



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CAMBIOS EN LA ABUNDANCIA DE *LACTOBACILLUS* SPP EN
EQUINOS INFECTADOS NATURALMENTE CON
CIATOSTOMINOS SUPLEMENTADOS CON PRODUCTO
COMERCIAL DE SOPORTE DIGESTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

NOEMI ESTEFANIA GONZALEZ SERRANO

Directoras de tesis:

PhD Cintli Martínez Ortiz de Montellano

PhD Claudia Cecilia Márquez Mota



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Noemí y Marco *“Detrás de cada niño pequeño que cree en sí mismo hay un padre que creyó primero”* (Matthew Jacobson) en mi caso fueron ambos, mamá y papá, gracias por creer en mí siempre.

“My heroes are and were my parents. I can't see having anyone else as my heroes” (Michael Jordan). Siempre admiraré su amor y dedicación hacia los animales.

A mis hermanos Francisco y Miguel Antonio *“Because I have a brother, I'll always have a friend”* (Anónimo) Bueno, en realidad tengo dos lo cual es todavía mejor jeje.

A mis abuelitas Ofelia y María Elena *“Grandmas hold our tiny hands for just a little while...but our hearts forever”* (Anónimo) Gracias, por tanto, que sus manos sostengan las mías por muchísimos años más.

A mis amigos no humanos Kaiu, Zury, Llest, Cosette, Galia y aquellos que ya no están con nosotros físicamente, pero se quedarán por siempre en mi corazón; Bis, Kitty, Toyito, Alfa, Repshark y Ricky...” *Ellos no podrán hablar, pero sí sabrán acompañar tu silencio”* (Anónimo).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM por brindarme la oportunidad de poder ingresar a la carrera con la que siempre soñé; a mi facultad, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia porque fue ahí donde comencé mi formación profesional y conocí excelentes profesores cuya labor de enseñanza marcó mi desarrollo como Médico Veterinaria transmitiendo su pasión por diversas áreas de esta amplia profesión.

Al Rancho Hacienda Santiago, en especial a los doctores Dr. Jorge Luis Lemus Vargas y el Dr. Jorge Luis Lemus Avilés por permitirnos obtener las muestras de sus caballos para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. René Alvaro Segura Velázquez, responsable de la Unidad de Investigación de la FMVZ por su amable atención y apoyo durante el desarrollo de las técnicas de qPCR.

A mis asesoras, la Dra. Cintli Martínez Ortiz de Montellano y la Dra. Claudia Cecilia Márquez Mota, quienes me transmitieron su pasión por la investigación y su amor por la ciencia a través de sus enseñanzas, con paciencia y dedicación, para el desarrollo de mi tesis, pero también para mi desarrollo como profesional. Admiro el desempeño en sus proyectos y a sus mentes llenas de ideas innovadoras que ayudan a comprender de manera holística las interacciones que ocurren dentro y fuera de los seres vivos que nos rodean, rumiantes, caballos, parásitos, bacterias...*universos dentro de otro universo.*

A mi querida y mejor amiga, Mariana Pérez Olvera, por acompañarme desde los primeros semestres de la carrera, por su amistad y entusiasmo que me transmitió (y continúa transmitiendo) durante mi desarrollo como Médico Veterinaria y como ser humano... *“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a aquellos que se asocian”* (Lynn Margulis).

A la Dra. Laura González Reyes y a la Dra. Mariana Sánchez Arias por su apoyo, amistad y enseñanzas, así como los momentos de sonrisas que alimentaron el optimismo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Fernanda Calixto Tlacomulco por su ayuda para el desarrollo del proyecto.

A mis amigos y amigas: María José, Tatiana, Patricio, Galileo, Karina, Dafne, Mara, Kenya, Luz, Sofía, Roberto, Miguel por su apoyo moral y alegría que fortalecieron mi dedicación y esfuerzo para lograr convertirme en Médico Veterinario Zootecnista.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 El caballo	3
2.2 Holobionte Equino	5
2.3 Microbiota intestinal equina	8
2.4 Macrobiota intestinal equina	13
2.5 Efecto de los Antihelmínticos (AH) en el microbioma	16
2.6 Interacciones microbiota-macrobiota intestinal	18
2.7 Técnicas de estudio del microbioma en equinos	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL	23
5.1 Objetivos específicos	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Lineamientos de ética	24
6.2 Localización	24
6.3 Animales	25
6.4 Muestras fecales	25
6.5 Extracción de ADN	26
6.6 Cuantificación e integridad de ADN	29
6.7 PCR tiempo real (qPCR)	30
6.8 Cálculo de abundancia relativa	31
6.9 Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Cuantificación de ADN de las muestras seleccionadas	32
7.3 Integridad de ADN: electroforesis en gel agarosa	32
7.3 Abundancia relativa	35
8. DISCUSIÓN	40
9.CONCLUSIÓN	48
10. PERSPECTIVAS	48
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del caballo (<i>Equus caballus</i>).....	4
Cuadro 2. Componentes de la PCR	21
Cuadro 3. Microorganismos seleccionados y sus <i>primers</i> correspondientes	31
Cuadro 4. Concentración de ADN, valores de la relación A260/A280 y de la relación A260/A230 de las muestras seleccionadas.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del aparato digestivo del caballo (<i>Modificado de Sheri, A., 2022. Creado con BioRender.com</i>).....	6
--	---

Figura 2. Barrera mucosa intestinal y sus componentes en la salud y la enfermedad (Stewart et al., 2017 Creado con BioRender.com por Noemí G. S.).....	7
Figura 3. Participación de la microbiota en la salud inmunológica (Mach et al., 2020, Rowan et al., 2019, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	9
Figura 4. Desarrollo de microbiota en potros (Mols et al., 2020; De la Torre et al., 2019, creado con BioRender.com por González-Serrano Noemí).....	11
Figura 5. Desarrollo de ciatostominos en el intestino grueso (Adaptado de ESCCAP 2019, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	15
Figura 6. Esquema del ciclo biológico de ciatostominos (Adaptado de ESCCAP 2019, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	16
Figura 7. Interacciones microbiota-macrobiota intestinal (Adaptado de Midha et al., 2017, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	20
Figura 8. Primera etapa del proceso para extraer ADN a partir de muestras de heces de equino mediante el uso de kit Zymo Research, Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit. (Zymo Research 2022. Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	27
Figura 9. Segunda etapa del proceso para extraer ADN a partir de muestras de heces de equino mediante el uso de kit Zymo Research, Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit (Zymo Research 2022. Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	28
Figura 10. Proceso de extracción de ADN a partir de muestras de heces de equino mediante el uso del kit QIAamp® PowerFecal® DNA kit (Adaptada de QIAamp PowerFecal DNA Kit Handbook. Creado con BioRender.com por González-Serrano N.).....	28
Figura 11. Abundancia relativa de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	35
Figura 12. Abundancia relativa de <i>Lactobacillus salivarius</i>	36
Figura 13. Abundancia relativa de <i>Lactobacillus mucosae</i>	37
Figura 14. Abundancia relativa de <i>Lactobacillus reuteri</i>	37
Figura 15. Abundancia relativa de <i>Lactobacillus delbruekii</i>	38
Figura 16. Abundancia relativa de <i>Lactobacillus equi</i>	39

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Proceso de extracción de ADN en el DNAB, FMVZ-UNAM.....	27
Imagen 2. Cuantificación de las muestras de ADN obtenido realizada en espectrofotómetro <i>Nanodrop One Touch</i> (Thermo Scientific, USA)	29
Imagen 3. Preparación de las muestras de AND y los reactivos necesarios para la qPCR en campana de flujo laminar.	30
Imagen 4. Reconocimiento de la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. 4a: ADN extraído mediante el <i>Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)</i> correspondiente al día 0 del tratamiento. A: carril donde se colocó el marcador de peso molecular, B: muestra T3-C5-D0, C: muestra T2-C7-D0, D: muestra T2-C8-D0, E: T2-C9-D0, F: muestra T2-C10-D0, G: muestra T2-C11-D0 H: T2-C12-D0, I: muestra T1-C13-D0, J: muestra T1-C14-D0, K: muestra T1-C15-D0, L: T1-C16-D0, M: muestra T1-C17-D0, N: muestra T1-C18-D0. La muestra T1-C15-D0 no se observa debido a un error durante la realización de la técnica. 4b: ADN extraído mediante el <i>Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)</i> correspondiente al día 15 del tratamiento. A: marcador de peso molecular, B: muestra T1-C15-D0. C: muestra T3-C1-D15, D: muestra T3-C5-D15, E: muestra T2-C7-D15, F: muestra T2-C8-D15, G: muestra T2-C10-D15, H: muestra T2-C11-D15. En el carril B se observa la muestra T1-C15-D0 por lo que se comprueba que se trataba de un error durante el procesamiento y cuenta con material genético íntegro. I: muestra T2-C12-D15, J: muestra T1-C13-D15, K: muestra T1-C14-D15, L: muestra T1-C15-D15, M: muestra T1-C16-D15, N: muestra T1-C17-D15. 4c: Reconocimiento de la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, de ADN extraído mediante el kit <i>QIAamp® PowerFecal® DNA kit</i>) correspondiente al día 30 del tratamiento A: marcador de peso molecular, B: muestra T3-C1-D30, C: muestra T3-C2-D30, D: muestra T3-C4-D30, E: muestra T3-C5-D30, F: muestra T3-C6-D30, G: muestra T3-C7-D30, H: T2-C8-D30, I: muestra T2-C9-D30, J: muestra T2-C10-D30, K:	

muestra T2-C11-D30, **L**: muestra T2-C12-D30, **M**: muestra T1-C13-D30, **N**: muestra T1-C14-D30, **O**: muestra T1-C15-D30.....34

RESUMEN

GONZÁLEZ SERRANO NOEMÍ ESTEFANÍA

Cambios en la abundancia de *Lactobacillus* spp en equinos infectados naturalmente con ciatostominos suplementados con producto comercial de soporte digestivo.

