probiótico presente en el tracto intestinal del cuy.

En este sentido, el **objetivo general**: Realizar la caracterización del microbioma del ciego en cuyes (*Cavia porcellus*) de las razas Inti, Perú y Andina. Teniendo como **objetivos específicos**: 1.- Realizar la caracterización metagenómica de las bacterias del ciego en cuyes de las razas Inti, Perú y Andina; 2.- Comparar las características metagenómicas del perfil microbiano encontrados en el ciego entre las tres razas de cuyes; 3.- Identificar microorganismos con potencial biológico (probiótico) como alternativa a la mejora de la producción sostenible de en la región Amazonas; 4.- Caracterizar los microorganismos asociados a la mejora de digestión y absorción de nutrientes con impacto en el peso y salud de cuyes.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

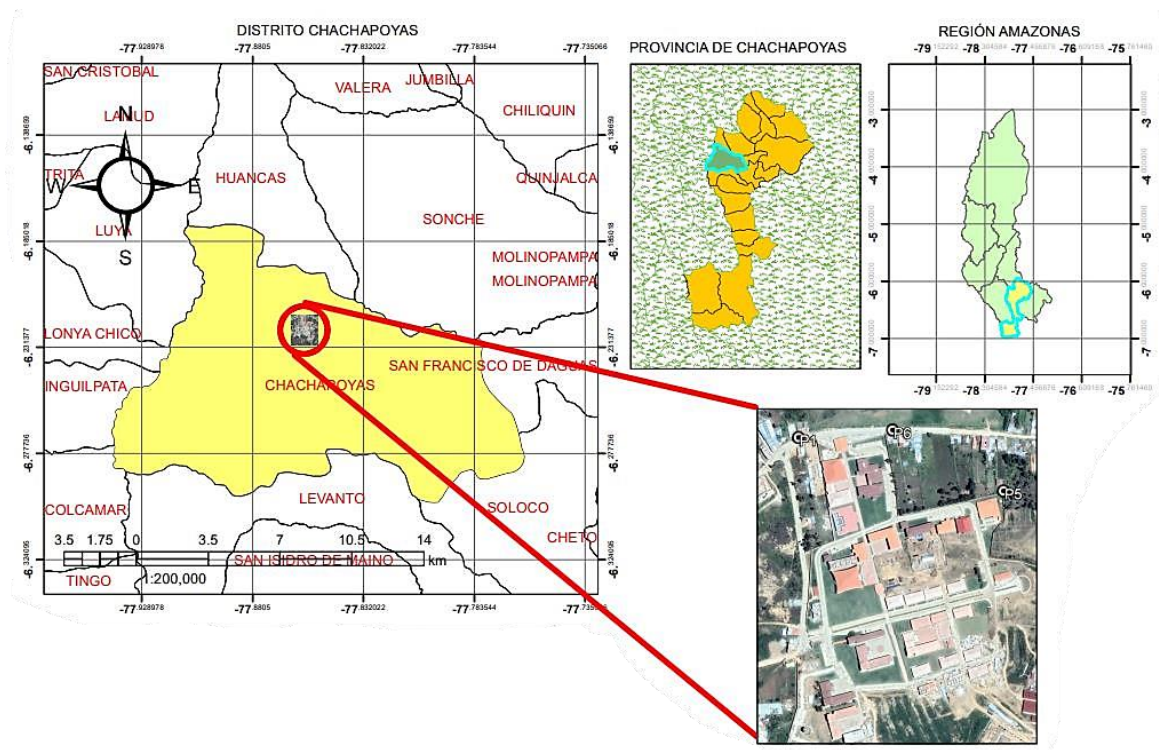
2.1.01. Ubicación Territorial.

Región : Amazonas

Provincia : Chachapoyas

Distrito : Chachapoyas

Figura 2. Mapa de ubicación de la Estación Experimental de Chachapoyas, UNTRM – Amazonas



2.1.02. Ubicación geográfica y características climáticas

La Estación Experimental de Chachapoyas de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ubicado en el Barrio Higos Urco, a 1.75 km de la ciudad de Chachapoyas capital de la Región Amazonas. Con un clima templado, lluvioso con amplitud térmica moderada.

Las características según la Estación Meteorológica de la UNTRM-A son:

Coordenada Este	: 184186.04 m
Coordenada Norte	: 9310143.65 m
Zona	: -18 S
Altitud	: 2339 msnm
Temperatura máxima promedio	: 19.8 °C
Temperatura mínima promedio	: 9.2 °C
Temperatura promedio	: 15 °C
Humedad relativa anual promedio	: 85%
Precipitación promedio anual	: 778 mm
Clima	: Templado - frio
Regiones Naturales	: Quechua alta

2.2.Métodos

2.2.1. Colecta de muestra

Los animales materia de estudio estuvieron compuestos por 30 cuyes machos, divididos en 10 ejemplares por cada raza en estudio Inti, Andina y Perú, con una edad entre 70 a 90 días, fueron acondicionados y distribuidos en 6 jaulas

con 5 ejemplares cada uno y alimentados bajo la misma proporción de 80 % y 20% de alfalfa y concentrado, con agua *ad libitum*, así como características fenotípicas de los individuos de estudio detallados en **Anexos (Tabla 8)**.

Cinco de los cuyes de las mismas razas fueron muestreados sin haberles proporcionado alimentación previa (24 horas antes de su beneficio) y los otros cinco fueron muestreados con alimentación de manera normal. La toma de muestras de mucosa de la sección transversal del ciego se realizó con apoyo de una hoja de bisturí fueron almacenados en tubos (rotulados con códigos de identificación) con PBS y transportados a 4°C hasta el laboratorio de Fisiología Molecular para su almacenamiento y posterior procesamiento. La toma de muestras biológicas y el desarrollo de este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la investigación – CIEI de la UNTRM (CIEI-N° 005)

2.2.2. Análisis bromatológico de la ración alimentaria

El análisis bromatológico de la alfalfa y el alimento balanceado que han sido utilizados en la alimentación de los cuyes fue realizado en el Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología de alimentos de la UNTRM, donde se determinó los parámetros de humedad (H°), proteína total (PT), cenizas (CZA), fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), extracto libre de nitrógeno (ELN), según los protocolos establecidos por el mismo laboratorio con el objetivo de homogenizar el tipo de alimentación para cada individuo (**Tabla 1 y 2**).

Tabla 1. Análisis Bromatológico de Alfalfa (*Medicago sativa*), en base seca

Parámetros (Ms)	Und	Valores
Humedad (H°)	%	5.14
Proteína Bruta (PB)	%	22.97
Fibra Cruda (FC)	%	20.59
Cenizas (CZA)	%	9.89
Extracto Etéreo (EE)	%	2.47
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	%	38.95

Fuente: (LABNUT - UNTRM, 2022).

Tabla 2. Análisis Bromatológico de concentrado

Parámetros (Ms)	Und	Valores
Humedad (H°)	%	12.19
Proteína Bruta (PB)	%	18.24
Fibra Cruda (FC)	%	10.12
Cenizas (CZA)	%	7.70
Extracto Etéreo (EE)	%	3.75
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	%	43.00

Fuente: (LABNUT - UNTRM, 2022).

2.2.3. Extracción de ADN de mucosa de ciego de cuy

La extracción del ADN a partir de mucosa de ciego se realizó mediante el uso del “minikit de ADN genómico PureLink”, según las recomendaciones del

fabricante. El tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contenía el ADN fue alicuotado 20 µL de muestra de ADN en tubos de 0.5 mL y fueron almacenados a -20°C, o a -80 °C a largo plazo.

2.2.4. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN se utilizó un fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen™) y el kit Qubit® dsDNA BR Assay Kit. La cuantificación requiere de estándares para su calibración, los mismos que vienen incluidos en el kit para este protocolo y posteriormente se registró la concentración de ADN de cada muestra. Esta metodología es la ideal para cuantificar ADN debido a la sensibilidad y exactitud, especialmente en protocolos de secuenciamento.

2.2.5. Reactivos para la amplificación de ADN (PCR)

En esta etapa fue utilizado el kit “Tag MasterMix” (BIORON) para la amplificación de ADN por PCR. Para la preparación del mix de reacción se usó 11 µL del Master Mix 2X, 0.5 µL de MgCl₂, 1 uL del primer forward (27_F), 1 µL del primer reverse (1492_R) y 1 µL del ADN extraído. Las secuencias de los primers se detallan en **Tabla 3**.

Tabla 3. Primers para la amplificación del gen 16S ARNr

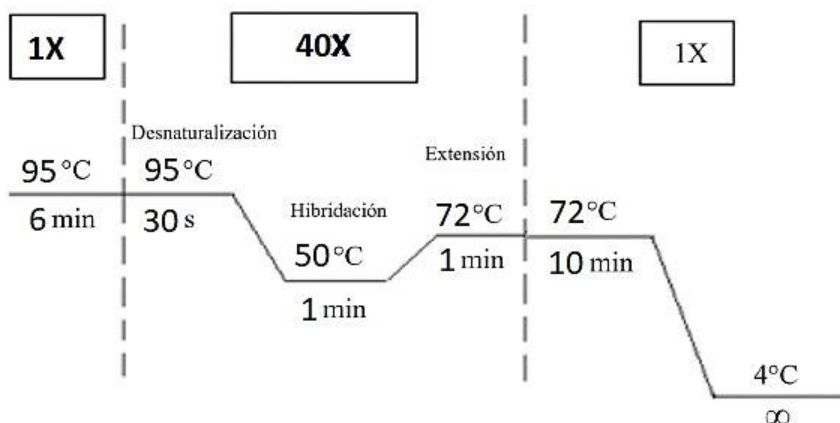
Nombre	Tipo	Secuencia
Primer 27_F	Forward	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Primer 1492_R	Reverse	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

2.2.6. Amplificación de la región 16S

Para saber si hay presencia de ADN bacteriano en las muestras extraídas del ciego intestinal de cuyo fue amplificado el gen 16S rRNA (marcador de bacterias). Para la amplificación se utilizaron todas las muestras y un control

negativo, así como uno positivo. Los tubos con muestra fueron transferidas a un rack de PCR e introducido en el termociclador (*Applied Biosystems SimpliAmp*) con el siguiente programa de PCR (**Figura 3**). Los amplicones fueron refrigerados hasta su uso en la corrida electroforética.

Figura 3. Programa en el termociclador de acuerdo a la especificación del primer para gen 16S rRNA



2.2.7. Electroforesis

La amplificación del gen 16S rRNA fue confirmada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Para la siembra en los geles, 10 μ L de muestra de ADN se homogeneizó en 2 μ L de buffer de carga, además se utilizó un control negativo y un control positivo. Con ayuda de una micropipeta se depositaron las muestras de ADN y los controles en los pocillos. En los extremos fue colocado 10 μ L del *ladder* (1kb). La corrida electroforética fue realizada a 75 voltios por 60 minutos. Los resultados fueron observados en un fotodocumentador de gel (OMNIDOCI) con cámara de 5 Mpx y lámpara UV.

2.2.8. Purificación de ADN

El kit “*DNA Clean and Concentrator*®-5” fue empleado para la purificación de muestras de ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Zymo*

Research). Finalmente, el ADN purificado se cuantificó mediante el fluorómetro Qubit 3.0 (*InvitrogenTM*).

2.2.9. Secado de ADN

Para el secuenciamiento fue necesario realizar un paso previo de secado de las muestras de ADN. Para lograr esto, las muestras fueron colocadas en placas de PCR de 96 pocillos, dejando un pocillo entre cada una para evitar posible contaminación por manipulación. La parte superior de los pocillos fue recubierta con parafilm con 3 orificios delgados y sometidos a un baño seco a 37°C por 12 horas. Finalizado el proceso de secado, la placa de PCR fue cubierta para film y almacenada en congelación (-20°C) hasta el proceso de secuenciamiento.

2.2.10. Secuenciamiento

El secuenciamiento de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S ARN. Los primers usados para la amplificación de esta región genómica fueron los primers 341F (5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') y 805R (5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3') (Caporaso et al., 2012).

2.2.11. Diseño experimental

La investigación se realizó bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) (Este diseño es el más simple para comparar dos o más tratamientos, ya que se tiene en cuenta dos fuentes de variación: el tratamiento y el error aleatorio) con un arreglo factorial de 3x2, donde el Factor A: fue la raza (Inti, Perú y Andina) y Factor B: suministro de alimento previo al sacrificio (animales con ayuno de 24 horas y animales sin ayuno). Los 30 cuyes fueron distribuidos en 6 tratamientos; cuyes de la raza inti con ayuno, cuyes de la raza inti con alimento, cuyes de la raza Perú con ayuno, cuyes de la raza Perú con alimento, cuyes de la raza Andina con ayuno, cuyes de la Andina con alimento (**Tabla 4**).

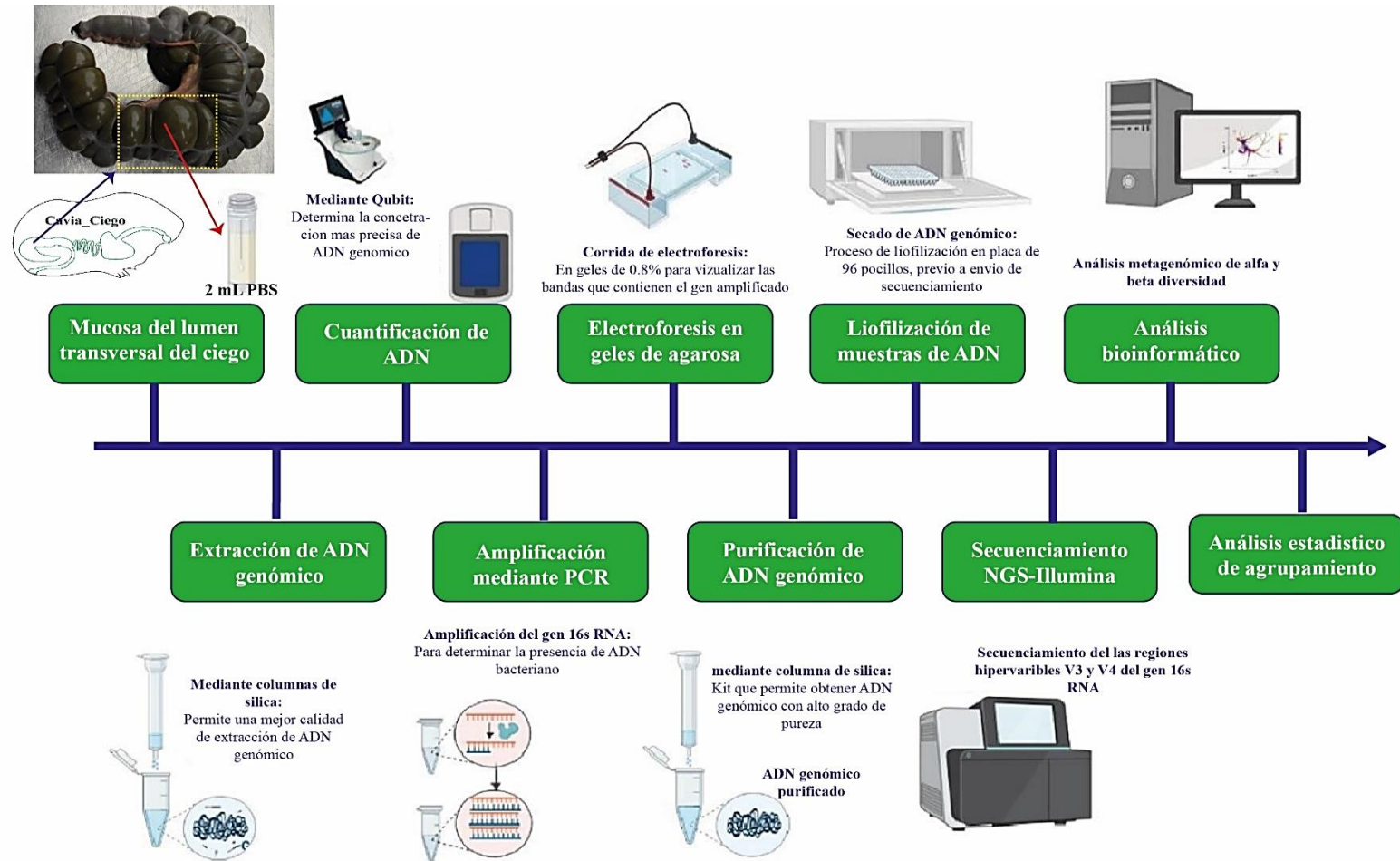
Tabla 4. Cuadro de distribución de grupos por tratamiento de análisis.