Cintli Martínez Ortiz de Montellano, Claudia Cecilia Márquez Mota

En la actualidad la comprensión de la relación y la comunicación entre los parásitos intestinales y la microbiota del intestino posterior del caballo es limitada. Presentando relaciones complejas y dinámicas entre la microbiota, macrobiota y hospedero.

El objetivo del presente trabajo es aportar información sobre posibles interacciones entre los ciatostominos y especies de lactobacilos bajo los efectos de la ivermectina y de un suplemento comercial de soporte digestivo, para comprobar el efecto y eficacia de este último, mediante la aplicación de técnicas moleculares: extracción de ADN y PCR tiempo real (qPCR).

Los lactobacilos seleccionados forman parte de la microbiota colónica y cecal de los caballos; realizan funciones relacionadas con la producción de ácido láctico, en su mayoría, se consideran potenciales probióticos.

Los equinos de este experimento se separaron en tres grupos; cada grupo recibió un tratamiento distinto. Se obtuvo ADN bacteriano de calidad mediante el uso de los kits *Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)* y *QIAamp® PowerFecal® DNA kit*. Las abundancias relativas se calcularon a partir de resultados obtenidos de pruebas de PCR en tiempo real.

El suplemento comercial parece tener efectos positivos en la microbiota equina, apoyando el proceso de resiliencia ante el efecto de perturbación por parte de la ivermectina. Existe una relación simbiótica entre los lactobacilos y los ciatostominos, sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo. La metodología empleada en este trabajo puede servir de base para futuros estudios que involucren la extracción de ADN fecal equino.

1.INTRODUCCIÓN

En México, los caballos pueden ser sujetos a prácticas rutinarias en cuanto al uso de fármacos para el control de parásitos (contribuyendo a la resistencia antihelmíntica) y bacterias; la carencia de especificidad de estos productos puede eliminar gran parte de las poblaciones benéficas de microorganismos en el caballo y promover disbiosis (desequilibrio en el tipo de colonia microbiana) (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

Para encontrar soluciones ante esta problemática, surge la necesidad de comprender la diversidad de organismos y sus interacciones dentro del tracto gastrointestinal equino ya que, a pesar de la clara importancia de la microbiota y macrobiota intestinal, no existe un conocimiento integral y sistemático sobre las comunidades microbianas del intestino equino; además, nuestra comprensión de lo que constituye "normal" y "anormal", o "bueno" y "malo" es actualmente muy limitada (Garber *et al.*, 2020). Asimismo, es importante tomar en cuenta que el rol de los patógenos como los parásitos, en este caso, ciatostominos, aún no está del todo dilucidado (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

El objetivo general de este estudio fue identificar cambios en la abundancia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. equi*, *L. mucosae* y *L. delbruekii* de potros parasitados suplementados con producto comercial de soporte digestivo con el fin de conocer parte de su efecto y eficacia dentro de la microbiota, mediante extracción de ADN fecal y qPCR. Para lograrlo, se siguieron los siguientes objetivos específicos: la extracción de ADN bacteriano de calidad a partir de muestras de heces de equinos suplementados y no suplementados, para identificar cambios en las abundancias relativas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. equi*, *L. mucosae* y *L. delbruekii* mediante qPCR. La interpretación de la variación de la abundancia relativa de *Lactobacillus* en los diferentes grupos de tratamientos para conocer parte de su efecto y la eficacia del suplemento mediante ANOVA de una vía. Así como el establecimiento de un protocolo de extracción de ADN genómico a partir de heces de equinos con la finalidad de generar información que sirva de base para futuras investigaciones relacionadas, mediante el uso de dos kits de extracción: *Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit* y *QIAamp® PowerFecal® DNA kit*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El caballo

El caballo actual pertenece al género *Equus* (véase cuadro 1), el cual, hace un millón de años evolucionó a partir de su ancestro *Eohippus*, mamífero primitivo que, a su vez, inició su evolución hace 60 millones de años. Este proceso

evolutivo coincidió con el desarrollo de pastizales que desplazaron a los bosques. Durante ese periodo se presentaron cambios ambientales y geográficos que llevaron a modificaciones anatómicas y fisiológicas en los equinos permitiendo su supervivencia (Al Jassim *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del caballo (*Equus caballus*)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Perissodactyla
Familia	Equidae
Género	<i>Equus</i>
Especie	<i>Equus ferus caballus</i>

(Linnaeus 1758)

Posteriormente, la domesticación, que adaptó a los caballos al uso humano y la vida en cautiverio, aseguró la supervivencia de la especie y ayudó a la humanidad a crear la civilización (Al Jassim *et al.*, 2009). En la actualidad, el caballo se utiliza para tracción y transporte, fines militares, empresas agrícolas y comerciales, producción de carne, deporte (charrería, equitación), protección (policía montada) y paseo (Premiani y Premiani., 2010).

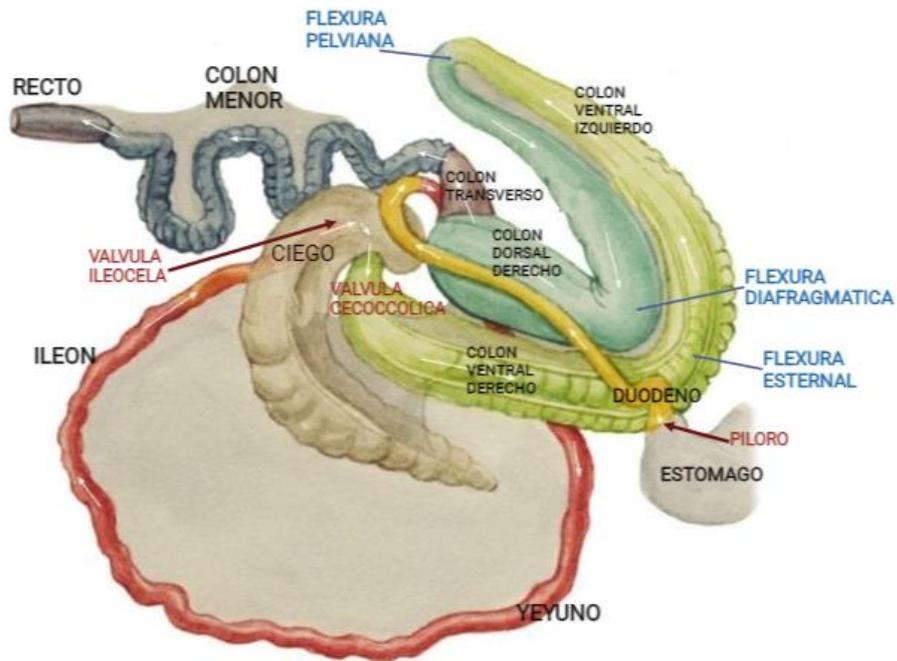
De acuerdo con un estudio sobre el mercado de la genética de equinos en México, (datos del 2015 al año 2019), en los últimos años, el sector del caballo mexicano se ha convertido en una industria formal, con más de 150 ganaderías y unas tasas de crecimiento anuales del 10%. Esto le ha permitido posicionar a México como el segundo país a escala global en crianza de caballos con unas 6 millones 385 mil cabezas de acuerdo con la FAO (Reguera, 2020).

Debido al valor que representa la especie equina en nuestro país, es importante el adquirir conocimientos sobre factores relacionados con procesos de salud-enfermedad del tracto gastrointestinal (TGI), por su vulnerabilidad a padecer trastornos nutricionales y enfermedades gastrointestinales (Al Jassim *et al.*, 2009; Ang *et al.*, 2022).

2.2 Holobionte Equino

En la naturaleza existen miles de consorcios donde conviven de manera conjunta diversas especies. Dentro de esta armonía, en el caso del parasitismo, el hospedero representa un ente individual que por definición podría considerarse un *holobionte*, del griego *holo* (todo) y *bios* (vida), es decir, un organismo multicelular complejo y todos sus microorganismos asociados (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2023). Es así, como, todos los organismos presentan relaciones simbióticas (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a); estrechas asociaciones de especies diferentes que viven juntas (Parmentier y Michel, 2013), donde al menos alguna de las especies involucradas obtiene un beneficio (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

El caballo, animal herbívoro, fermentador del intestino posterior, posee un TGI altamente compartimentado, un ciego y colon agrandados (véase Figura 1). Cada segmento del TGI tiene un ecosistema independiente, con características bióticas y abióticas únicas, por ejemplo, la temperatura, el agua, el pH y el oxígeno (Su *et al.*, 2020). De esta forma, el caballo podría considerarse un holobionte que contiene varias especies que conforman su micro y macrobiota (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).



Created in BioRender.com 

Figura 1. Esquema del aparato digestivo del caballo (Modificado de Sheri, A., 2022. Creado con BioRender.com)

El concepto de microbiota se refiere a la comunidad microbiana de un hábitat definido (holobionte) y el microbioma es el material genético de cada una de las especies que lo conforman (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a., Rasillo-de-Alba, 2020).

Existe otro grupo de organismos pocas veces tomado en cuenta: la macrobiota, o el conjunto de helmintos y artrópodos en el holobionte. La macrobiota es un término establecido reciente y actualmente se ha encontrado una estrecha asociación con la microbiota, evidenciando relaciones mutualistas complejas entre estos dos componentes dentro del holobionte (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a., Jenkins *et al.*, 2018).

Dichas relaciones repercuten en funciones y mecanismos fisiológicos, moleculares e inmunológicos, con acciones benéficas que contribuyen al

equilibrio y la homeostasis en el individuo holobionte (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

Sin embargo, existen efectos perturbadores que pueden resultar en la ruptura del equilibrio (véase figura 2) (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a). Ante estos efectos la microbiota puede manifestar diferentes respuestas; resistencia o estabilidad, la composición de la microbiota no cambia a pesar de la perturbación; resiliencia, hay un cambio pero sin afectar a los grupos funcionales encargados del metabolismo; redundancia, cambia la composición original de la microbiota, estableciéndose una nueva, sin afectar las funciones metabólicas; disbiosis o desequilibrio, es el caso más grave pues además de presentar un cambio en la población, también hay un cambio en la función (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2023; Sommer *et al.*, 2017; Requena y Velasco, 2021).

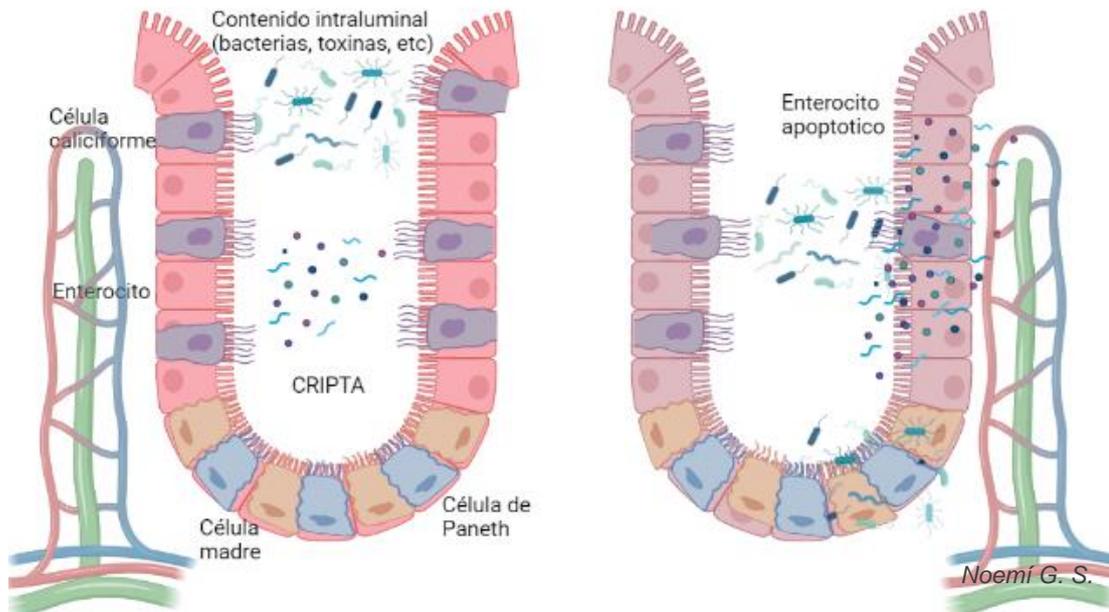


Figura 2. Barrera mucosa intestinal y sus componentes en la salud y la enfermedad (Stewart *et al.*, 2017 Creado con BioRender.com por Noemí G. S.)

Las interacciones entre integrantes de la microbiota y macrobiota representan la coevolución y coexistencia que tienen con el hospedero u holobionte (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

El rol de los patógenos, tanto bacterias, hongos, virus como parásitos, aún no está del todo dilucidado. Por lo tanto, los organismos benéficos y patógenos (patobiontes) son considerados como parte de la microbiota y macrobiota a pesar de sus características que influyen en los mecanismos benéficos o de enfermedad (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a). Entre dichas características encontramos la competitividad por recursos o por suplir funciones metabólicas. La dosis, que es la cantidad de organismos que llegan al interior del holobionte y se establecen; la infectividad o establecimiento, es decir, que cumple con su ciclo de vida perpetuando su especie dentro y fuera de su hospedero. Y la virulencia o poder “patógeno” para prolongar la vida del hospedero definitivo y a su vez, la suya (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

Para una mejor comprensión de cómo se van presentando las características mencionadas, es necesario el estudio de las interacciones simbióticas, mutualistas, comensalistas, es decir, sinergias; así como, interacciones antagónicas (disbiosis y parasitismo) (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

2.3 Microbiota intestinal equina

La composición, que se refiere a la diversidad y estructura, y la función (metabolismo y productos finales) de la microbiota del TGI son muy importantes para el metabolismo de los animales, en el caso de los caballos, entre el 60% y el 70% de la energía proviene de los AGV's (ácidos grasos volátiles) producidos por microbiota del ciego y el colon. Por lo tanto, la relación simbiótica y altamente

dinámica de la microbiota con el holobionte, mantienen la salud del individuo (Su *et al.*, 2020).

Dentro de la microbiota del caballo encontramos aproximadamente 10^9 microorganismos por gramo de ingesta en el ciego, incluidos al menos 108 géneros bacterianos y siete filos, así como protozoos, arqueas y hongos anaerobios, que, en conjunto, promueven la digestión y la absorción de nutrientes para la producción de energía, la producción de ácidos grasos de cadena corta y el mantenimiento de la salud inmunológica contra patógenos y enfermedades (Mach *et al.*, 2020).

Entre las acciones para preservar la salud del TGI, en las cuales se desempeña la microbiota comensal, se encuentra la promoción de la función de la barrera epitelial intestinal, cuya integridad es importante para prevenir la activación inmunitaria inapropiada y la invasión de patógenos. La regulación del sistema

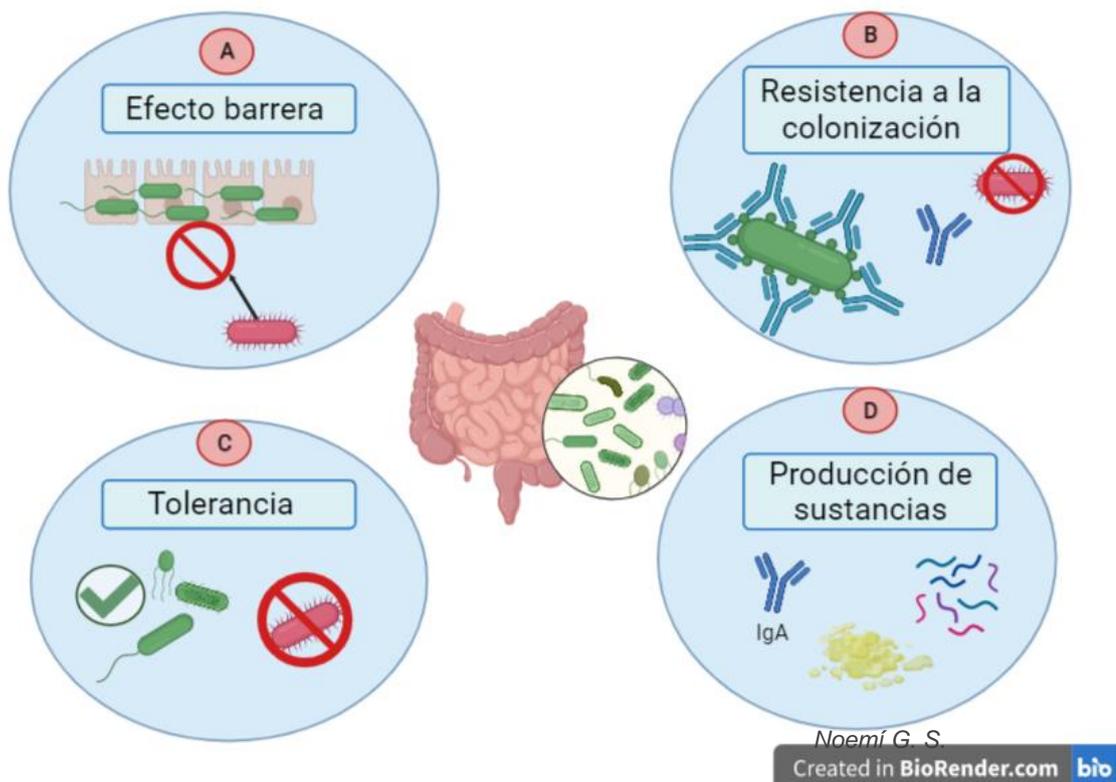


Figura 3. Participación de la microbiota en la salud inmunológica (Mach *et al.*, 2020, Rowan *et al.*, 2019, Creado con BioRender.com por González-Serrano N..)