TRATAMIENTOS					
ALIMENTADO			AYUNO		
Grupos -raza					
Raza Perú	Raza Andina	Raza Inti	Raza Perú	Raza Andina	Raza Inti
Perú -1-A	Andina -1-A	Inti 1-A	Perú -1-AY	Andina -1-AY	Inti 1-AY
Perú -2-A	Andina -2-A	Inti 2-A	Perú -2-AY	Andina -2-AY	Inti 2-AY
Perú -3-A	Andina -3-A	Inti 3-A	Perú -3-AY	Andina -3-AY	Inti 3-AY
Perú -4-A	Andina -4-A	Inti 4-A	Perú -4-AY	Andina -4-AY	Inti 4-AY
Perú -5-A	Andina -5-A	Inti 5-A	Perú -5-AY	Andina -5-AY	Inti 5-AY

Leyenda: A: Alimentado (Alimentación con Alfalfa y Concentrado), AY: Ayuno (Retiro de alimento 24 horas antes del beneficio)

El estudio fue conducido en etapas, de acuerdo con los objetivos propuestos, siendo la etapa de extracción hasta el análisis bioinformático enmarcado en los objetivos específicos 1 y 2. En la etapa de análisis de grupos se identificó posibles grupos bacteriano asociados al objetivo 3. La **figura 4** detalla el delineamiento experimental.

Figura 4. Etapas desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos de la tesis.



2.2.12. Análisis bioinformático

Dentro de los algoritmos de análisis de datos secuenciación del gen 16S rRNA fue utilizado QIIME2 versión 2022.2 (Bolyen *et al.*, 2019) a través del lenguaje de programación *Python* en el servidor de bioinformática del Laboratorio de Fisiología Molecular de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM). Iniciando las etapas de trabajo del programa QIIME2 para analizar los archivos fastq.gz forward (dirección 5´-3´ del ADN) y reverse (dirección 3´-5´ del ADN) a fin de verificar la calidad de las lecturas.

Se demultiplexó las secuencias acordes con las secuencias de código de barras que se adquirieron en el proceso de secuenciación, luego se construyó una metadata con información referente a las variables a analizar con respecto a las muestras de mucosa del segmento transversal del lumen del ciego de cuyes según la raza (Perú, Inti y Andina) y estado de alimentación (Individuos alimentados normalmente “AL” e individuos en ayuno “AY”).

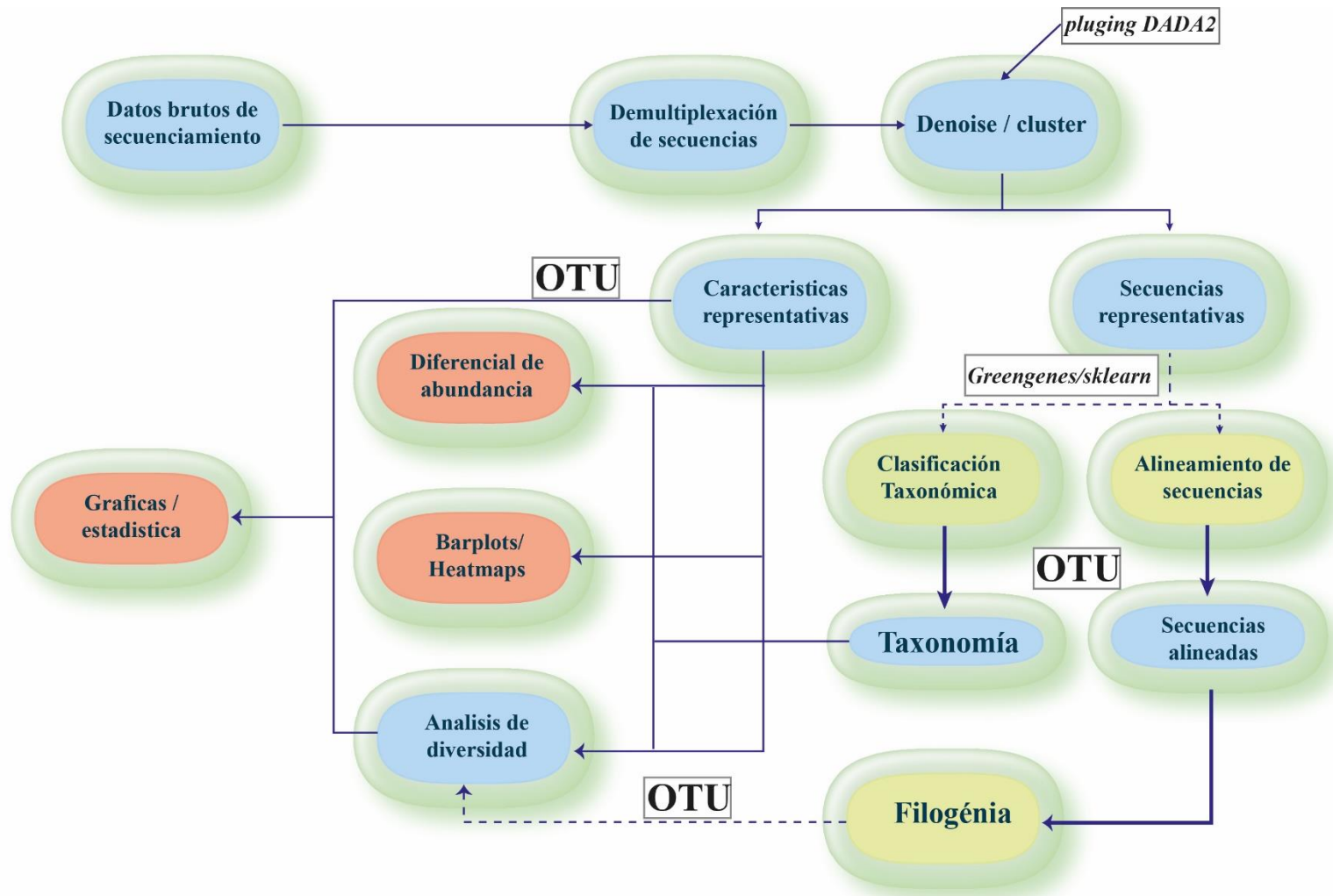
Luego de este proceso se realizó la remoción de los adaptadores de secuencias y la eliminación de ruido, secuencias ambiguas, duplicadas, de baja calidad, quimeras y otras, a través del método *denoise-paired* mediante el *plugin* DADA2, para continuar con el análisis solo hasta las posiciones 226 y 208 de las lecturas *forward* y *reverse*, respectivamente.

Las secuencias representativas y de alta calidad fueron utilizadas para la clasificación taxonómica con la base de datos *Greengenes* y el clasificador *sklearn*, obteniendo las tablas de taxonomía y Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) en formato ".qza". Además, se usó la rarefacción alfa para excluir secuencias con un conteo insuficiente de lecturas por muestra.

Para analizar la diversidad bacteriana, se calcularon los índices de diversidad alfa y beta a partir de la tabla completa de OTUs. La diversidad alfa por razas, y estado de alimentación fue realizada mediante índices de Shannon ($p < 0.05$). La diversidad beta se realizó con el Análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en el índice de Bray-Curtis por raza, y la distancia *UniFrac*

no ponderada por estado de alimentación. Para identificar diferencias significativas por otro método no paramétrico se utilizó el análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA), ya que es una herramienta estadística basado en permutaciones de matrices de distancia y muy utilizado en estudios ecológicos y biológicos. La **figura 5** detalla el flujograma del análisis bioinformático.

Figura 5. Flujo de trabajo del análisis bioinformático modificado de Bolyen *et al.*, 2019



III. RESULTADOS

En relación a los resultados, estos serán descritos a continuación según los objetivos específicos del estudio.

3.1. Caracterización metagenómica de las bacterias de la mucosa del ciego en (*Cavia porcellus*) de las razas Inti, Perú y Andina

3.1.01. Parámetros de calidad de muestras de ADN extraídas de mucosa de ciego de cuy

Los resultados parámetros de concentración de ADN extraídas a partir de la mucosa del ciego de cuy, estos valores que se encontraron al momento de la Pre-purificación y Post-Purificación, de los índices de contaminación por proteínas (A_{260}/A_{280}) y sales (A_{260}/A_{230}). Garantizan estimaciones con un alto grado de pureza ($A_{260}/A_{280} \approx 1.8-2$ y $A_{260}/A_{230} \approx 2$), así como una cantidad adecuada de ADN. De igual manera el proceso de purificación permitió mantener los estándares de calidad, necesario para el secuenciamiento metagenómico de las muestras (>20 ng/ul), estos datos pueden ser visualizados en el **Anexo 2**.

3.1.02. Composición del microbiota de mucosa de ciego de cuy

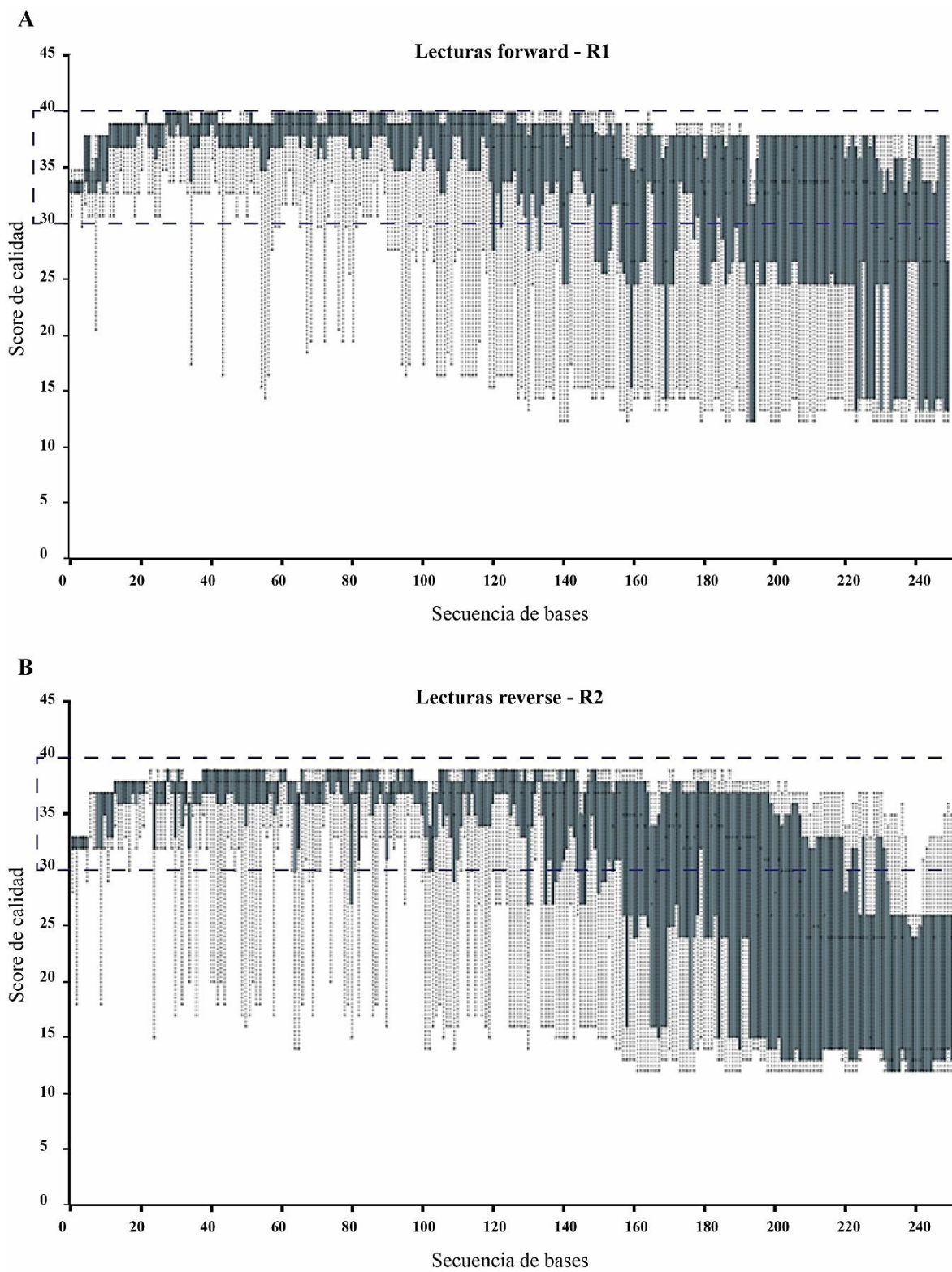
El secuenciamiento de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16s ARNr, se muestra los resultados en la **Tabla 5**, el análisis de calidad de lecturas o reads de forward y reverse, produciendo un total de más de 5 millones de lecturas en promedio, con un valor máximo de 274966 y un mínimo de 82969 lecturas; generando un número medio de 180 mil lecturas por muestra, de las cuales se validaron el 100% de las secuencias; los resultados de estas lecturas nos garantizan conocer y descifrar el código genético que tienen todas las muestras evaluadas de la mucosa del ciego de cuy de los individuos estudiados.

Tabla 5. Muestra el análisis de calidad de lecturas o reads producidas por el secuenciamiento.

	Lecturas Forward	Lecturas Reverse
Mínimo	82.969,00	82.969,00
Mediana	179.668,50	179.668,50
Media	180.274,93	180.274,93
Máximo	274.966,00	274.966,00
Total	5.047.968,00	5.047.968,00

En la **Figura 6**, se plasman resultados de la calidad de secuencias por segmentos para lecturas del forward-R1 (A) y reverse – R2 (B), donde se toma como índice de calidad en *Phred* (probabilidad de error de que la base secuenciada se la correcta), a partir de 30 (99.9% de certeza) (Richterich *et al.*, 1998) en adelante como se muestra en la figura, donde se ha realizado el corte de lecturas a partir del valor de 30 (cuadro con líneas azules punteadas), con el objetivo de trabajar con lecturas de alta calidad en los procesos de análisis bioinformático, ajustándonos a los parámetros que exige el secuenciamiento de última generación en ambas cadenas de la estructura en doble hélice del ADN (lecturas del forward-R1 y reverse – R2), esto implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas determina automáticamente el orden de la otra, por ello se dice que las cadenas son complementarias.

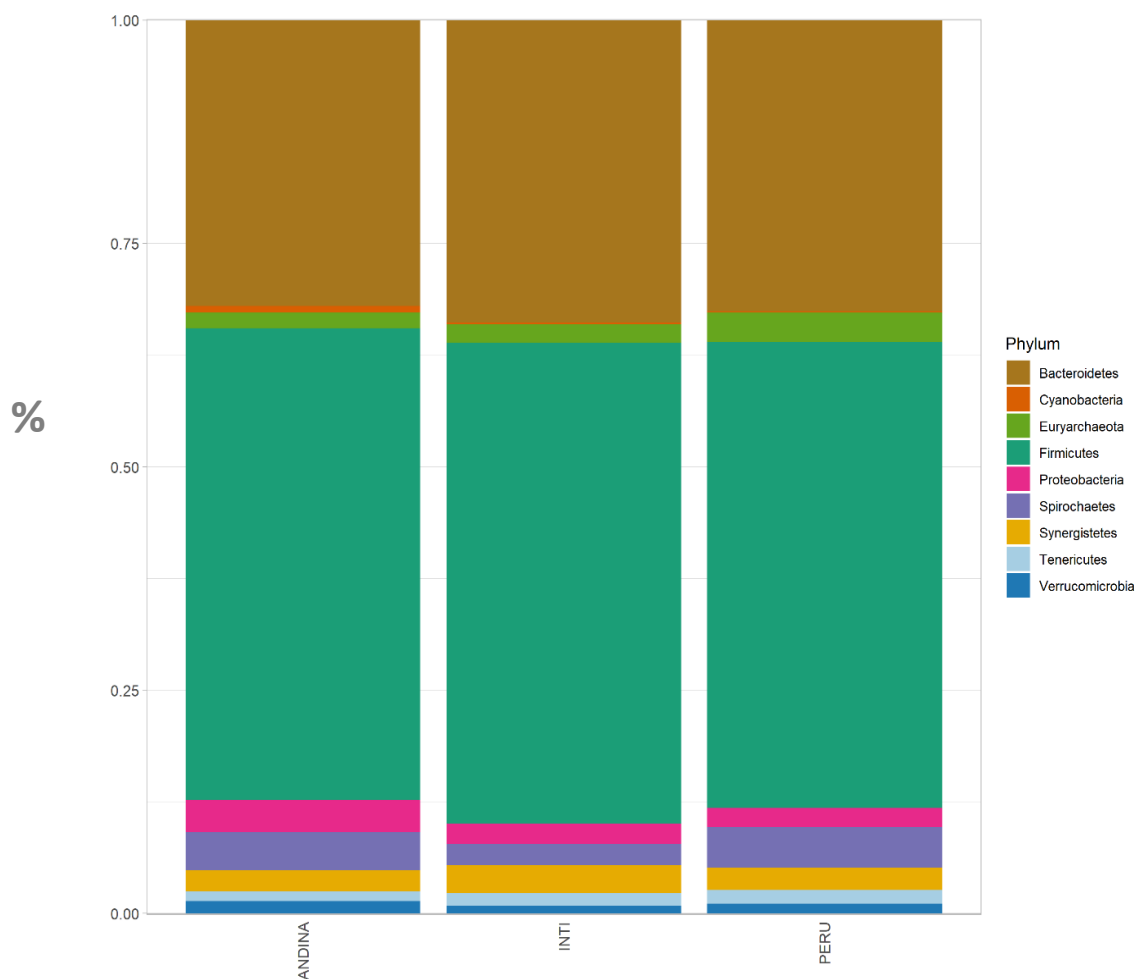
Figura 6. Secuencias por segmentos para lecturas del forward-R1 (A) y reverse – R2 (B).