inmunológico, influyendo en la resistencia a la colonización de agentes patógenos y en el sistema inmune adaptativo de tal manera que existe una tolerancia a los antígenos de la microbiota comensal y así el sistema inmune es capaz de discriminar entre comensales inocuos y patógenos (patobiontes). Finalmente, la microbiota participa en la producción de anticuerpos IgA para proteger la mucosa del tracto gastrointestinal, así como moco y péptidos antimicrobianos (véase Figura 3) (Mach *et al.*, 2020, Rowan *et al.*, 2019).

En cuanto al establecimiento y desarrollo de la microbiota en caballos, los primeros seis o siete meses de vida son cruciales y dependientes de una variedad de factores (bióticos y abióticos) y circunstancias (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a). Comenzando desde la gestación, a través del líquido amniótico, seguido del parto al entrar en contacto con la microbiota de la vagina, el pelo y la ubre de la madre, así como del medio ambiente. El calostro y la leche materna también influyen en la microbiota del potro, así como la coprofagia y la transición de la leche materna a una dieta basada en forrajes (véase Figura 4) (Mols *et al.*, 2020; De la Torre *et al.*, 2019).

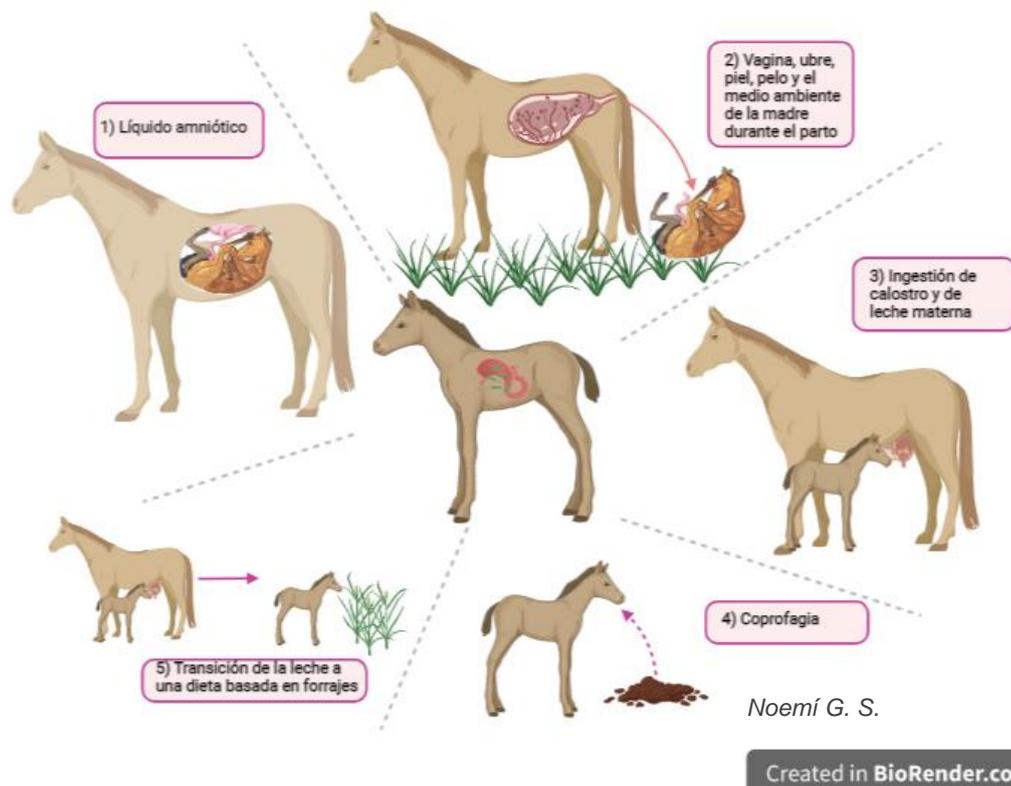


Figura 4. Desarrollo de microbiota en potros (Mols *et al.*, 2020; De la Torre *et al.*, 2019, creado con BioRender.com por González-Serrano Noemí)

A lo largo de la vida del caballo su microbiota se modifica debido a factores como la alimentación (si se trata de una dieta rica en granos, en almidones, en aceites, el tipo de heno, el tipo de pastura), la edad, el sexo, así como también si el caballo es domesticado o no, la administración de fármacos, el estrés; la edad y presencia de enfermedades como laminitis, peritonitis, diarrea, enteritis proximal, abscesos, salmonelosis (Garber *et al.*, 2020; Collinet *et al.*, 2019; Hesta *et al.*, 2021; Sommer *et al.*, 2017).

A pesar de la importancia de la microbiota intestinal, actualmente no existe un conocimiento integral y sistemático sobre las comunidades microbianas del intestino equino; aunado a ello, nuestra comprensión de lo que constituye "normal" y "anormal" es actualmente muy limitada. Hasta la fecha, el papel de

los diferentes grupos componentes, así como sus interacciones, sigue siendo en gran parte desconocido (Garber *et al.*, 2020).

Se conoce que entre el 20 y 59% de los grupos de bacterias identificados como parte de la microbiota equina del intestino grueso; pertenecen al *phylum* Firmicutes; entre las clases identificadas tenemos la clase Bacilli que a su vez se divide en dos órdenes: Lactobacillales y Bacillales. Dentro de la orden de las bacterias Lactobacillales se han identificado dos familias en equinos Streptococcaceae y Lactobacillaceae; en esta última encontramos el género de los *Lactobacillus*. Estos últimos son bacterias productoras de ácido láctico y de gran interés, debido a que se consideran probióticos posiblemente beneficiosos para los caballos (Schoster, 2018; Kauter *et al.*, 2019).

Entre las especies de lactobacilos que se han identificado dentro de la microbiota equina se encuentran *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. equi*, *L. mucosae* y *L. delbrueckii* (Dicks *et al.*, 2014). En el caso de *Lactobacillus acidophilus*, una especie no reportada como parte de la microbiota comensal, ha resultado beneficiosa para los equinos como probiótico ya sea administrada sola o en conjunto con otras bacterias (Laghi *et al.*, 2018; Collinet *et al.*, 2019).

Lactobacillus reuteri ha sido aislado del epitelio escamoso estratificado del estómago y la mucosa del colon de equinos y se encontró que es capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp. (Dicks *et al.*, 2015; Bernard *et al.*, 2011). En otro estudio, realizado por Dicks *et al.*, se encontró que *L. reuteri* evitó la adherencia de *Clostridium difficile* a las células epiteliales del TGI (*in vitro*) y disminuyó diez veces el número de clostridios viables aislados a partir de heces (Dicks *et al.*, 2015).

Por otro lado, *Lactobacillus salivarius* produce altos niveles de ácido láctico y AGV's en equinos, específicamente propionato. Estos ácidos se acumulan en el estómago, ciego y colon y, en exceso, alcanzan niveles tóxicos; incluso para otras bacterias que utilizan el lactato (Dicks *et al.*, 2014). Sin embargo, se han realizado estudios en los cuales la suplementación con una combinación de *L. salivarius*, *L. acidophilus* y *B. lactis* podrían apoyar la integridad de la mucosa del intestino posterior y contribuir a la salud equina. (Collinet *et al.*, 2019).

Lactobacillus equi (*Ligilactobacillus equi*) es una especie bacteriana predominante en intestino de caballos sanos. Parece tener mecanismos de adaptación intestinal incluyendo la producción de enzimas relacionadas con la degradación de la celulosa; siendo estas enzimas útiles para la digestión y absorción del alimento (Li *et al.*, 2022).

Lactobacillus mucosae y *Lactobacillus delbrueckii*, junto con otras bacterias, han sido identificados como los principales productores de ácido láctico en el ciego de los caballos (Elghandour *et al.*, 2019). En un estudio sobre la microbiota del intestino posterior equino durante el proceso de laminitis, se encontró que la producción de lactato estaba estrechamente relacionada con *Lactobacillus salivarius*, *L. mucosae* y *L. delbrueckii* (Milinovich *et al.*, 2010).

2.4 Microbiota intestinal equina

En relación con la microbiota, se desconoce el papel real de los parásitos dentro del holobionte equino. Considerarlos como parte de la macro y microbiota forma parte de un enfoque integral dentro de la medicina preventiva, la salud y bienestar equino (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

El parasitismo no es un hecho aislado ya que una variedad de estudios ha demostrado que los caballos pueden tolerar las infecciones por parásitos, bacterias, virus y hongos (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

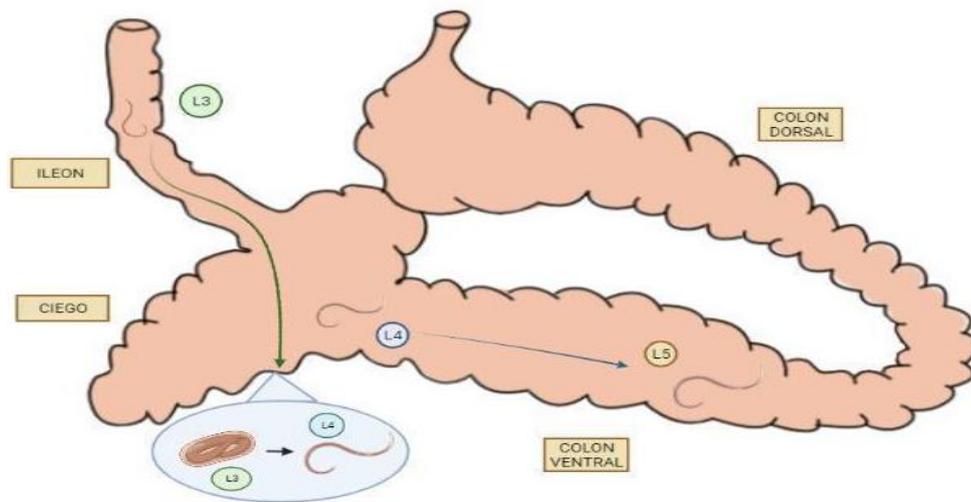
Es bien sabido que los caballos de pastoreo están infectados por una comunidad compleja de helmintos (ver ANEXO), principalmente estrombilidos (Clark *et al.*, 2018). Sin embargo, no todos los casos de parasitismo terminan en enfermedad y mucho menos en la muerte del hospedero, en otras palabras, puede presentarse parasitiasis (estado asintomático) en lugar de parasitosis (se presenta sinología) (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

Los estrombilidos se clasifican en migratorios (*Strongylus* spp.) y no migratorios (el resto de las especies de la superfamilia, que incluye especies de tamaño grande y pequeño). La mayoría de los estrombilidos no migratorios pertenecen a la subfamilia Cyathostominae (ver ANEXO) y se denominan vulgarmente “ciatostomas”, sin embargo, su correcta denominación es ciatostominos (Meana y Rojo, 2010).

Los ciatostominos son ubicuos y todos los caballos que pastan están infectados, principalmente equinos desde los seis-siete meses de edad hasta cumplir entre tres y cuatro años (Matthews, 2014).

El ciclo de los ciatostominos comienza con la presencia de huevos en heces equinas, luego ocurre la ingesta oral de L3 que se encuentra en pastos y el desenvainamiento de la misma por fluidos gástricos. La L3 desenvainada pasa a través del intestino delgado e invade la mucosa y submucosa del colon y ciego donde puede permanecer en estado de hipobiosis (véase Figura 5), quedando latente durante dos años o más (Daniels, 2018). Posteriormente, muda a la cuarta etapa, regresa a la luz intestinal y se desarrolla hasta la etapa adulta, se

reproduce y reinicia el ciclo con la expulsión de huevos en heces (véase Figura 6) (ESCCAP, 2019).



Noemí G. S.

Figura 5. Desarrollo de ciatostominos en el intestino grueso (Adaptado de ESCCAP 2019, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.)

Al tratarse de patógenos que solo producen enfermedad cuando las infecciones alcanzan niveles extremadamente altos, no se necesitan tratamientos antihelmínticos frecuentes, sino, tratamientos oportunos con antihelmínticos efectivos administrados en el momento apropiado del año, que correspondan a los ciclos epidemiológicos y las cargas parasitarias de los caballos de manera individual (Nielsen *et al.*, 2013). A pesar de ello, el control de los nematodos gastrointestinales, en general, se basa, en el uso rutinario de antihelmínticos (AH). Siendo un enfoque inadecuado ya que siempre origina poblaciones de nematodos resistentes a los AH (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022b).

A su vez, estos productos carecen de especificidad, causando estragos en gran parte de las poblaciones benéficas de microorganismos, por lo tanto, representan un factor de perturbación dentro del equilibrio en el holobionte promoviendo la respuesta de disbiosis (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

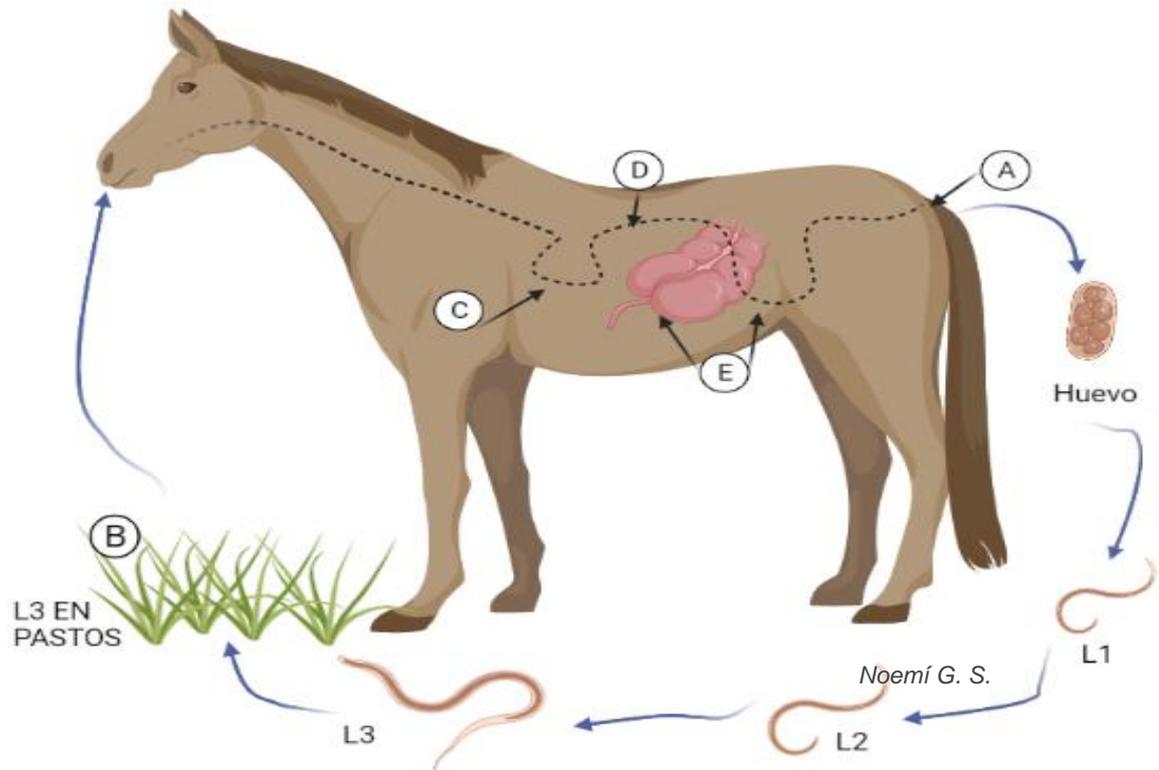


Figura 6. Esquema del ciclo biológico de ciatostominos (Adaptado de ESCCAP 2019, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.)

2.5 Efecto de los Antihelmínticos (AH) en el microbioma

Para el control de nematodos gastrointestinales en caballos se emplean principalmente tres clases de antihelmínticos (AH): benzimidazoles, pirimidinas y lactonas macrocíclicas (Walsh *et al.*, 2019; Nielsen *et al.*, 2013). Estas últimas, tienen actividad contra nematodos y artrópodos de amplio espectro (Intriago y Velasquez-Zambrano, 2019); su mecanismo de acción consiste en actuar sobre los canales de cloruro regulados por glutamato en las células nerviosas y musculares de los nematodos, alterando la transmisión normal de los estímulos

nerviosos a los músculos desencadenando una parálisis flácida en los parásitos (Nielsen *et al.*, 2013).

Como parte del efecto de las lactonas macrocíclicas, la supresión temporal de la producción de huevos es de 14 a 17 días (Coles *et al.*, 2006).

La moxidectina puede brindar protección contra la infección por larvas de ciatostominos ingeridas durante 2 a 3 semanas después de su administración (Schumacher y Taintor, 2008).

En el caso de IVM (ivermectina), se ha encontrado que hay una reducción del 95% del recuento de huevos fecales a los 14 días después del tratamiento con este antihelmíntico (Intriago y Velasquez-Zambrano, 2019).