3.1.03. Identificación de la composición bacteriana

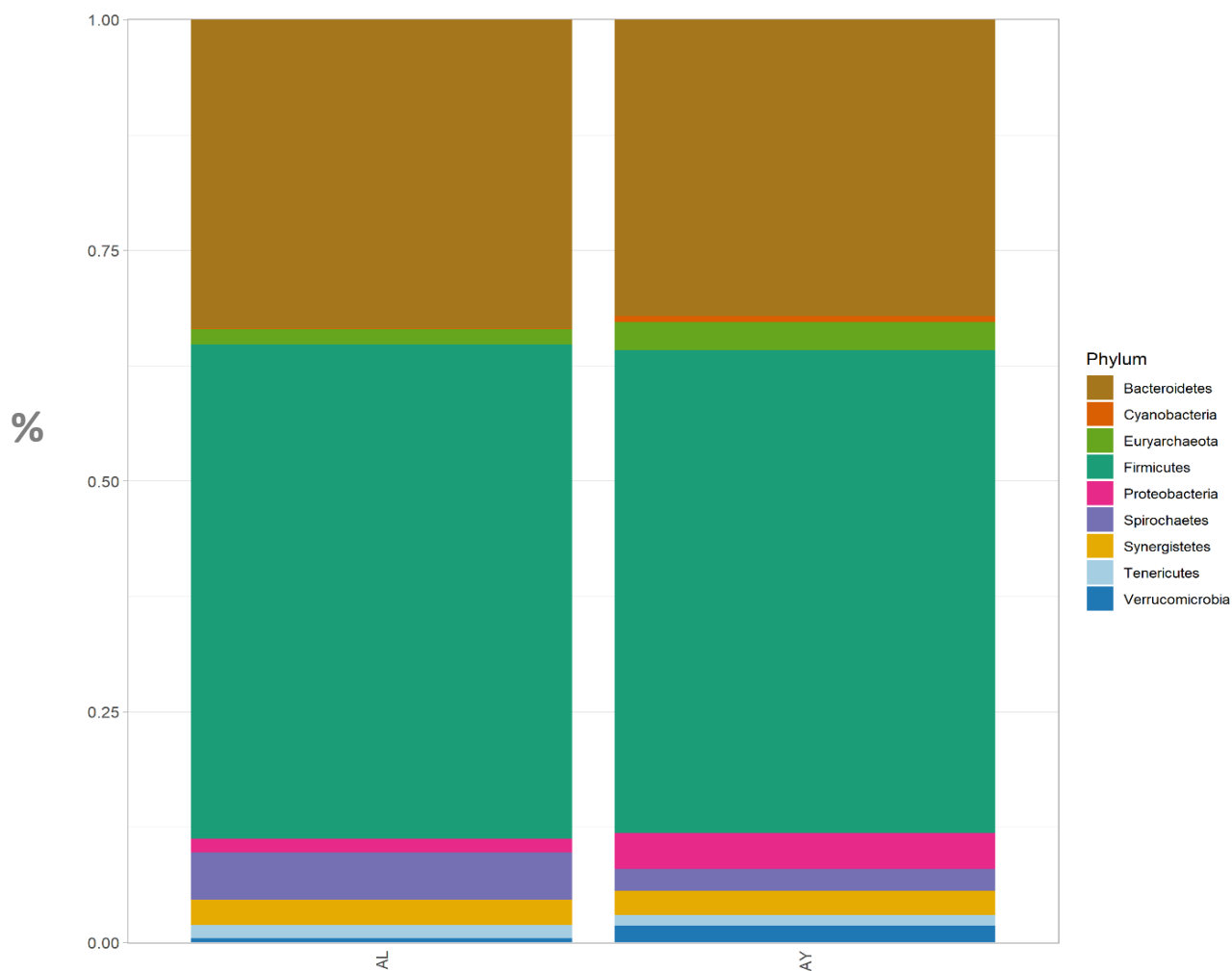
Tomando en consideración las frecuencias relativas para identificar grupos de bacterias presentes en el total de muestras extraídas de mucosa de ciego en promedio pertenecen predominantemente a dos Phylum: Firmicutes (58.37%) y Bacteroidetes (27.99%); otros Phylum fueron observados en proporciones inferiores, tales como Phylum Spirochaetes (3.95%), Synergistetes (2.64%) y Verrucomicrobiota (1.16%) entre otros. Sin embargo, las proporciones de cada Phylum son similares según raza (**Figura 7**). El Phylum Firmicutes es el más representativo entre las tres razas, sin embargo la raza Inti presenta el 50%, respecto a las razas Perú y Andina que poseen 45% de abundancia. El Phylum Bacteroidetes se encuentra representado en un 35% en la raza andina, mientras que en las razas Andina y Perú tienen el porcentaje similar de 33%. Además se puede visualizar que el Phylum Spirochaetes tiene mejor representación en la raza Andina y Perú, así mismo, el Phylum Synergistetes tiene mayor abundancia en la raza Inti, mientras que el Phylum Euryarchaeota presenta mayor diversidad en la raza Perú.

Figura 7. Porcentaje de frecuencias de la composición bacteriana separados por raza.



Del mismo modo la **Figura 8** muestra la distribución de los *Phylum* por grupos de tratamiento donde el *Phylum* Proteobacteria tiene una mayor representación en el tratamiento con ayuno, mientras que el *Phylum* *spirochaetes* presenta mayor abundancia en el tratamiento alimentado, el *Phylum* *verrucomicrobia* tiene mayor proporción en el tratamiento con ayuno a diferencia del *Phylum* *tenericutes* cuya presencia es mayor en el grupo de animales alimentados.

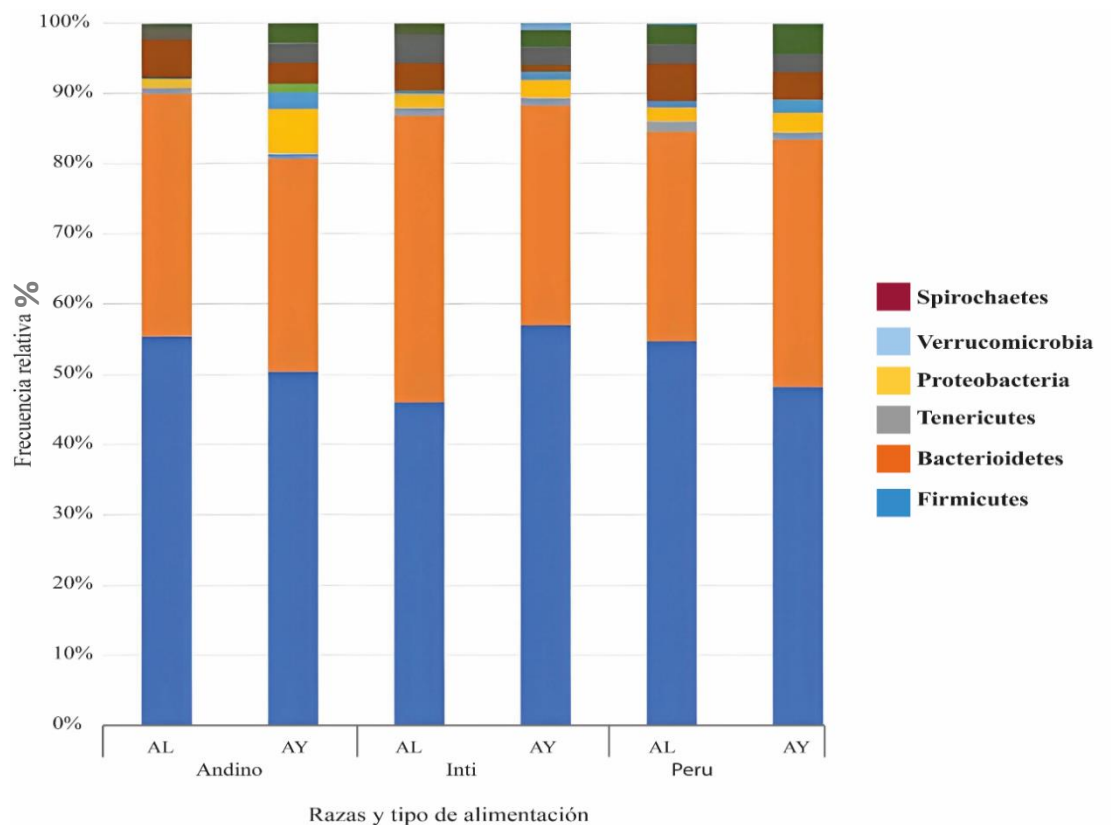
Figura 8. Porcentaje de frecuencias de la composición bacteriana distribuido en Phylum separados por tratamiento. AL (alimentado) y AY (ayuno).



El análisis de diversidad microbiana muestra que las bacterias pertenecientes a los Phylum Firmicutes y Bacteroidetes fueron los más resaltantes, además en un análisis por raza y tratamiento se evidencia que dicha composición cambia según tratamientos siendo el grupo alimentado de las razas Andina y Perú abundante el Phylum Firmicutes (55%), mientras que en el tratamiento ayuno la raza Inti presenta 58%. Sin embargo, el Phylum bacteroidetes tiene 40% en la raza Inti del grupo alimentando y 30 % en las razas Andina y Perú, a diferencia del grupo ayuno que presentan un porcentaje similar de 30% en las tres razas.

En cuanto a la raza Andina la proporción de los Phylum Firmicutes y Bacteroidetes disminuyen, así mismo, se evidencian el aumento de otros grupos como Proteobacteria y Verrucomicrobia dentro del tratamiento ayuno, en relación al tratamiento alimentado. En la raza Inti se resalta una disminución del Phylum Firmicutes y Bacteroidetes en el grupo alimentado en comparación al tratamiento con ayuno. En la raza Perú la proporción de los Phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Sprochaetes disminuyen, mientras que Proteobacteria aumenta en el tratamiento con ayuno. También podemos evidenciar que la raza Andina y Perú tienen un patrón similar en la distribución de Phylum (**Figura 9**).

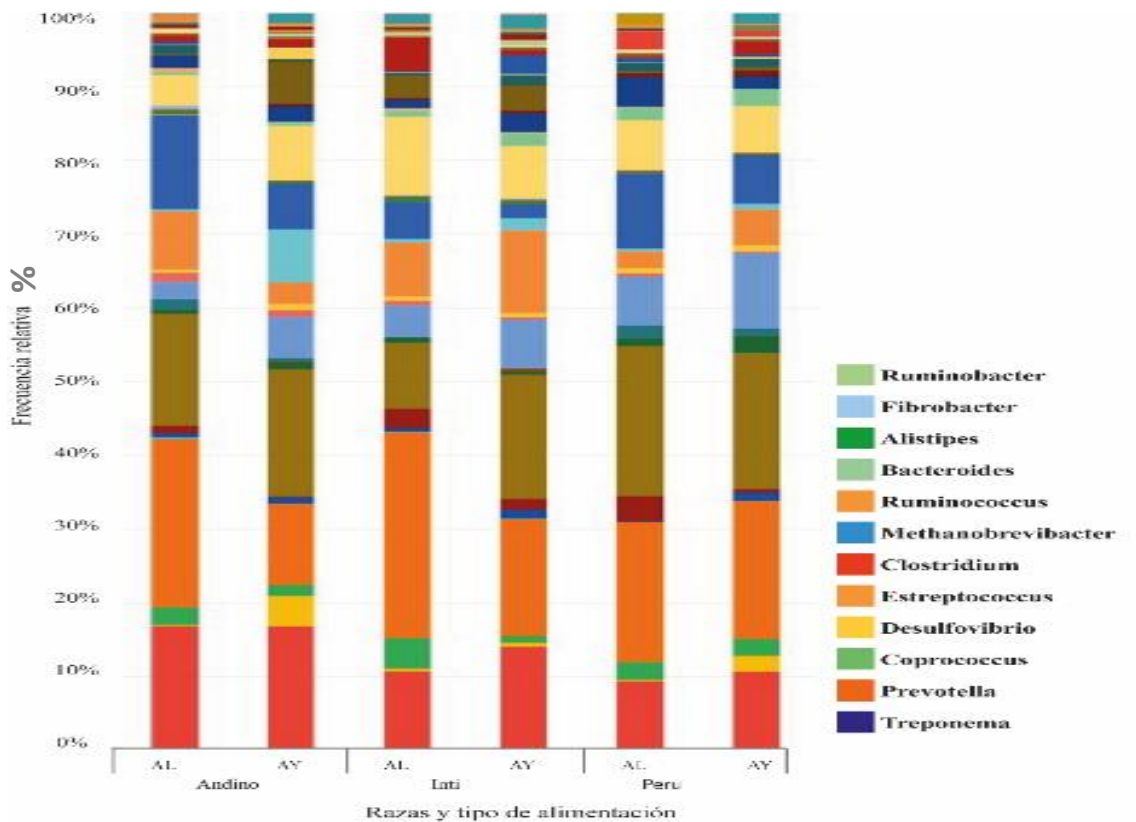
Figura 9. Composición bacteriana distribuido en *Phylum* separados por raza y tratamiento. AL (alimentado) y AY (ayuno).



A nivel de género la raza Andina tiene una mayor proporción del género Clostridium en comparación a las otras dos razas. En relación a Clostridium tanto la raza Inti como

Perú tienen un aumento en el tratamiento con ayuno. Sin embargo, el género *Prevotella* presenta una disminución en los tratamientos con ayuno de la raza Andina e Inti, mientras que la raza Perú no presenta un cambio en la proporción. El género *Alistipes* presenta un aumento en el tratamiento con ayuno en relación al alimentado en la raza Inti, a diferencia de las otras razas, donde no hubo cambios en sus proporciones respectivas. El género *Fibrobacter* aumenta en proporción en el tratamiento ayuno en las razas Andina, Inti y Perú. El género *Methanobrevibacter* posee menor abundancia en individuos bajo tratamiento con ayuno para las tres razas analizadas. El género *Methanobrevibacter* posee menor abundancia en individuos bajo tratamiento con ayuno para las tres razas analizadas. El género *Coprococcus* presenta una disminución en proporción en el tratamiento con ayuno en las razas Andina e Inti (**Figura 10**).

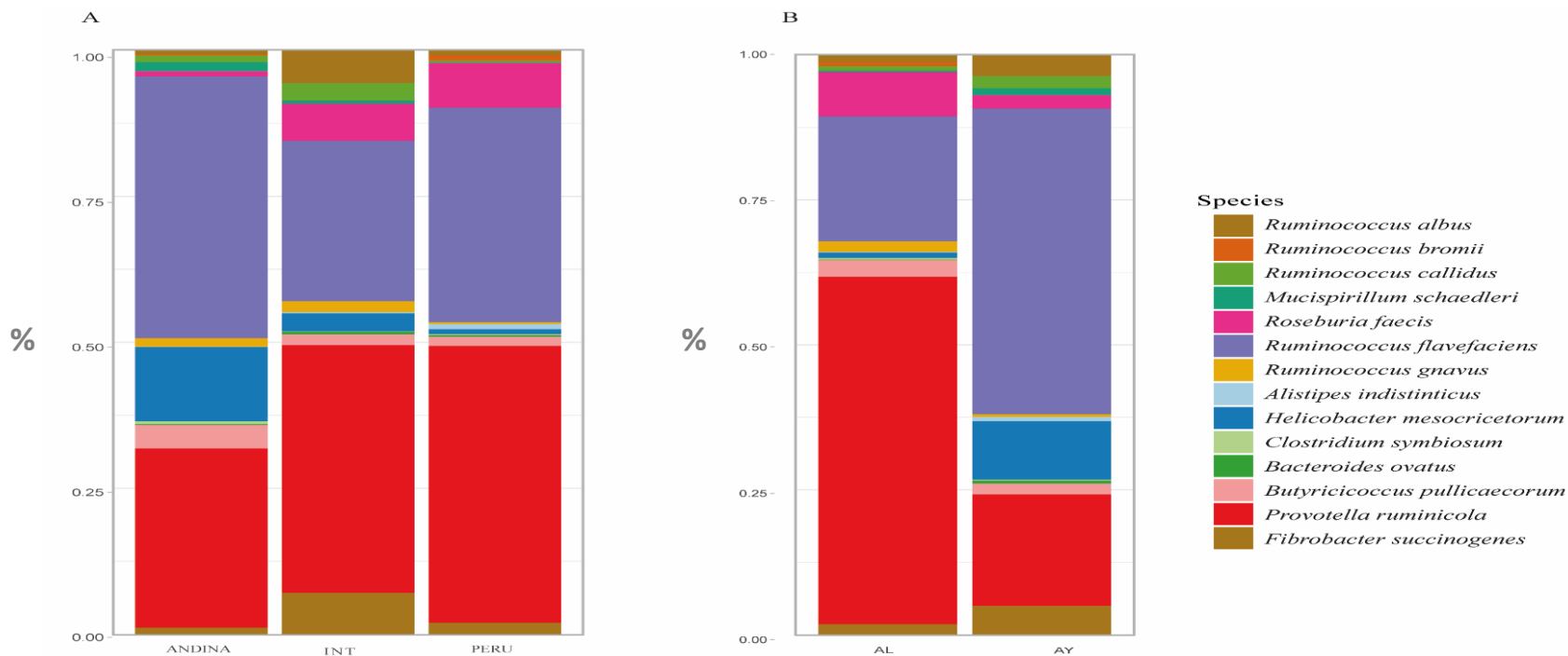
Figura 10. Composición bacteriana distribuida en géneros por raza y tratamiento. AL (alimentado) y AY (ayuno).



A nivel de especie, se identificaron bacterias entre las 3 razas analizadas, dichas bacterias han sido descritas por la literatura debido a su actividad dentro del microbiota intestinal.

La bacteria *Fibrobacter succinogenes* tiene como función degradar la celulosa, importante para la absorción de nutrientes. Así como, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus bromii* (**Figura 11 A**) Otra bacteria de importancia identificada fue la *Prevotella ruminicola*, la cual tiene como función degradar los carbohidratos de cadena corta, siendo su mayor producción el propionato, el cual se absorbe por la pared intestinal, las distribuciones de especies de importancia pueden ser visualizadas también en los dos tratamientos descritos (**Figura 11B**).

Figura 11. Composición bacteriana distribuido por especies separados por raza (A) y tratamiento (B), resaltando las especies de mayor importancia.



3.2.Comparar características del perfil microbiano encontrado en el ciego entre las tres razas de cuyes

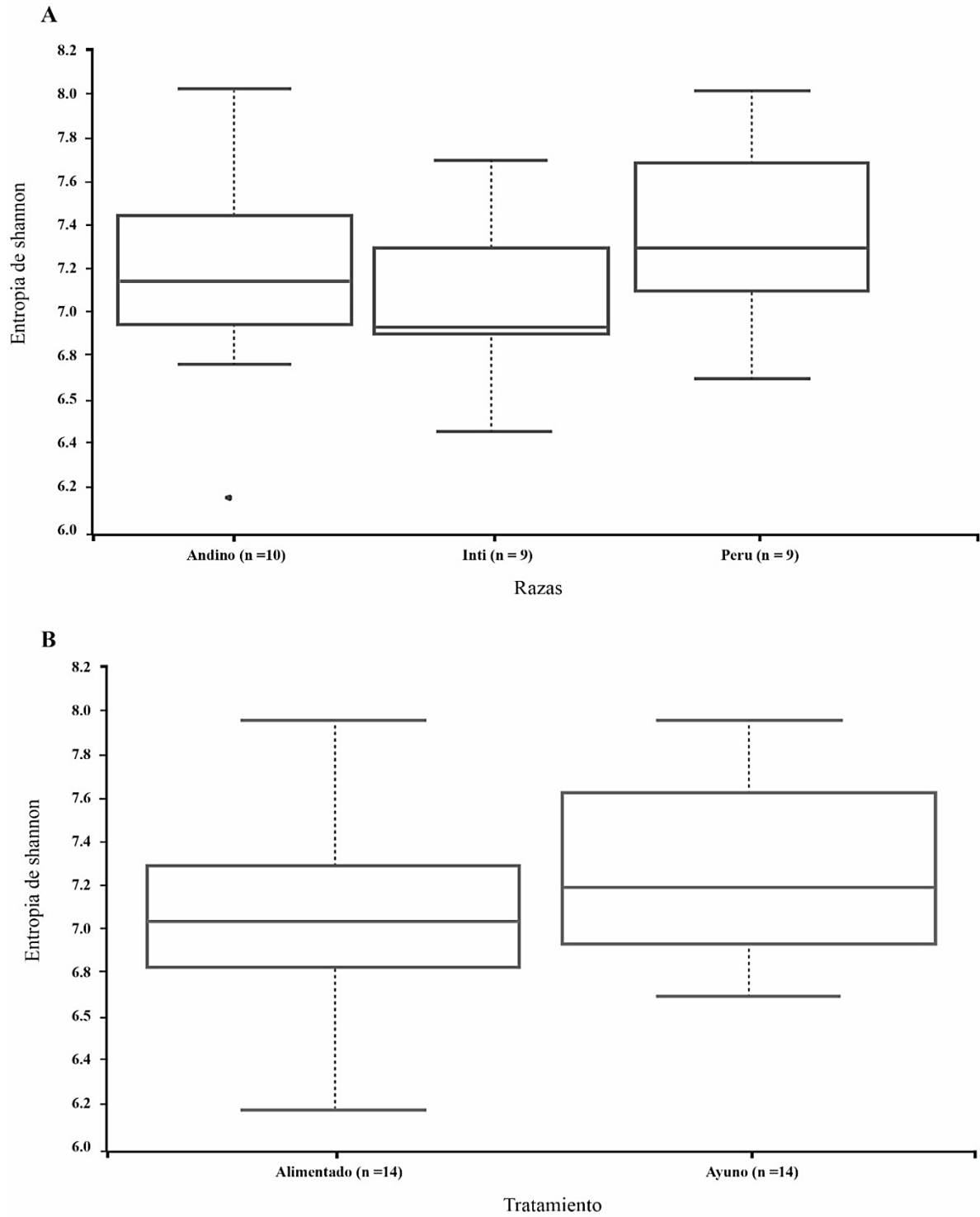
3.3.Diversidad alfa

El análisis de diversidad alfa comparadas entre razas muestra que entre la raza andina e Inti existe una ligera diferencia puesto que el valor de P es de 0.5676, mientras que entre las razas Perú y Andina no existe diferencia, puesto que se evidencia un valor de P de 0.2530, de manera similar la comparación entre las razas Inti y Perú no muestran diferencias ya que el P- value es de 0.0576. Así mismo, el índice general de todos los grupos muestra un valor menor al de $p \leq 0.05$, lo cual significa que no existe una diferencia estadística. La comparación entre tratamientos muestra los índices de Shannon con el p-valor ($p \leq 0.05$) por lo tanto entre el grupo 1 y grupo 2 la diferencia que presentan es baja. (**Tabla 6**). No obstante, se puede observar en el *box plot* (**Figura 12A**) que hay una mayor diversidad en las razas “Andina” y “Perú” comparados con la raza Inti, ya que la mediana está ubicada cerca del primer cuartil, indicando una asimetría en la distribución de datos. La misma tendencia se puede observar en la comparación por tratamiento, donde el tratamiento con ayuno tiene un ligero aumento en su diversidad microbiana en relación al tratamiento alimentado, estos resultados se visualizan en el *box plot* (eje Y representa la diversidad de Shannon y el X representa los grupos comparados) de la **Figura 12B**, donde la mediana presenta una distribución simétrica de la diversidad microbiana en el tratamiento alimentando, en tanto el tratamiento con ayuno tiene una leve tendencia asimétrica en la distribución de la diversidad microbiana.

Tabla 6. Valores estadísticos de los índices de Shannon para los grupos raza y tratamiento.

			<i>H</i>	<i>p-value</i>
<i>Raza</i>	Grupo 1	Grupo 2		
	<i>Andino (n=10)</i>	<i>Inti (n=9)</i>	0.3267	0.5676
		<i>Perúano (n=9)</i>	1.3067	0.2530
	<i>Inti (n=9)</i>	<i>Perúano (n=9)</i>	3.6043	0.0576
	<i>Todos los grupos</i>		3.4755	0.1759
<i>Tratamiento</i>	Grupo 1	Grupo 2		
	<i>Alimentado (n=15)</i>	<i>Ayuno (n=13)</i>	0.8069	0.3690

Figura 12. Diversidad alfa de las muestras de mucosa de ciego de cuy basado en el índice de Shannon, agrupado en raza (A) y tratamiento (B).



3.4. Diversidad beta

El análisis de diversidad beta se realizó a través de un método de PCoA, el cual fue descrito por Gower (2016) como un tipo de análisis de ordenación que resume y proyecta un conjunto de datos multivariantes de una comunidad en un espacio bidimensional o tridimensional, se aplica para ver tendencias globales, donde indica la similitud o diferencia de las poblaciones. El mencionado análisis se desarrolló basado en los índices de Bray Curtis, el cual considera la abundancia relativa. Las razas y tratamientos fueron sometidos a este examen para identificar agrupamientos o *clusters* de acuerdo al perfil microbiano de cada grupo. Considerando el porcentaje de similitud para el eje Y (14.8%) y para el eje X (23%) en este análisis, el perfil microbiano de cada muestra no se agrupa en “*clusters*” de acuerdo a la raza, la misma tendencia de agrupamiento se evidenció en los tratamientos. Por lo tanto, no existen diferencias en el agrupamiento de las muestras para el índice utilizado (**Figura 13**).

Aplicando el Análisis de PERMANOVA por pares para los grupos (raza y tratamiento) considerando un P- Valor ($p \leq 0.05$), se identificó diferencias significativas entre la raza Andina e Inti, así como en la raza Inti y Perú. Por otro lado, en el grupo de tratamiento (alimentado y ayuno) se identificó una diferencia significativa ($P = 0.025$) datos que pueden ser visualizados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Valores estadísticos del PERMANOVA por pares para los grupos razas y tratamiento.

			Pseudo-F	p-value	q-value
Línea	Grupo 1	Grupo 2			
	<i>Andino</i>	<i>Inti</i>	1.337	0.036	0.054
		<i>Peruano</i>	1.119	0.200	0.200
	<i>Inti</i>	<i>Peruano</i>	1.562	0.002	0.006
Tratamiento	Grupo 1	Grupo 2			
	<i>Alimentado</i>	<i>Ayuno</i>	1.372	0.025	0.025

Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de similitud de Bray-Curtis para las muestras del ciego de cuy entre las razas: AND (Andino), INT (Inti) y P (Perú).

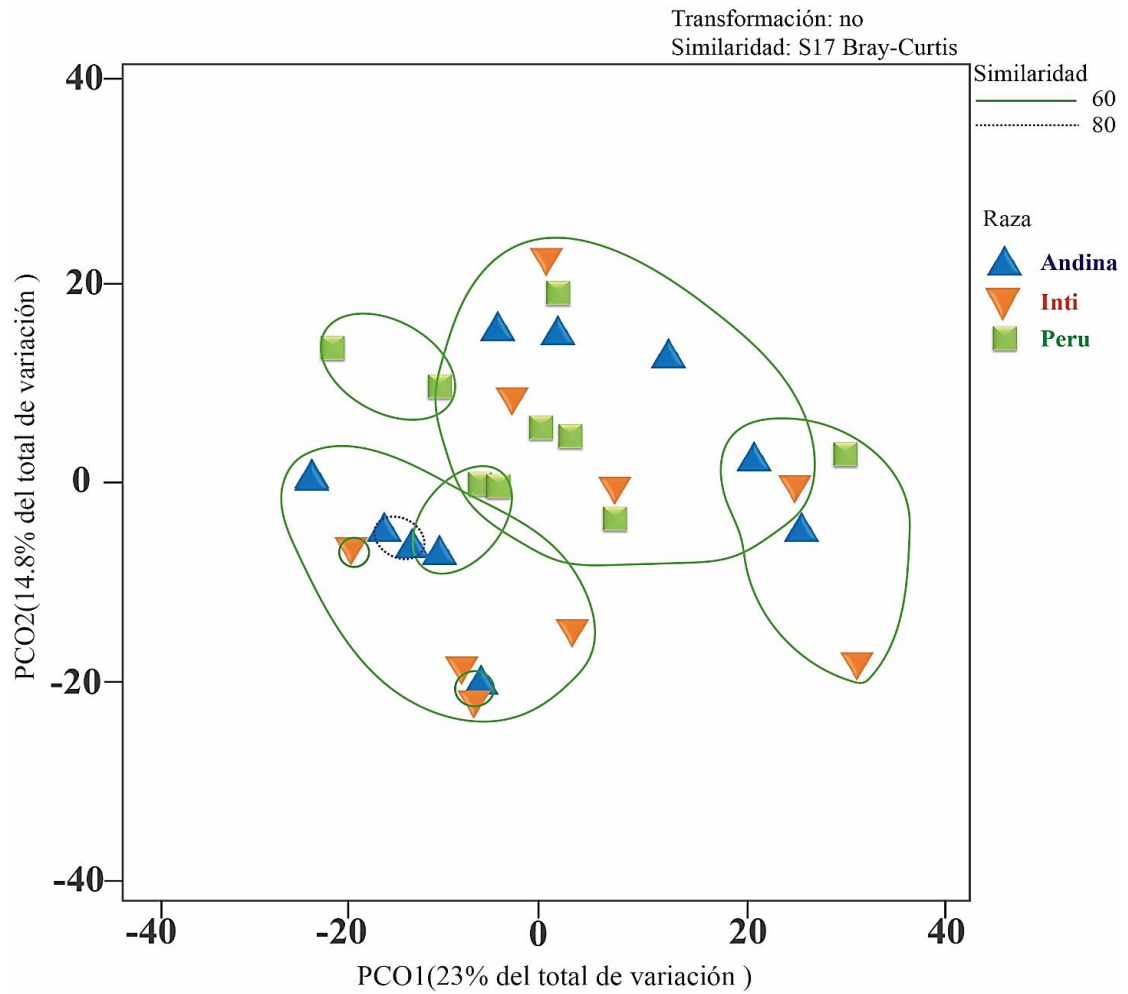
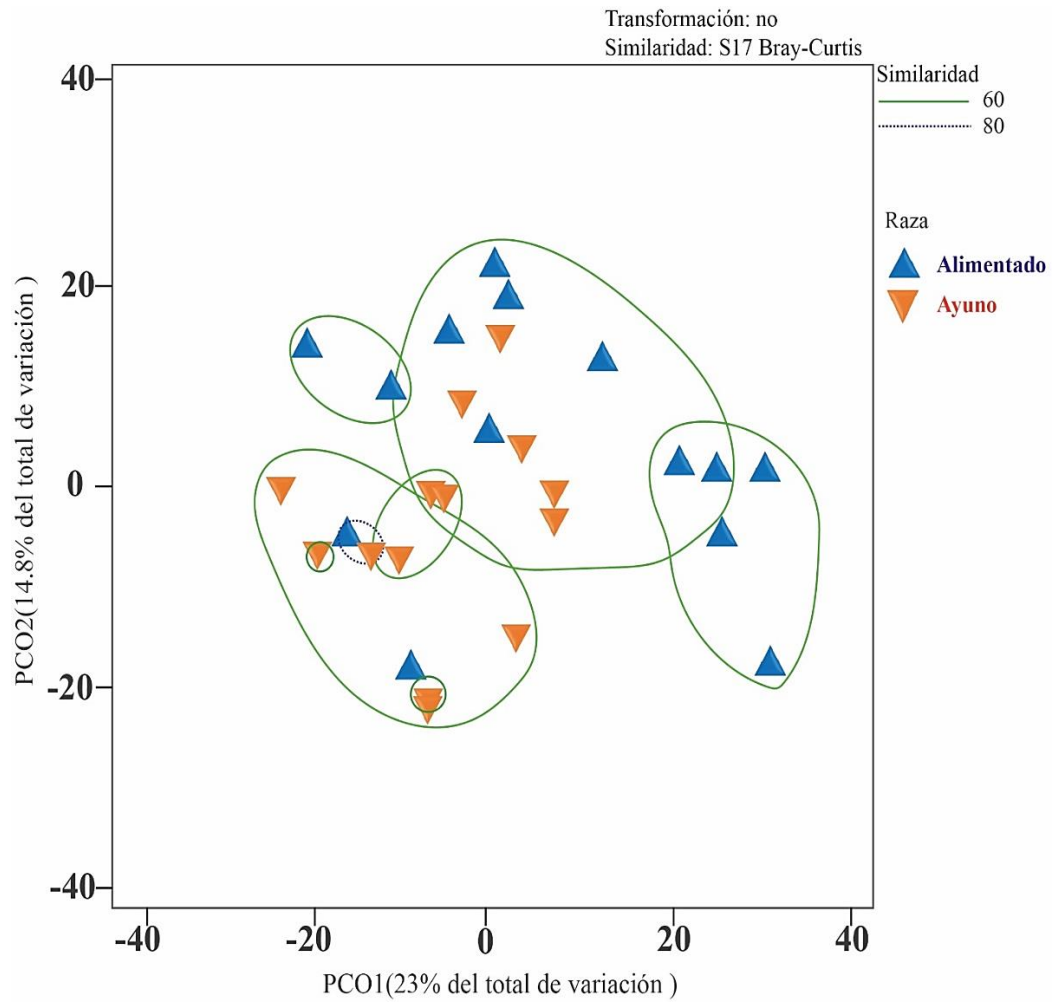


Figura 14. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de similitud de Bray-Curtis para las muestras del ciego de cuy entre los tratamientos: AL (alimentado) y AY (ayuno).