La administración de antihelmínticos, específicamente lactonas macrocíclicas, se ha identificado como un factor de riesgo para la aparición de enfermedades intestinales en caballos, sin embargo, se desconocen las razones detrás de esto (Daniels *et al.*, 2020). Existe la teoría de que se debe a alteraciones en el microbioma del TGI por parte del tratamiento antihelmíntico (Peachey *et al.*, 2018; Garber *et al.*, 2020) incluyendo la interacción entre los parásitos y la microbiota intestinal (Daniels *et al.*, 2020).

En equinos, se ha observado una reducción en las bacterias celulolíticas y el pH cecal seguido de un aumento en los lactobacilos y estreptococos después del tratamiento con moxidectina (Daniels *et al.*, 2020, Hu *et al.*, 2021).

En estudios previos se llegó a la conclusión de que el tratamiento antihelmíntico, que conduce a la muerte de los ciatostominos, probablemente causa una alteración temporal en el ecosistema del intestino posterior que, a su vez, provoca cambios en el perfil de la comunidad bacteriana y un aumento en los

biomarcadores inflamatorios (Daniels *et al.*, 2020; Walshe *et al.*, 2019., Peachey *et al.*, 2018).

2.6 Interacciones microbiota-microbiota intestinal

La compleja relación entre la macrobiota, la microbiota y el holobionte es un área que recientemente ha recibido atención, pero sigue sin comprenderse del todo (Daniels *et al.*, 2020).

En el caso de los estrongilidos, la susceptibilidad a la infección ocurre en presencia de factores de la microbiota intestinal moderados que afectan el riesgo individual (Clark *et al.*, 2018) ya que la microbiota intestinal se caracteriza por la capacidad de resiliencia ante eventos como enfermedades parasitarias, infecciones bacterianas y virales agudas, tratamiento con antibióticos o escasez de nutrientes (Mach *et al.*, 2021).

Hay que enfatizar el hecho de que existe una coevolución de los helmintos, la microbiota intestinal y los hospederos, de modo que los helmintos no deben considerarse estrictamente como patógenos, sino, más bien como miembros de la macrobiota intestinal que dan forma al nicho de manera que se encuentre un nuevo equilibrio (Midha *et al.*, 2017).

Recientemente, se busca comprender las interacciones macrobiota (nematodos)-microbiota y su impacto en la respuesta inmune y la fisiología del hospedero a través del estudio del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*); el cual, es un organismo modelo, muy bien caracterizado y estudiado durante varias décadas. De esta manera, las interacciones de *C. elegans* con las bacterias se entienden mucho más que las de otros nematodos parasitarios (Midha *et al.*, 2017).

Por ejemplo, se ha encontrado que *Alfaproteobacteria* y *Lactococcus* spp. tienden a ser beneficiosos y promueven la proliferación de *C. elegans*, mientras que Bacteroidetes y Gammaproteobacteria parecen afectar la fisiología de los nematodos e inducen estrés y respuestas inmunitarias (Samuel *et al.*, 2016). Posiblemente existen interacciones similares entre las bacterias y los nematodos intestinales, es decir, la composición de la microbiota influye en la salud de los parásitos en el intestino. Incluso se ha reportado que la fecundidad de los nematodos está sujeta a la respuesta inmune del hospedero, por ejemplo, el caso de la producción de huevos de *H. p. bakeri*, especie de *Trichostrongylus* que infecta roedores, se ve influenciado por una respuesta inmune mediada por células T colaboradoras tipo 2 (Midha *et al.*, 2017).

Se conoce entonces que no solo la microbiota es esencial para el desarrollo del parásito, sino también que determinadas bacterias facilitan su establecimiento (Midha *et al.*, 2017), por ejemplo, en ratones, se ha demostrado que la abundancia de lactobacilos se correlaciona positivamente con la parasitosis por nematodos intestinales y la respuesta inmunitaria del hospedero, mostrando una interacción compleja hospedero-bacteria-parásito (holobionte-microbiota-macrobiota) (Garber *et al.*, 2020).

Dada la importancia de la microbiota y la capacidad de los helmintos para influir en las comunidades microbianas en el intestino (véase Figura 7), las infecciones por helmintos y los productos de los helmintos han despertado interés por su papel en la disbiosis y a su vez, se comienzan a estudiar beneficios potenciales en procesos inflamatorios. Este conocimiento podría conducir al descubrimiento de nuevos objetivos antihelmínticos mediante la manipulación de la microbiota (Midha *et al.*, 2017).

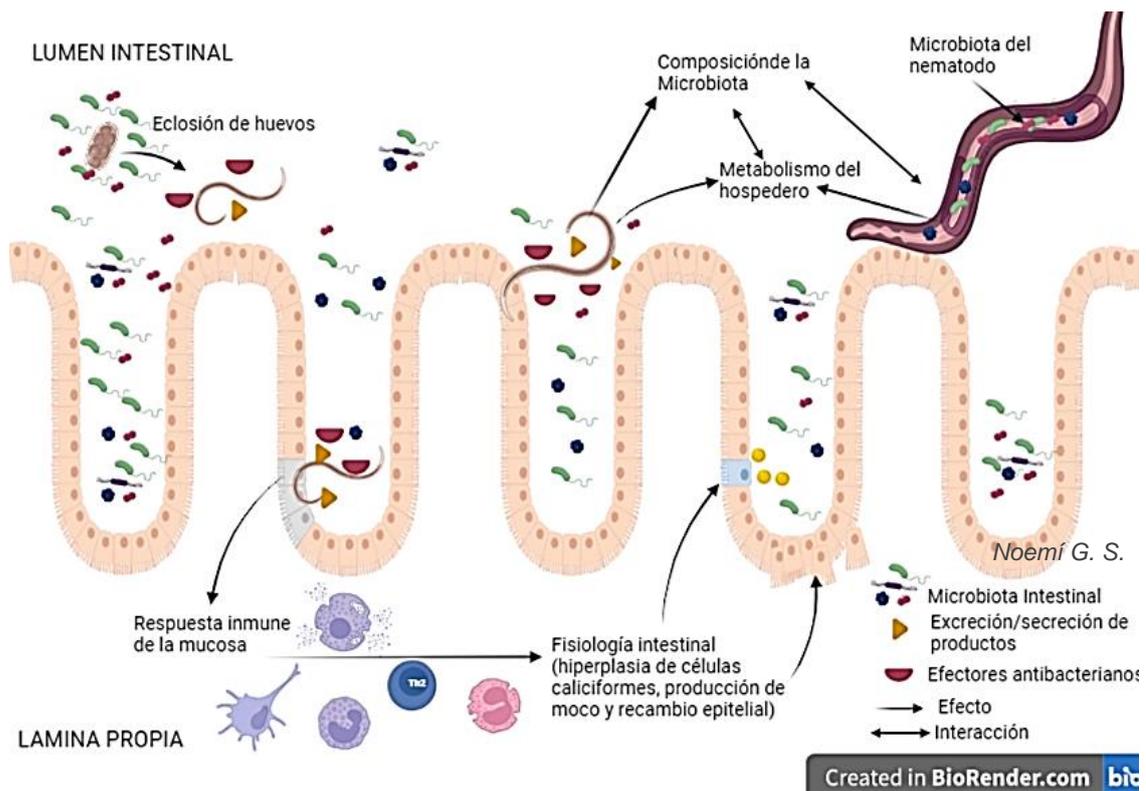


Figura 7. Interacciones microbiota-macrobiota intestinal (Adaptado de Midha *et al.*, 2017, Creado con BioRender.com por González-Serrano N.)

2.7 Técnicas de estudio del microbioma en equinos

Se requiere una mayor investigación del microbioma equino para poder entender mejor sus implicaciones en el estado de salud de los caballos (Rasillo-de-Alba 2020). Actualmente existen herramientas para llevar a cabo estas investigaciones como secuenciación (*shotgun* y amplicones), PCR (Reacción en

Cadena de la Polimerasa) y qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real), las cuales deben ser seleccionadas dependiendo el objetivo del estudio (Allaband *et al.*, 2019).

Dichas técnicas moleculares, en su mayoría, están basadas en la amplificación de la secuencia 16S del gen ribosomal rRNA que está presente en todas las células procariotas y contiene HVRs (*High Variability Region*), las cuales, son el resultado de la evolución divergente de las bacterias. Gracias a estas secuencias se puede realizar una clasificación filogenética de las bacterias (Rasillo-de-Alba, 2020).

La PCR (véase cuadro 2) se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (Mehdi *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Componentes de la PCR

Componente	Características
ADN	Formado por: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena ya que el ADN tiene una estructura de doble hélice.
ADN polimerasa	Enzima que sintetiza las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. La enzima más utilizada se conoce como Taq ADN polimerasa y proviene de <i>Thermus aquaticus</i> .
Primers	Secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Son dos secuencias: <i>forward</i> o sentido y <i>reward</i> o antisentido.
dNTP's	Bases nitrogenadas que la Taq polimerasa usa para construir las nuevas cadenas de ADN.
Buffer	Solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) 1X.

Magnesio	Cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción.
Agua	Disolvente en la reacción, su uso es en su forma destilada libre de nucleasas.

(Tamay *et al.*, 2013)

Por su parte, la PCR Tiempo Real (qPCR) detecta y cuantifica las secuencias específicas de ácidos nucleicos, a diferencia de la PCR punto final, en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco (Mehdi *et al.*, 2017).

Los componentes en la PCR en tiempo real son los mismos utilizados en la PCR punto final sólo que la polimerasa, dNTP's, Mg⁺, el buffer y el fluoróforo, para detectar los productos amplificados, se encuentran juntos en una solución conocida como *Máster mix* (Tamay *et al.*, 2013).

El desarrollo y la aplicación de técnicas moleculares es imprescindible para lograr la determinación de la composición y diversidad de la microbiota equina ante diversos factores perturbadores, representando conocimiento, que, a su vez, podría servir de base para la evaluación integral y manipulación de la microbiota en beneficio del individuo en el proceso de salud-enfermedad (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022a).

3. JUSTIFICACIÓN

La optimización de los protocolos y procedimientos de técnicas moleculares, en este caso, de extracción de ADN y qPCR podrá servir de guía para futuras investigaciones relacionadas con el estudio del microbioma equino, así mismo, el comprobar la eficacia de un suplemento de soporte digestivo servirá como fundamento para su aplicación en equinos, bajo criterio del Médico Veterinario

especialista, con la finalidad de mejorar la salud intestinal de los individuos y por ende su bienestar.

Ampliar el panorama para una mayor comprensión del término *holobionte*, representa un giro dentro de la Medicina Veterinaria, al considerar la posibilidad de que organismos considerados como agentes patógenos, en este caso nematodos gastrointestinales (ciatostominos) y bacterias, entre otros, son parte de un todo y que influyen en el equilibrio del TGI, por lo tanto, es necesaria la modificación de los protocolos de administración rutinaria de fármacos antiparasitarios y antibióticos.

4. HIPÓTESIS

La abundancia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *L. equi*, *L. mucosae* y *L. delbruekii* en la microbiota de heces de caballos parasitados con ciatostominos suplementados con producto comercial de soporte digestivo se mantiene en los caballos de los grupos que recibieron el suplemento de soporte digestivo, mientras que en los caballos tratados únicamente con IVM al 1.87% no se mantiene.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar cambios en la abundancia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. equi*, *L. mucosae* y *L. delbruekii* de animales parasitados suplementados con producto comercial de soporte digestivo con el fin de conocer parte de su efecto y eficacia dentro de la microbiota, mediante extracción de ADN fecal y qPCR.

5.1 *Objetivos específicos*

- Extraer ADN bacteriano de calidad a partir de muestras de heces de equinos suplementados y no suplementados, para identificar cambios en las abundancias relativas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. equi*, *L. mucosae* y *L. delbruekii* mediante qPCR.
- Interpretar la variación de la abundancia relativa de *Lactobacillus* en los diferentes grupos de tratamientos para conocer parte de su efecto y la eficacia del suplemento mediante ANOVA de una vía.
- Establecer un protocolo de extracción de ADN genómico a partir de heces de equinos con la finalidad de generar información que sirva de base para futuras investigaciones relacionadas, mediante el uso de dos kits de extracción *Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit* y *QIAamp® PowerFecal® DNA kit*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lineamientos de ética

El protocolo de la presente tesis fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.2 Localización

Rancho Hacienda Santiago, ubicado en Sierra de Lobos, León Guanajuato. Específicamente en la Sierra de Lobos el clima es considerado templado subhúmedo, BSw de acuerdo con la clasificación de Köppen. La temperatura

promedio anual es de 19.6 °C, alcanzando una máxima promedio de 31.5 °C en mayo y una mínima promedio de 7.2 °C en enero, con 8 °C (García, 2004).

6.3 Animales

El rancho cuenta con caballos raza cuarto de milla; se seleccionaron 6 potros y 12 potrancas de entre 16 y 19 meses de edad, cuyos pesos se promedian en 360 kg y se encuentran naturalmente infectados por ciatostominos.

Su alimentación diaria consistía en 5 kg de alimento comercial, 3 kg de pasto *ray grass* y 3 kg de alfalfa. Los ejemplares pastoreaban en potreros separados por sexo, con un tiempo de pastoreo de 10 horas, de 7am a 5pm, pasado este tiempo los animales eran introducidos a sus caballerizas individuales. El agua se les proporcionaba *ad libitum*.

6.4 Muestras fecales

El presente estudio forma parte de un proyecto de investigación de mayor escala, para fines de este estudio, únicamente se desarrolló la obtención de muestras de heces y su posterior procesamiento para extraer ADN y la realización de qPCR.

Se empleó un suplemento comercial, el cual proporciona ácidos grasos omega 3, antioxidantes, vitaminas, minerales, glutamina, prebióticos y probióticos (*Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces C. boulardii* 1079 y *Saccharomyces cerevisiae* 1077), con el propósito de ayudar a mejorar la microbiota gastrointestinal. La dosis, de acuerdo con lo recomendado por la marca, fue de 147 gramos dividida en dos tomas, se administró con el alimento durante 30 días.

Los animales fueron asignados a tres grupos de tratamientos, los cuales consistieron en lo siguiente:

Tratamiento 1: IVM al 1.87%

Tratamiento 2: IVM al 1.87% y suplemento de soporte digestivo (IVM + SP)

Tratamiento 3: suplemento de soporte digestivo (SP)

La obtención de muestras de heces fue directamente del recto de los caballos por palpación (Marques *et al.*, 2017). El muestreo se realizó el día 0 (previo al tratamiento), el día 15 y el día 30 pos tratamiento.

Posteriormente, mediante el uso de un asa biológica, se colocaron 0.25 g de heces en tubos de 2 ml y se agregaron 2 ml de *DNA/RNA Shield*® con la finalidad de conservar la integridad del material genético de las muestras a temperatura ambiente (no se necesita refrigeración ni congelación) e inactivar completamente los agentes infeccioso (Kazantseva *et al.*, 2021; Natarajan *et al.*, 2021). Esta sustancia se agregó a las muestras correspondientes al día 0 y al día 15, en el caso del día 30, no se añadió.

Para el transporte de las muestras al Laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la FMVZ, UNAM, debidamente identificados los tubos que las contienen, se mantuvieron bajo una temperatura de 4°C.

6.5 Extracción de ADN

Todas las extracciones se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la FMVZ, UNAM (véase Imagen 1).

Las extracciones correspondientes al día 0 y día 15 de los tratamientos, se llevaron a cabo con el uso del kit *Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial*

Miniprep Kit. Siguiendo las instrucciones del protocolo descrito por el fabricante (Figuras 8 y 9).

En el caso de las muestras del día 30, se utilizó el kit *QIAamp® PowerFecal® DNA kit*, se utilizó de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (Figura 10).



Imagen 1. Proceso de extracción de ADN en el DNAB, FMVZ-UNAM

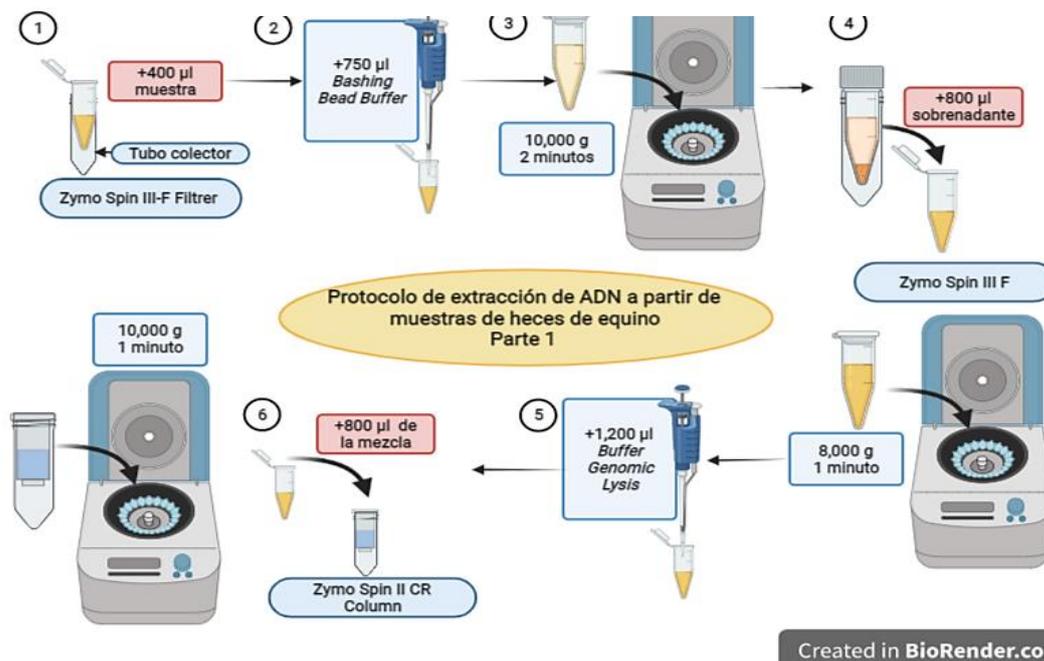


Figura 8. Primera etapa del proceso para extraer ADN a partir de muestras de heces de equino mediante el uso de kit *Zymo Research, Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit*. (Zymo Research 2022. Creado con *BioRender.com* por González-Serrano N.)