3.5. Identificar microorganismos con potencial biológico (probiótico) como alternativa a la mejora de la producción sostenible de *Cavia porcellus* en la región Amazonas

Se ha identificado géneros degradadores de fibra (*Ruminococcus*) los cuales tienen un efecto en la composición microbiana y la digestión de la fibra, destacando la especie *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus bromii*. Así mismo, se reconoció al género Prevotella, destacando la especie *ruminicola*. En esa misma línea, el género Fibrobacter fue descrito y destaca la especie *Fibrobacter succinogenes*. Según la información secundaria encontrada, estos géneros y especies tienen una importancia en la degradación y absorción de polímeros vegetales, además se ha identificado otras especies que pueden ser utilizados como marcadores de salud para el bienestar del animal, los mismos que pueden ser visualizados en la **tabla 8**.

Tabla 8. Propuesta de géneros y especies bacterianas con potencial probiótico.

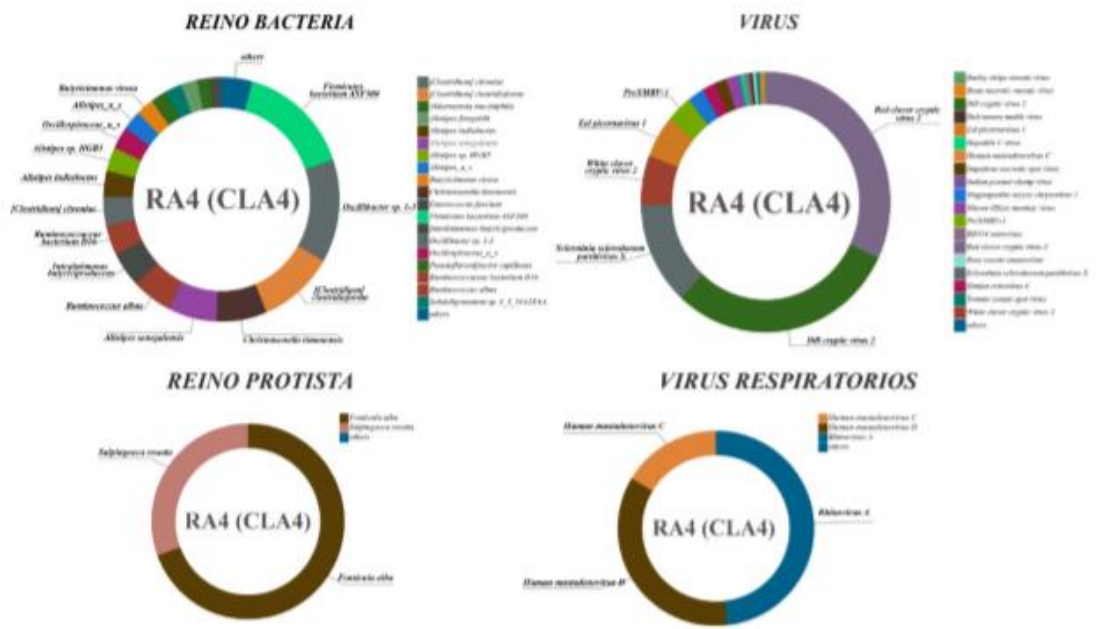
Género	Especie	Función reportada	Especie destino
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Según Chiquette <i>et al.</i> (2007), Mejorar la digestión de la fibra, estimula crecimiento de otras bacterias celulolíticas.	
Ruminococcus	<i>Ruminococcus albus</i>	Tiene un papel en la descomposición de la fibra en el rumen de los herbívoros y produce estructuras que participan en la adhesión de la bacteria a la celulosa. (Fujimori, 2021; Flint <i>et al.</i> , 2012)	Monogástricos herbívoros, pequeños y grandes rumiantes
	<i>Ruminococcus bromii</i>	Es una especie clave para la degradación del almidón resistente. (Chiquette <i>et al.</i> , 2007)	

Prevotella	<i>Prevotella ruminicola</i>	Son hemicelulíticas y fermenta un amplio rango de carbohidratos en el rumen de animales. (Chiquette <i>et al.</i> , 2008)	Monogástricos herbívoros, pequeños y grandes rumiantes
Fibrobacter	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Son celulolíticas contribuye de manera importante en la fermentación y digestión de la celulosa, pueden utilizarse en la producción de biocombustibles. (Khafipour <i>et al.</i> , 2009)	Monogástricos herbívoros, pequeños y grandes rumiantes
Roseburia	<i>Roseburia faecis</i>	Presencia en heces humanas (Berger <i>et al.</i> , 2021; Zou <i>et al.</i> , 2021)	Roedores, monogástricos herbívoros
Bacteroides	<i>Bacteroides uniformis</i>	Marcadores de bienestar y salud (Fabersani E <i>et al</i> 2021; Lee <i>et al</i> 2021)	Roedores, monogástricos herbívoros
Mucispirillum	<i>Mucispirillum schaedleri</i>	Marcadores de bienestar y salud (Herp <i>et al</i> 2019; Loy <i>et al</i> 2017)	Roedores, monogástricos herbívoros
Alistipes	<i>Alistipes indistinctus</i>	Marcadores de bienestar y salud (Parker <i>et al</i> 2020)	Roedores, monogástricos herbívoros
Clostridium	<i>Clostridium symbiosum</i>	Marcadores de bienestar del animal (Dihuan Lu <i>et al</i> 2020)	Roedores, monogástricos herbívoros, humanos

3.6 Caracterización de microorganismos asociados a la mejora de digestión y absorción de nutrientes con impacto en el peso y salud de cuyes

Se caracterizó el reino bacteria presente mayor abundancia y fue cuantificado taxonómicamente por especie en las ocho muestras, considerando la mayor abundancia relativa de las mismas. En ese sentido la muestra RA1 presento las especies bacterianas como *Sphaerochaeta_u* (35.03%), *Christensenella_u_s* (19.59%); RA2 *Methanobrevibacter_u_s* (66.11%) y *Ruminococcaceae_u_s* (9.25%); RA3 *Ruminococcus_u_s* (24.78%) y *Christensenella_u_s* (21.66%); muestra RA4 [*Clostridium*] *clostridioforme* 90A8 (33.31%), *Alistipes* (18.30%) y *Lachnospiraceae* (11.55%); RA5 *Oscillospiraceae_u_s* (59.37%), *Clostridiales_u_s* (18.24%); RI4 *Ruminococcus flavefaciens* (58.77%) y *Enterococcus_u_s* (20.88%); RI6 *Clostridiales_u_s* (22.92%) y *Ruminococcaceae_u_s* (19.69%); RP7 *Clostridiales_u_s* (39.90%) y *Christensenella_u_s* (15.28%).

Figura 15. Clasificación taxonómica y abundancia de microorganismos presentes en la muestra RA4.



IV. DISCUSIÓN

En el caso de mamíferos herbívoros, estos animales han desarrollado relaciones simbióticas con microorganismos del tracto gastrointestinal para facilitar la degradación de la fibra (Kohl *et al.*, 2014). Dentro de esta categoría de animales, podemos separar a los herbívoros rumiantes, en los cuales ocurre la fermentación bacteriana dentro de cámaras de fermentación en el estómago, y aquellos en los cuales la fermentación bacteriana de la fibra ocurre en regiones distales del tracto digestivo (denominados fermentadores post-gástricos como los equinos, conejos y cuy) (Kohl *et al.*, 2014). La mayoría de estudios de la diversidad microbiana se han enfocado en rumiantes y animales mayores, logrando encontrar que la gran mayoría de bacterias del tracto gastrointestinal pertenecen a los Phylum Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, y Fibrobacteres (Khafipour *et al.*, 2009); mientras que estudios en animales menores como el cuy siguen siendo escasos. En cuy, la comunidad bacteriana que se encarga de la fermentación de la fibra encontrada en el intestino grueso, principalmente en el ciego, el cual representa el 15% del peso del individuo y presenta rasgos específicos que le permiten degradar cuantiosas cantidades de fibra, similar a lo que ocurre en el estómago de los rumiantes (Jara *et al.*, 2019).

Según el objetivo 1, el análisis metagenómico de ciego de cuy realizado en este estudio reveló que los *Phylum* bacterianos más abundantes son Firmicutes y Bacteroidetes (llegando a representar más del 75% de la abundancia relativa), y en menor medida se encuentran bacterias pertenecientes a los *Phylum* *spirochaetota*, *Synergistota*, *Euryarchaeota*, *Campilobacterota*, *Verrucomicrobiota*, entre otros *Phylum*. En ese sentido estudios moleculares de bacterias cultivables a partir de ciego de cuy revelan también la existencia de bacterias del *Phylum firmicutes*, principalmente géneros como: *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*, en cuyes desde los 2 días hasta los 2 meses de edad (Porturas, 2011).

Takahashi *et al.*, (2005) mediante la técnica PCR-DGGE, la misma que permite separar fragmentos de ADN del mismo tamaño en base a la secuencia de estos fue usado caracterizar la diversidad microbiana en diferentes regiones de ciego de cuy, teniendo como resultado la presencia de especies de los géneros *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Treponema*, *Oscillospira*. Los mismos que fueron encontrados e identificados en la presente investigación, a excepción del género *Enterococcus*. Es decir, que el perfil del microbioma secuenciado, coincide en su mayoría con los mencionados en estudios realizados anteriormente.

En comparación con el microbioma de otras regiones del tracto gastrointestinal, se ha descrito que el microbioma intestinal en cuy está conformado por: Firmicutes (28.8%), Bacteroidetes (14.6%), Proteobacteria (9.4%), Verrucomicrobiota (2.1%) y en menor medida Euryarchaeota, Spirochaetota y Actinobacterias (Hildrbrant *et al.*, 2012). En comparación con el ciego de cuy, en esta investigación se observa una mayor abundancia relativa de los Firmicutes (58.37%) y Bacteroidetes (27.99%). El aumento en la abundancia relativa de estas bacterias en el ciego de cuy sugiere que los microorganismos pertenecientes a estos 2 Phylum cumplen roles fundamentales para la degradación de alimentos ricos en fibra. En relación a otros fermentadores post-gástricos, Crowley *et al.* (2017) describe que el Phylum más abundante en ciego de conejo es Firmicutes, llegando a representar el 40.3% del total de bacterias; seguido de Bacteroidetes, el cual alcanza aproximadamente un 40% de abundancia relativa. Por otro lado, Velasco-Galilea *et al.* (2018) encuentran una abundancia relativa del 76.46% del Phylum Firmicutes en ciego de conejo y solo del 7.458% para el Phylum Bacteroidetes. Mientras que, en caballo, Firmicutes y Bacteroidetes también son los Phylum predominantes, aunque existe una mayor abundancia relativa de Bacteroidetes (Su *et al.*, 2020). Es importante recalcar que pueden existir diferencias en la dominancia de ciertos Phylum entre estudios o animales a raíz de la dieta suministrada y el ambiente de crianza, por lo cual es necesario de un mayor número de estudios para especificar el “core” microbiano en ciego de cuy (O’Donnell *et al.*, 2017), por eso los resultados de esta investigación aplicando un

abordaje más robusto resalta la importancia de los *Phylum firmicutes* y Bacteriodetes dentro del microbioma de ciego de cuy.

Para cumplir con el segundo objetivo, el *Phylum firmicutes* descrito, específicamente el género *Ruminococcus* está compuesto por bacterias especialistas que permiten la degradación de estructuras celulolíticas, por lo cual forman parte del sistema gastrointestinal de mamíferos con dietas a base de material vegetal, lo que permite acceder a las partículas de almidón y convertirse en degradadores primarios de biomasa. De igual manera, se ha visto que especies del *Phylum fibrobacter* y especies de los géneros *Clostridium* y *Eubacterium* (ambos del *Phylum firmicutes*) comparten la función de la degradación de la celulosa en el tracto gastrointestinal de herbívoros (Fujimori, 2021; Flint *et al.*, 2012). Por su parte, el género *Prevotella* (*Phylum bacteriodetes*) participa activamente en la degradación de otros componentes secundarios de la pared celular (xilanos), así como compuestos almidonados y azúcares simples. (White *et al.*, 2014). Los oligosacáridos formados a partir de la degradación de los componentes de la fibra, pueden ser utilizados por bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta, en este caso bacterias productoras de butirato de la familia *Lachnospiraceae* (principalmente del género *Roseburia* y *Eubacterium*) son clave dentro la microbiota intestinal, ya que el butirato es un ácido graso de cadena corta que funciona como fuente de energía para las células epiteliales que recubren el intestino y como molécula antiinflamatoria (Berger *et al.*, 2021; Zou *et al.*, 2021). Por lo tanto, nuestro estudio también ha reportado la presencia de estos géneros en el ciego del cuy, evidenciando la importancia que tienen estos géneros en la degradación y absorción de nutrientes comparado el perfil microbiano de estructuras digestivas de otros animales. Además, hemos identificado en el ciego del cuy la presencia de arqueas del género *Methanobrevibacter* (productoras de metano a partir de CO₂ y H₂) y reportadas en el intestino de diferentes animales, las cuales eliminan el exceso de hidrógeno (producto de la fermentación bacteriana) mediante la generación de metano (Granja-Salcedo *et al.*, 2019).

Diferencias genéticas, morfológicas o fisiológicas propias de cada raza podrían influenciar la composición bacteriana, sin embargo, esta influencia puede

presentarse o no de acuerdo al tejido, región o especie estudiada. Bergamaschi *et al.* (2020) describen diferencias en el microbioma intestinal entre 3 razas de porcinos (Duroc, Landrace y Large White), principalmente en la abundancia de bacterias del género *Catenibacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides*, además encuentra una correlación entre 4 géneros de bacterias del Phylum Firmicutes (*Lactobacillus*, *Dorea*, *Blautia* y *Eubacterium*) y la eficiencia alimentaria. Similarmente, se ha descrito en felinos que tanto el microbioma oral y cutáneo está influenciado por la raza (y otros factores ambientales). Older *et al.* (2019) encontró diferencias en la abundancia de bacterias del género *Veillonellaceae*, *Porphyromonas* y *Lactobacillus* luego del análisis de dicho microbioma en diferentes razas de gato doméstico. A pesar de que algunos estudios fundamentan la influencia de la raza en el microbioma de ciertas regiones corporales y órganos, otros indican que existe poca o ninguna diferencia. El estudio de Fastrès *et al.* (2020) señala que la composición bacteriana del pulmón no se ve influenciada por la raza en perros, los resultados de esta investigación determinan luego del análisis de las regiones hipervariables V1-V3 del gen 16S rRNA en 5 razas de perros, donde pocos géneros bacterianos son únicos de ciertas razas. En ese sentido, en este estudio no se encuentran diferencias en el microbioma de ciego de cuy según la raza, puesto que en el índice de Shannon el P-value es 0.3690 así como en el índice de Bray Curtis cuyo valor de P es 0.025, lo cual indica que no existe una agrupación o formación de *clusters* según la raza. El índice de diversidad de Shannon permite realizar una estimación de la diversidad genética mediante el cálculo de la proporción de cada especie dentro de un ecosistema dado, lo cual da como resultado la abundancia de cada especie bacteriana en una localidad (o muestra) (Konopiński, 2020).

La comunidad microbiana que alberga el intestino del hospedero es vasta y dinámica, y las interacciones entre ambos tienen efectos profundos. Por ello, la alteración del microbioma normal, denominada disbiosis, puede conllevar a problemas digestivos, inmunes, neurobiológicos y de comportamiento. Esta disbiosis tiene un origen multifactorial, desde factores genéticos hasta alteraciones ambientales (Ma *et al.*, 2012). En el caso del ayuno, se ha estudiado su efecto en el microbioma de diferentes animales, en ratones se ha visto cambios en la

diversidad microbiana del colon luego de diferentes periodos de ayuno (Kohl *et al.*, 2014). En caballos, se ha observado que el ayuno por tan solo 12 horas disminuye la abundancia de bacterias del Orden Crostidiales en muestras fecales, las cuales son de suma importancia para el tracto gastrointestinal de esta especie (Schoster *et al.*, 2016). En esa misma línea, otro estudio también encontró cambios en la composición bacteriana de la mucosa gástrica de caballos luego de 12 horas de ayuno, logrando detectar una mayor dominancia de bacterias pertenecientes al Phylum Proteobacteria y Bacteriodetes (Perkins *et al.*, 2012). El cambio en el microbioma notados en estos estudios posiblemente se deba a la falta de sustratos/alimento para los microorganismos y otras alteraciones en las condiciones del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, este estudio analizó muestras de ciego de ejemplares que pasaron por un periodo de ayuno de 24 horas (tratamiento AY) y un grupo que fue alimentado constantemente hasta su beneficio (tratamiento AL). El análisis diferencial con respecto a la composición bacteriana entre ambos grupos revela diferencias en la abundancia relativa de ciertas especies, lo cual es corroborado por los índices de diversidad. Se observa que, independientemente de la raza, en los individuos que pasaron por un período de ayuno (AY) tuvieron una mayor abundancia de bacterias de los Phylum Euryarchaeota y Campilobacterota, y que en los ejemplares del grupo AL se encontró una mayor abundancia de bacterias del Phylum Spirochaetota. Mientras a nivel de género, hubo un aumento relativo de los géneros Prevotella, Muribaulaceae y Treponema en los ejemplares del grupo AL, a diferencia del tratamiento AY donde se observó un aumento en la abundancia de las bacterias de los géneros Methanobrevibacter y Ruminococcus, ya que existe una diferencia significativa entre AY y AL determinada mediante el análisis estadístico de PERMANOVA. En ese sentido, hay que considerar que ciertos cambios o variables que provocan estrés en el animal pueden perturbar el microbioma de ciego y sesgar los resultados en la composición microbiana mediante metagenómica.

Para cumplir con el tercer objetivo, existen géneros bacterianos con potencial probiótico, que al ser usados en esta especie de mamífero, puede generar efectos

positivos en su organismo, como se ha determinado que la suplementación con especies degradadoras de fibra (del género *Ruminococcus*) tiene un efecto en la composición microbiana y la digestión de la fibra. Chiquette *et al.* (2007) indican que la suplementación con *Ruminococcus flavefaciens* NJ puede estimular el crecimiento de otras bacterias celulolíticas y mejorar la digestión, esta especie fue identificada por nuestro estudio y estaría cumpliendo un rol en el proceso de degradación. También la especie *Ruminococcus albus* tiene un papel en la descomposición de fibra, por lo que produce estructuras que participan en la adhesión de la bacteria a la celulosa permitiendo su eficiencia en la digestión (Fujimori, 2021; Flint *et al.*, 2012); de igual forma, la especie *Ruminococcus bromii* es clave para la degradación del almidón resistentes (Chiquette *et al.*, 2007), el cual facilitaría la digestión de este tipo de nutrientes en el ciego del cuy.

Especies del género *Prevotella* descrita por (Chiquette *et al.*, 2008) es candidato para considerarse probiótico debido a que se ha comprobado los beneficios para el individuo suplementado con la cepa *P. bryantii* 25^a. En vacas que inician el periodo de lactancia mejora la digestión, aumenta la concentración de grasa en leche y disminuye la producción de lactato. En nuestro estudio identificamos la especie *Prevotella ruminicola* de característica hemecelulítica, cuya función dentro del aparato digestivo es fermentar un amplio rango de carbohidratos en el rumen de animales (Chiquette *et al.*, 2008), el cual al ser aplicado en la dieta de cuyes beneficiaría los procesos de absorción de este tipo de carbohidratos.

La especie *Fibrobacter succinogenes* identificadas en este estudio tienen como función reportada la fermentación y digestión de celulosa (Khafipour *et al.*, 2009) el cual podría formar parte de coctel de probióticos en la alimentación de cuyes. Los probióticos sirven como una solución más adecuada para asegurar el rendimiento de la alimentación, permite la ganancia de peso y aumento de la inmunología natural del animal, es la prevención de las variaciones de la flora, asegurando la presencia de un número suficiente de bacterias beneficiosas capaces de dominar el medio e inhibir el desarrollo de los patógenos (Carcelén. *et al.*, 2005).

La especie *Mucispirillum schaedleri* identificada en nuestro estudio fue reportada por varios estudios, la presencia de esta bacteria actúa como protector frente a infecciones que generan procesos inflamatorios como el caso de salmonelosis,

siendo demostrado por un estudio realizado por Herp *et al.*, (2019), donde la presencia de *Mucispirillum schaedleri* en el intestino de ratones confiere una protección contra la colitis a través de la inhibición del gen de invasión de salmonella. Así mismo la especie *Clostridium symbiosum* reportada en un estudio realizado por Franzosa *et al.*, 2019 mediante el enfoque metabolómico y secuenciación metagenómica en muestras de 58 pacientes con colitis ulcerativa, el estudio reveló que en estos pacientes la presencia de *Clostridium symbiosum* fue abundante en estos pacientes, esta bacteria podría ser utilizada como un marcador de bienestar de salud del animal. La misma bacteria fue descrita como marcador de pronóstico en paciente con cáncer colorectal, siendo que su presencia está asociada al diagnóstico temprano y una detección no invasiva de la enfermedad (Xie *et al.*, 2017). En este estudio se encontró que el género *Clostridium* se encuentra presente en las tres razas de cuyes, sin embargo, la raza Andina es la que tiene mejor representación, tanto en el grupo alimentado como el grupo de ayuno.

La especie *Alistipes indistinctus* fue reportada en un estudio realizado por Ryu *et al.*, (2019), esta bacteria forma parte de la microbiota humana, sin embargo, en procesos de infección como apendicitis aguda esta bacteria fue encontrada en cultivos de sangre de un paciente con esta enfermedad, para nuestro interés también podría ser parte de un marcador de bienestar del animal. En la presente investigación se identificó dicho género que tuvo mejor representación en la raza Inti, específicamente en el grupo de ayuno a diferencia del tratamiento alimentado, mientras que en la raza Andina y Perú no se observó cambios en las proporciones en los tratamientos estudiados.

Las especies como *Roseburia faecis*, *Bacteroides uniformis*, *Mucispirillum schaedleri*, *Alistipes indistinctus* y *Clostridium symbiosum* identificadas en nuestro estudio fueron reportadas por varios estudios asociados a problemas de salud y desarrollo de ciertas enfermedades (Berger *et al.*, 2021; Fabersani *et al.*, 2021; Herp *et al.*, 2019; Parker *et al.*, 2020 y Lu *et al.*, 2020) los mismos que tienen potencial de ser usados como marcadores preventivos en el desarrollo de

patologías, siendo de importancia en la investigación de enfermedades y tratamientos enfocados en la crianza de cuyes.

El cuarto objetivo, se realizó con el fin de caracterizar los microorganismos asociados a la mejora de digestión y absorción de nutrientes con impacto en el peso y salud de cuyes, los estudios correspondientes se realizaron con 8 muestras que pasaron el control de calidad. Teniendo como resultados, que el reino bacteria es el más abundante y el cual fue cuantificado taxonómicamente por especie en las ocho muestras, considerando la mayor abundancia relativa de las mismas. En ese sentido la muestra RA1 presento las especies bacterianas como *Sphaerochaeta_u* (35.03%), *Christensenella_u_s* (19.59%); RA2 *Methanobrevibacter_u_s* (66.11%) y *Ruminococcaceae_u_s* (9.25%); RA3 *Ruminococcus_u_s* (24.78%) y *Christensenella_u_s* (21.66%); muestra RA4 [*Clostridium*] *clostridioforme* 90A8 (33.31%), *Alistipes* (18.30%) y *Lachnospiraceae* (11.55%); RA5 *Oscillospiraceae_u_s* (59.37%), *Clostridiales_u_s* (18.24%); RI4 *Ruminococcus flavefaciens* (58.77%) y *Enterococcus_u_s* (20.88%); RI6 *Clostridiales_u_s* (22.92%) y *Ruminococcaceae_u_s* (19.69%); RP7 *Clostridiales_u_s* (39.90%) y *Christensenella_u_s* (15.28%). En ese sentido Gong et al. (2019) Reporta, la especie *Clostridiales_u_s* que pertenece al orden *Clostridiales* está presente en 7 muestras menos en la RI4, suele asociarse como parte del mecanismo inmune modulador en la eficacia del tratamiento contra el cáncer, correlacionando positivamente el bloqueo de la proteína PD-1 y los niveles de CD4+ y CD8+ células T en sangre y la abundancia selecta de miembros de este orden.

La especie *Oscillibacter_u_s* identificada en 7 muestras excluyendo la RI4, suele actuar junto a otras especies bacterianas como probióticos produciendo metabolitos 1 con función antiinflamatoria (Li et al. 2016), también se asocia con el estrés en animales por el 2 destete prematuro generando la disminución de esta especie bacteriana (Li et al. 2018). *Oscillospiraceae_u_s* especie identificada en 7 muestras menos en RI6 fue reportada en un 4 experimento utilizando ratones sometidos a una dieta rica en grasas, teniendo como resultado un 5 aumento en los niveles de esta especie junto a otras bacterias (Xiong et al. 2017).

V. CONCLUSIONES

- Las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S ARNr revela que los *Phylum firmicutes* y Bacteroidetes son los más abundantes (58.37% y 27.99% respectivamente) presentes en el ciego de cuy, siendo similares para las tres razas.
- El análisis metagenómico del ciego de cuy demuestra la presencia de géneros bacterianos (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Prevotella* y *Roseburia*) implicados en la degradación de fibra estando presentes en las tres razas.
- El análisis de las comunidades bacterianas en el ciego del cuy muestra la existencia de especies bacterianas con potencial uso probiótico, en la degradación de fibra (*Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella bryantii* y *Fibrobacter succinogenes*) en ciego del cuy.
- El análisis de las comunidades bacterianas en el ciego del cuy muestra la existencia de especies bacterianas con un potencial como marcadores de bienestar animal, (*Bacteroides uniformis*, *Mucispirillum*, *Alistipes indistinctus* y *Clostridium symbiosum*).
- El análisis de la diversidad alfa y beta indica que no hay diferencia estadística entre las razas Perú, Inti y Andina, ya que se determina que el perfil microbiano de cada muestra no se agrupan en clusters, esa misma tendencia se mantiene al comparar los tratamientos analizados.
- El análisis de la PERMANOVA permitió identificar diferencias significativas en el microbioma del ciego de cuy al comparar por pares a las razas y a los tratamientos, siendo las razas Andina e Inti y Perú e Inti, los que presentan mayor diferencia, así mismo entre los dos grupos de tratamientos.
- El análisis de la diversidad microbiana sugiere que el ayuno o privación de la comida por 24 horas tiene un efecto significativo en la composición microbiana de ciego de cuy, lo cual se debe a la falta de sustratos (alimento) para los microorganismos lo que conlleva a alteraciones en las condiciones normales del tracto gastrointestinal.

VI. RECOMENDACIONES

- Se debe realizar el análisis de la composición de otros microorganismos no bacterianos en ciego de cuy, por sus propiedades celulolíticas, así mismo analizar su especie.
- Se debe ampliar en el análisis del cultivo bacteriano e identificación de las propiedades catalíticas para el uso de cepas con posible potencial probiótico.
- En estudios futuros se debe caracterizar a nivel de especies mediante el cultivo y ensayos microbiológicos, incluso de metodologías de genotipificación de cepas que podrían ser patentadas y formar parte de un coctel de probióticos enfocados en la mejora de la producción de cuyes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al, K., Sarr, O., Dunlop, K., Gloor, G. B., Reid, G., Burton, J., & Regnault, T. R. (2017). Impact of birth weight and postnatal diet on the gut microbiota of young adult guinea pigs. *PeerJ*, 5, e2840.
- Aleman, M., Sheldon, S. A., Jospin, G., Coil, D., Stratton-Phelps, M., & Eisen, J. (2022). Caecal microbiota in horses with trigeminal-mediated headshaking. *Veterinary Medicine and Science*.
- Alonso Fernández, S. (2013). Utilización de la DGGE para la caracterización de la microbiota asociada a la manzana de sidra.
- Amon, P., & Sanderson, I. (2017). What is the microbiome?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 102(5), 257-260.
- Angelakis, E. (2017). Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*, 106, 162-170.
- Ataucusi, S. (2015). Manejo técnico de la crianza de cuyes en la sierra del Perú. *Biblioteca Nacional del Perú*, 2015. 15603
- Ayudthaya, S. P. N., van der Oost, H., van der Oost, J., van Vliet, D. M., & Plugge, C. M. (2019). Microbial Diversity and Organic Acid Production of Guinea Pig Faecal Samples. *Current microbiology*, 76(4), 425-434.
- Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., & Lund Nielsen, J. (2016). The microbiome of animals: implications for conservation biology. *International journal of genomics*, 2016.
- Beck, J. M., Young, V. B., & Huffnagle, G. B. (2012). The microbiome of the lung. *Translational research*, 160(4), 258-266

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... & Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1-22.
- Bergamaschi, M., Tiezzi, F., Howard, J., Huang, Y. J., Gray, K. A., Schillebeeckx, C., ... & Maltecca, C. (2020). Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine. *Microbiome*, 8(1), 1-15.
- Berger, K., Burleigh, S., Lindahl, M., Bhattacharya, A., Patil, P., Stålbbrand, H., ... & Adlercreutz, P. (2021). Xylooligosaccharides increase bifidobacteria and lachnospiraceae in mice on a high-fat diet, with a concomitant increase in short-chain fatty acids, especially butyric acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(12), 3617-3625.
- Blaser, M. J. (2014). The microbiome revolution. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4162-4165.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Bomba, A., Jonecová, Z., Gancarčíková, S., & Nemcová, R. (2006). The gastrointestinal microbiota of farm animals. *Gastrointestinal Microbiology*, 381-399.
- Bosco, N., & Noti, M. (2021). The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes & Immunity*, 22(5), 289-303.
- Bryant, M. P. (1959). Bacterial species of the rumen. *Bacteriological reviews*, 23(3), 125-153.
- Cajas A. 2008. Efecto de la utilización de chocho (*Lupinus mutabilis* sweet) como Antiparasitario gastrointestinal en cuyes bajo diferentes tiempos de maceración y Cocción. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Riobamba: Esc. Sup. Politécnica de Chimborazo. 114 p
- Caporaso JG, *et al.* (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal* 6(8):1621-1624.

- Carcelén, F.; Torres, M.; Ara, M. (2005). Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 16 (2). Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php>.
- Carcelén, F., Alvarado, A., Mires, R., Porturas, K., Rodríguez, J., Agapito, J., ... & San Martín, F. (2010). Identificación preliminar de microflora bacteriana en el ciego del cuy (*Cavia porcellus*).
- Carmody, R. N., Gerber, G. K., Luevano Jr, J. M., Gatti, D. M., Somes, L., Svenson, K. L., & Turnbaugh, P. J. (2015). Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell host & microbe*, 17(1), 72-84.
- Chauca, L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO. 78 p.
- Chauca Francia, L., Muscari Greco, J., Vega Herrera, L., & Higaonna Oshiro, R. (2004). Formación de una raza sintética de cuyes.
- Chauca Francia, L., Muscari Greco, J., & Higaonna Oshiro, R. (2005). Generación de razas mejoradas de cuyes de alta productividad.
- Chauca L. 2007. Realidad y perspectiva de la crianza de cuyes en los países andinos. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal* Vol. 15. Cuzco, Perú
- Chiquette, J., Talbot, G., Markwell, F., Nili, N., & Forster, R. J. (2007). Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus flavefaciens* NJ along with a probiotic mixture in forage or concentrate-fed dairy cows: effect on ruminal fermentation, cellulolytic populations and in sacco digestibility. *Canadian journal of animal science*, 87(2), 237-249.
- Chiquette, J., Allison, M. J., & Rasmussen, M. A. (2008). *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3536-3543.

- Cholewińska, P., Czyż, K., Nowakowski, P., & Wyrostek, A. (2020). The microbiome of the digestive system of ruminants—a review. *Animal Health Research Reviews*, *21*(1), 3-14.
- Choudhury, P. K., Salem, A. Z. M., Jena, R., Kumar, S., Singh, R., & Puniya, A. K. (2015). Rumen microbiology: An overview. *Rumen microbiology: from evolution to revolution*, 3-16.
- Coelho, L. P., Kultima, J. R., Costea, P. I., Fournier, C., Pan, Y., Czarnecki-Maulden, G., ... & Bork, P. (2018). Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome*, *6*(1), 1-11.
- Crowley, E. J., King, J. M., Wilkinson, T., Worgan, H. J., Huson, K. M., Rose, M. T., & McEwan, N. R. (2017). Comparison of the microbial population in rabbits and guinea pigs by next generation sequencing. *PloS one*, *12*(2), e0165779.
- Cruz-Leyva, M. C. D. L., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., & Rojas-Herrera, R. A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, *2*(4), 99-115.
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2015). More than a gut feeling: the microbiota regulates neurodevelopment and behavior. *Neuropsychopharmacology*, *40*(1), 241.
- Dave, M., Higgins, P. D., Middha, S., & Rioux, K. P. (2012). The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research*, *160*(4), 246-257.
- de Oliveira, M. N. V., Jewell, K. A., Freitas, F. S., Benjamin, L. A., Tótola, M. R., Borges, A. C., ... & Suen, G. (2013). Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Veterinary microbiology*, *164*(3-4), 307-314.
- Dearing, M. D. & Kohl, K. D. (2017). Beyond fermentation: other important services provided to endothermic herbivores by their gut microbiota. *Integrative and comparative biology*, *57*(4), 723-731.

- Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 23(1), 122.
- Díaz, O, Gerardo, Rosadio A, Raúl, Marcelo M, Geraldine, Chero O, Ana, Jiménez A, Ronald, Reyna W, Iván, & Maturrano H, Lenin. (2017). Evaluación de una Técnica de PCR-Múltiple para la Detección Rápida de Salmonella Typhimurium y Enteritidis en Cuyes (*Cavia porcellus*) Naturalmente Infectados. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3), 713-722.
- Donia, M. S., Fricke, W. F., Partensky, F., Cox, J., Elshahawi, S. I., White, J. R., ... & Schmidt, E. W. (2011). Complex microbiome underlying secondary and primary metabolism in the tunicate-Prochloron symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), E1423-E1432.
- Duarte, S. A. F., Cássio, F., & Pascoal, C. (2012). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology: insights from freshwaters.
- Esquivel, D. F. A. (2016). *Caracterización genética del cuy doméstico de américa del sur mediante marcadores moleculares*. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. España. 2016.
- Fabersani E, Portune K, Campillo I, López-Almela I, la Paz SM, Romaní-Pérez M, Benítez-Páez A, Sanz Y. Bacteroides uniformis CECT 7771 alleviates inflammation within the gut-adipose tissue axis involving TLR5 signaling in obese mice. *Sci Rep*. 2021 Jun 3;11(1):11788. doi: 10.1038/s41598-021-90888-y. PMID: 34083551; PMCID: PMC8175583.
- Fan, P., Bian, B., Teng, L., Nelson, C. D., Driver, J., Elzo, M. A., & Jeong, K. C. (2020). Host genetic effects upon the early gut microbiota in a bovine model with graduated spectrum of genetic variation. *The ISME journal*, 14(1), 302-317.
- Fang, S., Chen, X., Pan, J., Chen, Q., Zhou, L., Wang, C., ... & Gan, Q. F. (2020). Dynamic distribution of gut microbiota in meat rabbits at different growth stages and relationship with average daily gain (ADG). *BMC microbiology*, 20(1), 1-13.

- Fastrès, A., Roels, E., Vangrinsven, E., Taminiau, B., Jabri, H., Bolen, G., ... & Clercx, C. (2020). Assessment of the lung microbiota in dogs: influence of the type of breed, living conditions and canine idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC microbiology*, 20(1), 1-13.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, 3(4), 289-306.
- Francino, M. P. (2016). Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in microbiology*, 1543.
- Fujimori, S. (2021). Humans have intestinal bacteria that degrade the plant cell walls in herbivores. *World Journal of Gastroenterology*, 27(45), 7784.
- Galloway-Peña, J., & Hanson, B. (2020). Tools for analysis of the microbiome. *Digestive diseases and sciences*, 65(3), 674-685.
- Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., & Chen, F. (2018). Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein & cell*, 9(5), 488-500.
- Giannattasio-Ferraz, S., Laguardia-Nascimento, M., Gasparini, M. R., Leite, L. R., Araujo, F. M. G., de Matos Salim, A. C., ... & Barbosa-Stancioli, E. F. (2019). A common vaginal microbiota composition among breeds of *Bos taurus indicus* (Gyr and Nellore). *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(4), 1115-1124.
- Gong, J., A. Chehrazi-Raffle, V. Placencio-Hickok, M. Guan, A. Hendifar & R. Salgia (2019) The gut microbiome and response to immune checkpoint inhibitors: preclinical and clinical strategies. *Clin Transl Med*, 8, 9.
- Gouba, N., Hien, Y. E., Guissou, M. L., Fonkou, M. D. M., Traoré, Y., & Tarnagda, Z. (2019). Digestive tract mycobiota and microbiota and the effects on the immune system. *Human Microbiome Journal*, 12, 100056.
- Gower, J. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 53, 325–338.

- Granja-Salcedo, Y. T., Fernandes, R. M., Araujo, R. C. D., Kishi, L. T., Berchielli, T. T., Resende, F. D. D., ... & Siqueira, G. R. (2019). Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 614.
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews microbiology*, *9*(4), 244-253.
- Guacho, M.I. (2009). Valoración energética de diferentes tipos de balanceado utilizados en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus*). Tesis. Ingeniero Zootecnista. Jalisco, México. Universidad de Guadalajara. 75 p.
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., & Weitz, J. S. (2013). Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *The ISME journal*, *7*(6), 1092-1101.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, *5*(10), R245-R249.
- Hargaden, M., & Singer, L. (2012). Anatomy, physiology, and behavior. In *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents* (pp. 575-602). Academic Press.
- Hecht S 2010 The new rurality: Globalization, peasants and the paradoxes of landscapes. *Land Use Policy*, *27*(2), 161-169.
- Heil, B. A., Paccamonti, D. L., & Sones, J. L. (2019). Role for the mammalian female reproductive tract microbiome in pregnancy outcomes. *Physiological Genomics*, *51*(8), 390-399.
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., & Janssen, P. H. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*, *5*(1), 1-15.
- Herp S, Brugiroux S, Garzetti D, Ring D, Jochum LM, Beutler M, Eberl C, Hussain S, Walter S, Gerlach RG, Ruscheweyh HJ, Huson D, Sellin ME, Slack E, Hanson B,

- Loy A, Baines JF, Rausch P, Basic M, Bleich A, Berry D, Stecher B. *Mucispirillum schaedleri* Antagonizes Salmonella Virulence to Protect Mice against Colitis. *Cell Host Microbe*. 2019 May 8;25(5):681-694.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.03.004. Epub 2019 Apr 18. PMID: 31006637.
- Herstad, K. M., Gajardo, K., Bakke, A. M., Moe, L., Ludvigsen, J., Rudi, K., ... & Skancke, E. (2017). A diet change from dry food to beef induces reversible changes on the faecal microbiota in healthy, adult client-owned dogs. *BMC veterinary research*, 13(1), 1-13.
- Hildebrand, F., Ebersbach, T., Nielsen, H. B., Li, X., Sonne, S. B., Bertalan, M., ... & Raes, J. (2012). A comparative analysis of the intestinal metagenomes present in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and humans (*Homo sapiens*). *BMC genomics*, 13(1), 514.
- Hoffmann, A. R., Proctor, L. M., Surette, M. G., & Suchodolski, J. S. (2016). The microbiome: the trillions of microorganisms that maintain health and cause disease in humans and companion animals. *Veterinary pathology*, 53(1), 10-21.
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481-483.
- INEI Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012. IV Censo Nacional Agropecuario 2012.
- Jara, M., Valencia, R., Chauca, L., & Torres, L. (2019). Contribución al estudio anatómico e histológico del ciego del cuy (*Cavia porcellus*) raza Perú. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 6 (2) (2018), 100-114.
- Jilge, V. B. (1980). The gastrointestinal transit time in the guinea-pig. *Zeitschrift fur Versuchstierkunde*, 22(4), 204-210.
- Julliand, V., & Grimm, P. (2016). HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *Journal of animal science*, 94(6), 2262-2274.

- Kauter, A., Epping, L., Semmler, T., Antao, E. M., Kannapin, D., Stoeckle, S. D., ... & Walther, B. (2019). The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. *Animal Microbiome*, *1*(1), 1-15.
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C., & Krause, D. O. (2009). Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and environmental microbiology*, *75*(22), 7115-7124.
- Knecht, D., Cholewińska, P., Jankowska-Mąkosa, A., & Czyż, K. (2020). Development of swine's digestive tract microbiota and its relation to production indices—a review. *Animals*, *10*(3), 527.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., ... & Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 410-422.
- Kohl, K. D., Amaya, J., Passemant, C. A., Dearing, M. D., & McCue, M. D. (2014). Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: a comparative study across five classes of vertebrate hosts. *FEMS microbiology ecology*, *90*(3), 883-894.
- Kohl, K. D., Miller, A. W., Marvin, J. E., Mackie, R., & Dearing, M. D. (2014). Herbivorous rodents (*Neotoma* spp.) harbour abundant and active foregut microbiota. *Environmental Microbiology*, *16*(9), 2869-2878.
- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, *8*, e9391.
- Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The scientist*, *15*(7), 8-8.
- Lee HB, Do MH, Jhun H, Ha SK, Song HS, Roh SW, Chung WH, Nam YD, Park HY. Amelioration of Hepatic Steatosis in Mice through *Bacteroides uniformis* CBA7346-Mediated Regulation of High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Lipogenesis.

Nutrients. 2021 Aug 27;13(9):2989. doi: 10.3390/nu13092989. PMID: 34578867; PMCID: PMC8471872.

Legendre, P. (2014). Interpreting the replacement and richness difference components of beta diversity. *Global Ecology and Biogeography*, 23(11), 1324-1334.

Leser, T. D., & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology*, 11(9), 2194-2206.

Li, H. (2015). Microbiome, metagenomics, and high-dimensional compositional data analysis. *Annual Review of Statistics and Its Application*, 2, 73-94.

Li, J., C. Y. Sung, N. Lee, Y. Ni, J. Pihlajamäki, G. Panagiotou & H. El-Nezami (2016) Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E1306-15. 12

Li, Y., Y. Guo, Z. Wen, X. Jiang, X. Ma & X. Han (2018) Weaning Stress Perturbs Gut Microbiome and Its Metabolic Profile in Piglets. *Sci Rep*, 8, 18068.

Li, F., Hitch, T. C., Chen, Y., Creevey, C. J., & Guan, L. L. (2019). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, 7(1), 1-21.

Linaje, R., Coloma, M. D., Pérez-Martínez, G., & Zuniga, M. (2004). Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains. *Journal of applied microbiology*, 96(4), 761-771.

Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Franceschi, F., & Gasbarrini, A. (2014). The gastrointestinal microbiome—functional interference between stomach and intestine. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 28(6), 995-1002.

Loy A, Pfann C, Steinberger M, Hanson B, Herp S, Brugiroux S, Gomes Neto JC, Boekschoten MV, Schwab C, Urich T, Ramer-Tait AE, Rattei T, Stecher B, Berry D. Lifestyle and Horizontal Gene Transfer-Mediated Evolution of *Mucispirillum schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *mSystems*. 2017 Jan

31;2(1):e00171-16. doi: 10.1128/mSystems.00171-16. PMID: 28168224; PMCID: PMC5285517.

Lu D, Huang Y, Kong Y, Tao T, Zhu X. Gut microecology: Why our microbes could be key to our health. *Biomed Pharmacother.* 2020 Nov;131:110784. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110784. Epub 2020 Sep 23. PMID: 33152942.

Ma, B. W., Bokulich, N. A., Castillo, P. A., Kananurak, A., Underwood, M. A., Mills, D. A., & Bevens, C. L. (2012). Routine habitat change: a source of unrecognized transient alteration of intestinal microbiota in laboratory mice.

Malmuthuge, N., Griebel, P. J., & Guan, L. L. (2014). Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. *Applied and environmental microbiology*, 80(6), 2021-2028.

Marchesi, J. R. (Ed.). (2014). *The human microbiota and microbiome*. CABI.

Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1-3.

Martín, R., Miquel, S., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2014). The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence*, 5(3), 413-423.

Martinez-Guryn, K., Leone, V., & Chang, E. B. (2019). Regional diversity of the gastrointestinal microbiome. *Cell host & microbe*, 26(3), 314-324.

McCann, J. C., Wickersham, T. A., & Loor, J. J. (2014). High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinformatics and biology insights*, 8, BBI-S15389.

Munoz-Benavent, M., Pérez-Cobas, A. E., García-Ferris, C., Moya, A., & Latorre, A. (2021). Insects' potential: understanding the functional role of their gut microbiome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194, 113787.

- Neroni, B., Evangelisti, M., Radocchia, G., Di Nardo, G., Pantanella, F., Villa, M. P., & Schippa, S. (2021). Relationship between sleep disorders and gut dysbiosis: what affects what?. *Sleep Medicine*, 87, 1-7.
- Nieuwdorp, M., Giliyamse, P. W., Pai, N., & Kaplan, L. M. (2014). Role of the microbiome in energy regulation and metabolism. *Gastroenterology*, 146(6), 1525-1533.
- North, D., 1999. The guinea pig seventh ed. Poole, T. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 1. Blackwell Science, Ltd., London, pp. 367–388.
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühlendorfer, K., Sauer, S., Grossart, H. P., & Greenwood, A. D. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
- O'Donnell, M. M., Harris, H. M., Ross, R. P., & O'Toole, P. W. (2017). Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *Microbiologyopen*, 6(5), e00509.
- Older, C. E., Diesel, A. B., Lawhon, S. D., Queiroz, C. R., Henker, L. C., & Rodrigues Hoffmann, A. (2019). The feline cutaneous and oral microbiota are influenced by breed and environment. *PloS one*, 14(7), e0220463.
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1), 1-15.
- Palakawong Na Ayudthaya, S., Hilderink, L. J., Oost, J. V., Vos, W. M., & Plugge, C. M. (2017). *Streptococcus caviae* sp. nov., isolated from guinea pig faecal samples. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1551–1556. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001758>
- Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health.

Front Immunol. 2020 Jun 9;11:906. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906. PMID: 32582143; PMCID: PMC7296073.

Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial genomics*, 6(8).

Perkins, G. A., Den Bakker, H. C., Burton, A. J., Erb, H. N., McDonough, S. P., McDonough, P. L., ... & Simpson, K. W. (2012). Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2522-2532.

Porter, T. M., & Brian Golding, G. (2011). Are similarity-or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. *New Phytologist*, 192(3), 775-782.

Porturas Araujo, K. (2011). Aislamiento e identificación por técnicas moleculares de aislados bacterianos pertenecientes a géneros con potencial aplicación probiótica presentes en el intestino de cuyes (*Cavia porcellus*).

Puente V, Jhosseline, Carcelén C, Fernando, Ara G, Miguel, Bezada Q, Sandra, Huamán C, Amparo, Santillán, Gilberto, Perales, Rosa, Guevara V, Jorge, & Asencios M, Ana. (2019). Efecto de la suplementación con niveles crecientes de probióticos sobre la histomorfometría del intestino delgado del cuy (*Cavia porcellus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 624-633.

Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H., & De Vos, W. M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental microbiology*, 9(9), 2125-2136.

Richerich P. Estimation of errors in "raw" DNA sequences: a validation study. *Genome Res.* 1998 Mar;8(3):251-9. doi: 10.1101/gr.8.3.251. PMID: 9521928; PMCID: PMC310698.

Riechmann J (Ed.) 2003 Cuidar la Tierra: Políticas agrarias y alimentarias sostenibles para entrar en el siglo XXI (I ed.). Barcelona.

- Rosewarne, C. P., Cheung, J. L., Smith, W. J., Evans, P. N., Tomkins, N. W., Denman, S. E., ... & Morrison, M. (2012). Draft genome sequence of *Treponema* sp. strain JC4, a novel spirochete isolated from the bovine rumen.
- Rosmini, M. R., Sequeira, G. J., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L. E., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., & Bonazza, J. C. (2004). Probiotic production for meat animals: importance of using indigenous intestinal microbiota. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3, 181-191.
- Sachser, N., Künzl, C., & Kaiser, S. (2007). The welfare of laboratory guinea pigs. *Springer*, 181-209.
- Sakaguchi, E., & Nabata, A. K. E. M. I. (1992). Comparison of fibre digestion and digesta retention time between nutrias (*Myocaster coypus*) and guinea-pigs (*Cavia porcellus*). *Comparative biochemistry and physiology. Comparative physiology*, 103(3), 601-604.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British journal of nutrition*, 80(S1), S147-S171.
- Sandweiss, D. H., & Wing, E. S. (1997). Ritual rodents: the guinea pigs of Chincha, Perú. *Journal of Field Archaeology*, 24(1), 47-58.
- Schoster, A., Mosing, M., Jalali, M., Staempfli, H. R., & Weese, J. S. (2016). Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. *Equine veterinary journal*, 48(5), 595-602.
- Schulfer, A., & Blaser, M. J. (2015). Risks of antibiotic exposures early in life on the developing microbiome. *PLoS pathogens*, 11(7), e1004903.
- Shah, N., Tang, H., Doak, T. G., & Ye, Y. (2011). Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Biocomputing*, 165-176.
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.

- Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H., & Mazmanian, S. K. (2016). The central nervous system and the gut microbiome. *Cell*, *167*(4), 915-932.
- Sheh, A., & Fox, J. G. (2013). The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut microbes*, *4*(6), 505-531.
- Shin, J., Lee, S., Go, M. J., Lee, S. Y., Kim, S. C., Lee, C. H., & Cho, B. K. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Scientific reports*, *6*(1), 1-10.
- Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, *31*(1), 69.
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D. I., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., ... & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of translational medicine*, *15*(1), 1-17.
- 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.
- Spotorno, A. E., Marín, J. C., Manríquez, G., Valladares, J. P., Rico, E. D., & Rivas, C. (2006). Ancient and modern steps during the domestication of guinea pigs (*Cavia porcellus* L.). *Journal of Zoology*, *270*(1), 57-62.
- Su, S., Zhao, Y., Liu, Z., Liu, G., Du, M., Wu, J., ... & Dugarjaviin, M. (2020). Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments of Mongolian horses. *MicrobiologyOpen*, *9*(6), 1085-1101.
- Suryanarayana, M. V. A. N., Sreedhar, S., & Babu, B. J. (2013). Interactive effect of prebiotic (oligofructose) and probiotic (saccharomyces) feed additives on nutrient utilization, growth, feed conversion and faecal microbiota population in pigs. *Animal Science*, *7*(3).
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., & Benno, Y. (1999). Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS microbiology ecology*, *29*(2), 159-169.

- Takahashi, T., Karita, S., Yahaya, M. S., & Goto, M. (2005). Radial and Axial Variations of Bacteria within the Cecum and Proximal Colon of Guinea Pigs Revealed by PCR–DGGE. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(9), 1790-1792.
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., ... & Webster, N. S. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature communications*, 7(1), 1-12.
- Torres R, Azócar G, Rojas J, Montesinos A, Paredes P 2015 Vulnerability and resistance to neoliberal environmental changes: An assessment of agriculture and forestry in the Biobio region of Chile (1974–2014). *Geoforum*, 60(0), 107-122.
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249.
- Tsukahara, T., & Ushida, K. (2000). Effects of animal or plant protein diets on cecal fermentation in guinea pigs (*Cavia porcellus*), rats (*Rattus norvegicus*) and chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 127(2), 139-146.
- Valderrama, Nilton & Torres, Hugo & Lapa, Rainer. (2020). Microorganismos asociados a la mejora de digestión y absorción de nutrientes con impacto en el peso y salud de cuyes. 10.38202/agronegocios8.
- Valdizán, C., Carcelén, F., Ara, M., Bezada, S., Jiménez, R., Asencios, A., & Guevara, J. (2019). Efecto de la inclusión de probiótico, prebiótico y simbiótico en la dieta sobre los parámetros productivos del cuy (*Cavia porcellus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 590-597.
- Velasco-Galilea, M., Piles, M., Viñas, M., Rafel, O., González-Rodríguez, O., Guivernau, M., & Sánchez, J. P. (2018). Rabbit microbiota changes throughout the intestinal tract. *Frontiers in microbiology*, 9, 2144.
- Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.

- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.
- Wang, W. L., Xu, S. Y., Ren, Z. G., Tao, L., Jiang, J. W., & Zheng, S. S. (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(3), 803.
- Wang, Y., Zhang, H., Zhu, L., Xu, Y., Liu, N., Sun, X., ... & Zhu, R. (2018). Dynamic distribution of gut microbiota in goats at different ages and health states. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2509.
- Weimer, P. J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in microbiology*, 6, 296.
- White, B. A., Lamed, R., Bayer, E. A., & Flint, H. J. (2014). Biomass utilization by gut microbiomes. *Annu Rev Microbiol*, 68(1), 279-96.
- Xie YH, Gao QY, Cai GX, Sun XM, Sun XM, Zou TH, Chen HM, Yu SY, Qiu YW, Gu WQ, Chen XY, Cui Y, Sun D, Liu ZJ, Cai SJ, Xu J, Chen YX, Fang JY. Fecal *Clostridium symbiosum* for Noninvasive Detection of Early and Advanced Colorectal Cancer: Test and Validation Studies. *EBioMedicine*. 2017 Nov;25:32-40. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.10.005. Epub 2017 Oct 4. Erratum in: *EBioMedicine*. 2018 Feb 20;:. Sun, Xiao-Ming [corrected to Sun, Xiao-Min]. PMID: 29033369; PMCID: PMC5704049.
- Xiong, X., E. S. Bales, D. Ir, C. E. Robertson, J. L. McManaman, D. N. Frank & J. Parkinson (2017) Perilipin-2 modulates dietary fat-induced microbial global gene expression profiles in the mouse intestine. *Microbiome*, 5, 117.
- Xu, Z., & Knight, R. (2015). Dietary effects on human gut microbiome diversity. *British Journal of Nutrition*, 113(S1), S1-S5.
- Yanabe, M., Shibuya, M., Gonda, T., ASAI, H., TANAKA, T., SUDOU, K., ... & ITOH, K. (2001). Establishment of specific pathogen-free guinea-pig colonies using

- limited-flora guinea-pigs associated with conventional guinea-pig flora, and monitoring of their cecal flora. *Experimental animals*, 50(2), 105-113.
- Ye, X., Zhou, L., Zhang, Y., Xue, S., Gan, Q. F., & Fang, S. (2021). Effect of host breeds on gut microbiome and serum metabolome in meat rabbits. *BMC veterinary research*, 17(1), 1-13.
- Youngblut, N. D., Reischer, G. H., Walters, W., Schuster, N., Walzer, C., Stalder, G., ... & Farnleitner, A. H. (2019). Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *Nature communications*, 10(1), 1-15.
- Zeng, X., Li, Q., Yang, C., Yu, Y., Fu, Z., Wang, H., ... & Xu, Y. (2021). Effects of *Clostridium butyricum*-and *Bacillus* spp.-based potential probiotics on the growth performance, intestinal morphology, immune responses, and caecal microbiota in broilers. *Antibiotics*, 10(6), 624.
- Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L., & Zhao, L. (2012). Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *The ISME journal*, 6(10), 1848-1857.
- Zhang, L., Jiang, X., Li, A., Waqas, M., Gao, X., Li, K., ... & Li, J. (2020). Characterization of the microbial community structure in intestinal segments of yak (*Bos grunniens*). *Anaerobe*, 61, 102115.
- Zhu, Y., Wang, C., & Li, F. (2015). Impact of dietary fiber/starch ratio in shaping caecal microbiota in rabbits. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(10), 771-784.
- Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., & Gaskins, H. R. (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of nutrition*, 134(2), 465-472.
- Zou, Y., Xue, W., Lin, X., Lv, M., Luo, G., Dai, Y., ... & Xiao, L. (2021). *Butyribacter intestini* gen. nov., sp. nov., a butyric acid-producing bacterium of the family Lachnospiraceae isolated from human faeces, and reclassification of *Acetivibrio*

ethanolgignens as *Acetanaerobacter ethanolgignens* gen. nov., comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(3), 126201.

ANEXOS

Anexo 1. Características fenotípicas de los individuos de estudio

RAZA	ARETE	EDAD	COLOR OJO	DEDOS			
				M. DER	M. IZQ	P. DER	P. IZQ
1- Perú	188	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
1- Perú	189	90 días	Ojo Negro	6	6	5	5
1- Perú	190	90 días	Ojo Rojo	4	4	3	3
1- Perú	Morado	90 días	Ojo Y Oreja Negro	6	6	6	6
1- Perú	SN	90 días	Ojo Negro	4	4	4	4
2- Perú	M. DER.	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
2- Perú	M. IZQ.	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
2- Perú	PIE. DER	90 días	Ojo Negro	7	7	6	6
2- Perú	Morado	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
2- Perú	SN	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
1-Inti	182	90 días	Ojo Negro	6	6	6	6
1-Inti	183	90 días	Ojo Negro	5	6	5	6
1-Inti	184	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
1-Inti	Morado	90 días	Ojo Negro	6	6	6	6
1-Inti	SN	90 días	Ojo Negro	6	6	6	6
2-Inti	185	90 días	Ojo Negro	6	6	5	5
2-Inti	186	90 días	Ojo Negro	6	6	6	6
2-Inti	187	90 días	Ojo Rojo	6	6	6	6
2-Inti	Morado	90 días	Ojo Negro	6	6	5	6
2-Inti	SN	90 días	Ojo Negro	6	6	5	5
1-Andino	176	90 días	Ciego O. D	6	6	6	6
1-Andino	177	90 días	Ojo Negro	6	6	5	5
1-Andino	178	90 días	Ojo Negro	6	5	4	4
1-Andino	Morado	90 días	Ojo Negro	6	6	5	6
1-Andino	SN	90 días	Ojo Negro	5	5	5	5
2- Andino	179	90 días	Ojo Negro	6	6	4	4
2- Andino	180	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
2- Andino	181	90 días	Ojo Negro	4	4	3	3
2- Andino	Morado	90 días	Ojo Negro	6	6	5	5
2- Andino	SN	90 días	Ojo Negro	6	6	6	6

M. DER: miembro anterior derecho; M. IZQ: Miembro anterior izquierdo;
P. DER: Miembro posterior derecho; P. IZQ: Miembro posterior izquierdo; Arete: identificación de individuo.

Anexo 2. Parámetros de calidad de muestras de ADN de ciego de cuy pre y post-purificación

Muestra	PRE-PURIFICACIÓN				POST-PURIFICACIÓN			
	Concentración ng/uL	A260/280	A260/230	TOTAL DE DNA (ug)	Concentración ng/uL	A260/280	A260/230	TOTAL DE DNA (ug)
INT1 AL	101,9	1,85	2,19	4,076	154	1,84	2,3	3,08
INT2 AL	67,9	1,78	1,41	2,716	151,7	1,86	2,15	3,034
INT3 AL	337,8	1,87	2,83	13,512	382,2	1,88	2,43	7,644
INT4 AL	49,2	1,84	2,16	1,968	230,1	1,87	2,41	4,602
INT 5 AL	111,3	1,86	2,27	4,452	204	1,85	2,38	4,08
INT1 AY	472,5	1,88	2,31	18,9	352,1	1,88	2,42	7,042
INT2 AY	452,9	1,86	2,16	18,116	147,3	1,83	2,05	2,946
INT3 AY	133,1	1,86	2,29	5,324	264	1,87	2,39	5,28
INT4 AY	326,6	1,85	2,09	13,064	198,2	1,86	2,42	3,964
INT5 AY	132,8	1,85	2,21	5,312	166,9	1,87	2,44	3,338
P1 AL	267	1,84	1,87	10,68	182,9	1,86	2,29	3,658
P2 AL	410,3	1,85	2,23	16,412	285,3	1,87	2,41	5,706
P3 AL	515,7	1,86	2,15	20,628	111,3	1,84	2,19	2,226
P4 AL	659,5	1,89	2,28	26,38	200,4	1,84	1,97	4,008
P5 AL	146,9	1,85	2,15	5,876	181,2	1,86	2,34	3,624
P1 AY	431,5	1,89	2,32	17,26	294,7	1,88	2,47	5,894
P2 AY	154,6	1,85	2,08	6,184	201	1,87	2,42	4,02
P3 AY	462,4	1,86	2,2	18,496	303,9	1,87	2,39	6,078
P4 AY	242,5	1,87	2,31	9,7	115,4	1,85	2,35	2,308
P5 AY	229,8	1,84	1,98	9,192	244,4	1,86	2,43	4,888
AND1 AL	313,2	1,86	2,08	12,528	185,6	1,87	2,4	3,712
AND2 AL	45,2	1,82	1,41	1,808	76	1,88	2,22	1,52
AND3 AL	163,8	1,88	2,35	6,552	232,9	1,87	2,44	4,658
AND4 AL	134,6	1,81	1,65	5,384	194,7	1,86	2,26	3,894
AND5 AL	223,9	1,86	2,24	8,956	194,5	1,86	2,4	3,89
AND1 AY	833	1,87	2,28	33,32	571,1	1,89	2,39	11,422
AND2 AY	640,4	1,82	2,1	25,616	324,5	1,88	2,43	6,49
AND3 AY	791,6	1,86	2,22	31,664	338,8	1,89	2,38	6,776
AND4 AY	436,1	1,88	2,19	17,444	214,7	1,87	2,44	4,294
AND5 AY	479,4	1,88	2,2	19,176	172,9	1,86	2,26	3,458

Sigla ng: nanogramas; ug: microgramos; uL: microlitros. La tabla muestra índices de contaminación por proteínas (A260/A280≈1.8-2) y sales (A260/A230≈2), indicando la pureza de la muestra.

Anexo 3. Control de peso semanal

RAZA		COLOR OJO	DEDOS				PESO LLEGADA	SEMANA I	SEMANA II	SEMANA III	SEMANA IV	SEMANA V
LINEA	ARETE		M. DER	M. IZQ	P. DER	P. IZQ	24/02/2021	3/03/2021	10/02/2021	17/03/2021	24/03/2021	2/04/2021
P1 AL	188	OJO NEGRO	4	4	3	3	665	715	834	854	860	870
P2 AL	189	OJO NEGRO	6	6	5	5	653	738	847	900	905	986
P3 AL	190	OJO ROJO	4	4	3	3	651	746	817	841	837	885
P4 AL	Morado	OJO Y OREJA NEGRO	6	6	6	6	630	689	772	768	782	850
P5 AL	SN	OJO NEGRO	4	4	4	4	672	765	803	844	823	804
P1 AY	M. DER.	OJO NEGRO	4	4	3	3	721	746	840	830	845	773
P2 AY	M. IZQ.	OJO NEGRO	4	4	3	3	707	725	781	815	802	767
P3 AY	PIE. DER	OJO NEGRO	7	7	6	6	624	689	726	804	790	728
P4 AY	Morado	OJO NEGRO	4	4	3	3	669	736	811	825	800	883
P5 AY	SN	OJO NEGRO	4	4	3	3	583	771	897	910	840	777
INT1 AL	182	OJO NEGRO	6	6	6	6	683	796	910	1013	1048	1052
INT2 AL	183	OJO NEGRO	5	6	5	6	610	663	769	836	852	871
INT3 AL	184	OJO NEGRO	4	4	3	3	548	602	722	805	812	851
INT4 AL	Morado	OJO NEGRO	6	6	6	6	539	611	676	727	725	785
INT5 AL	SN	OJO NEGRO	6	6	6	6	578	629	753	814	845	852
INT1 AY	185	OJO NEGRO	6	6	5	5	605	629	719	703	680	630
INT2 AY	186	OJO NEGRO	6	6	6	6	467	529	729	768	756	786
INT3 AY	187	OJO ROJO	6	6	6	6	506	600	673	678	652	609
INT4 AY	Morado	OJO NEGRO	6	6	5	6	670	728	890	960	945	930
INT5 AY	SN	OJO NEGRO	6	6	5	5	556	649	785	788	769	727
AND1 AL	176	CIEGO O. D	6	6	6	6	634	758	811	839	840	860
AND2 AL	177	OJO NEGRO	6	6	5	5	621	702	798	823	854	902
AND3 AL	178	OJO NEGRO	6	5	4	4	653	759	856	870	900	945
AND4 AL	Morado	OJO NEGRO	6	6	5	6	691	783	895	919	923	941
AND5 AL	SN	OJO NEGRO	5	5	5	5	618	765	835	884	875	940
AND1 AY	179	OJO NEGRO	6	6	4	4	755	802	920	1009	1012	948
AND2 AY	180	OJO NEGRO	4	4	3	3	536	610	667	705	715	666
AND3 AY	181	OJO NEGRO	4	4	3	3	549	602	680	752	756	729
AND4 AY	Morado	OJO NEGRO	6	6	5	5	675	715	870	897	902	885
AND5 AY	SN	OJO NEGRO	6	6	6	6	620	731	790	832	854	873

Anexo 4. Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Muestra	Concentración ng/ul	TOTAL DE DNA (ug)
INT1 AL	126,2	2,5
INT2 AL	124,3	2,5
INT3 AL	319,4	6,4
INT4 AL	190,6	3,8
INT 5 AL	168,5	3,4
INT1 AY	293,9	5,9
INT2 AY	120,5	2,4
INT3 AY	219,3	4,4
INT4 AY	163,6	3,3
INT5 AY	137,1	2,7
P1 AL	150,7	3,0
P2 AL	237,4	4,7
P3 AL	90,1	1,8
P4 AL	165,5	3,3
P5 AL	149,2	3,0
P1 AY	245,3	4,9
P2 AY	166,0	3,3
P3 AY	253,1	5,1
P4 AY	93,5	1,9
P5 AY	202,7	4,1
AND1 AL	153,0	3,1
AND2 AL	60,2	1,2
AND3 AL	193,0	3,9
AND4 AL	160,7	3,2
AND5 AL	160,5	3,2
AND1 AY	479,3	9,6
AND2 AY	270,6	5,4
AND3 AY	282,7	5,7
AND4 AY	177,6	3,6
AND5 AY	142,2	2,8



Anexo 6. Conteo del número de dedos



Anexo 7. Pesaje de las unidades experimentales



Anexo 8. Ciego de cuy