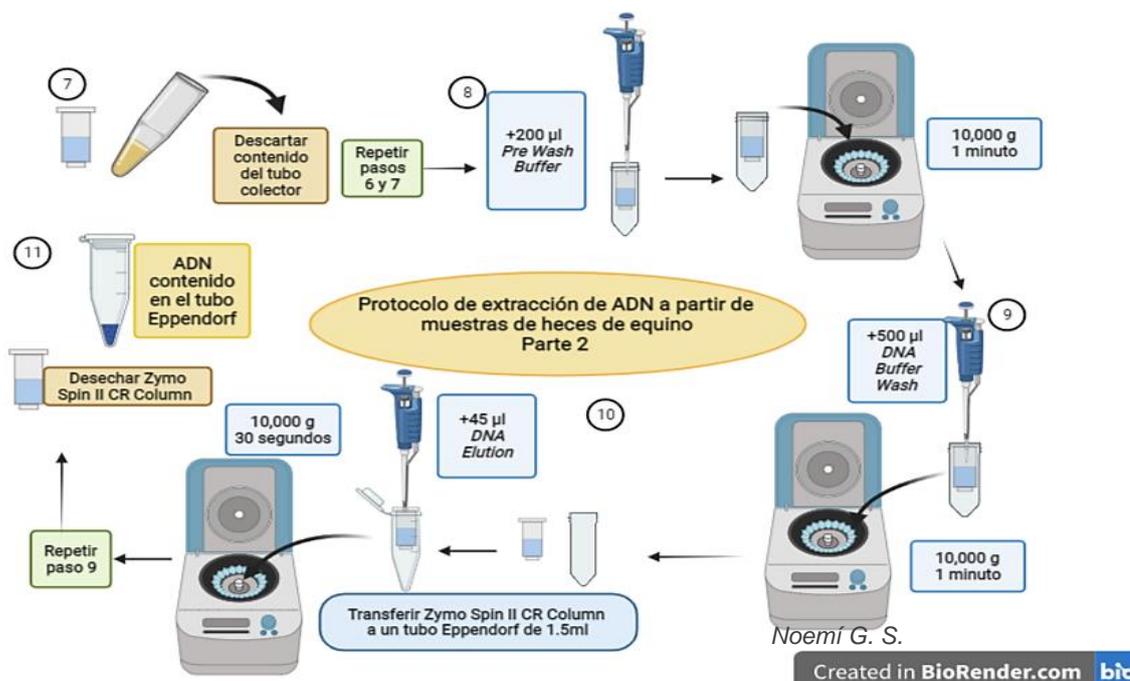


Figura 9. Segunda etapa del proceso para extraer ADN a partir de muestras de heces de equino mediante el uso de kit Zymo Research, Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit (Zymo Research 2022. Creado con BioRender.com por González-Serrano N.)

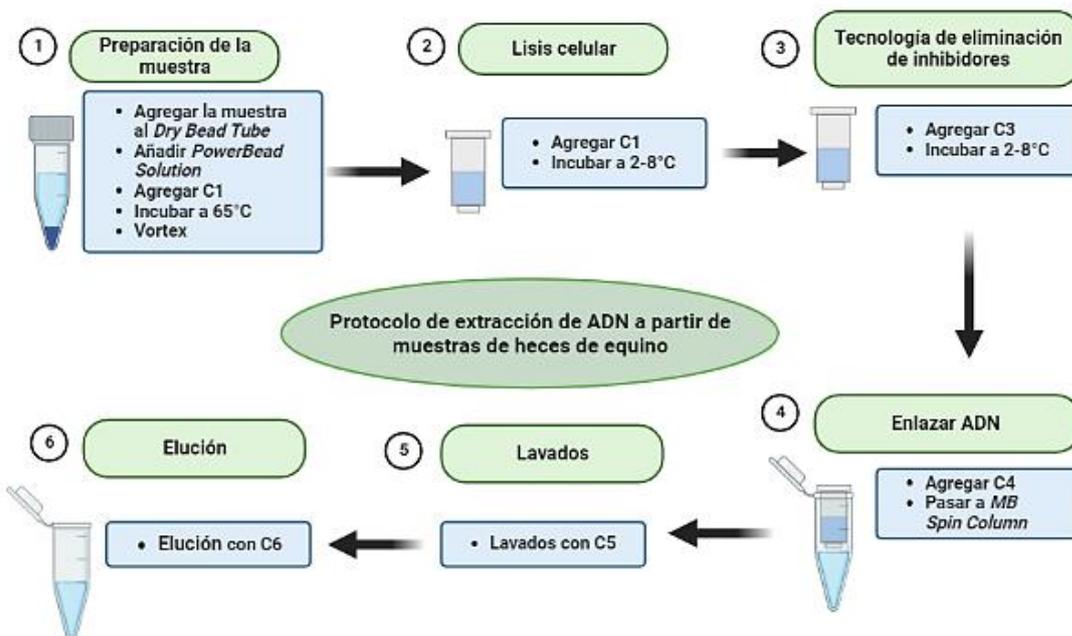


Figura 10. Proceso de extracción de ADN a partir de muestras de heces de equino mediante el uso del kit QIAamp® PowerFecal® DNA kit (Adaptada de QIAamp PowerFecal DNA Kit Handbook. Creado con BioRender.com por González-Serrano N.)

6.6 Cuantificación e integridad de ADN

Las muestras de DNA se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop One Touch (Thermo Scientifi, USA) (véase Imagen 2). Se seleccionaron aquellas cuya concentración de ADN fue mayor a 10 ng/ μ L y el resto se descartaron. Así mismo, se tomó en cuenta la relación A_{260}/A_{280} considerando que, en procariontas, debe ser entre 1.8 y 2.0 nm ya que si es menor a 1.8 significa que está contaminado con proteínas y/o componentes de derivados de proteínas contaminantes que afectan a las moléculas de ADN, y si es mayor a 2.0 significa que está contaminado con ARN (Suddin *et al.*, 2019).

La integridad de DNA se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Sambrook y Russell, 2012) comparando el peso molecular de cada muestra con los pesos indicados por el marcador de peso molecular que va de 150 pares de bases (pb) a 10,000 pb (10 kpb). Posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador UV y se capturó la fotografía del gel.

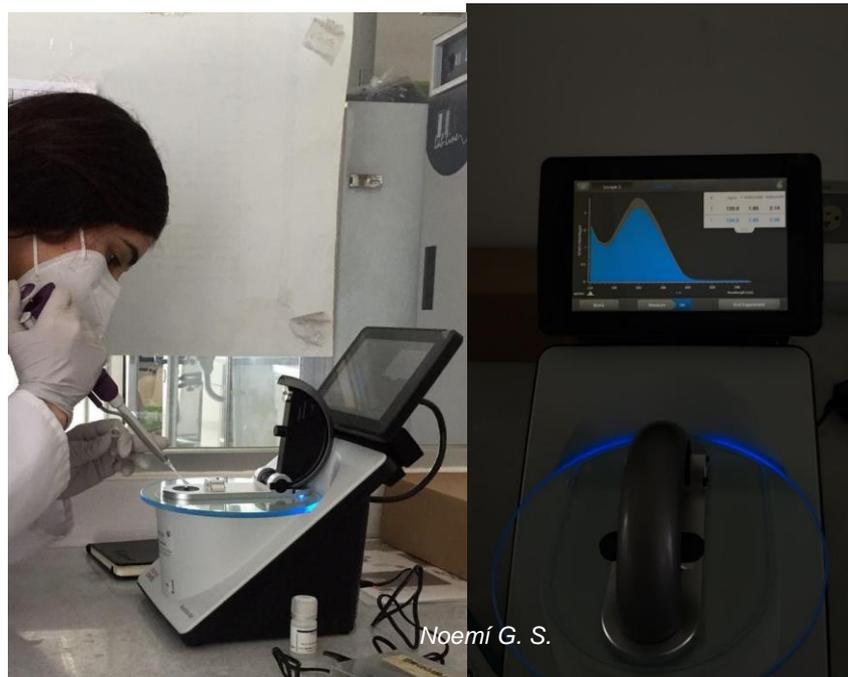


Imagen 2. Cuantificación de las muestras de ADN obtenido realizada en espectrofotómetro *Nanodrop One Touch* (Thermo Scientifi, USA)

6.7 PCR tiempo real (qPCR)

Previamente, las muestras se llevaron a una concentración de 10 ng de ADN por microlitro en un volumen total de 40 μ L (véase Imagen 3).

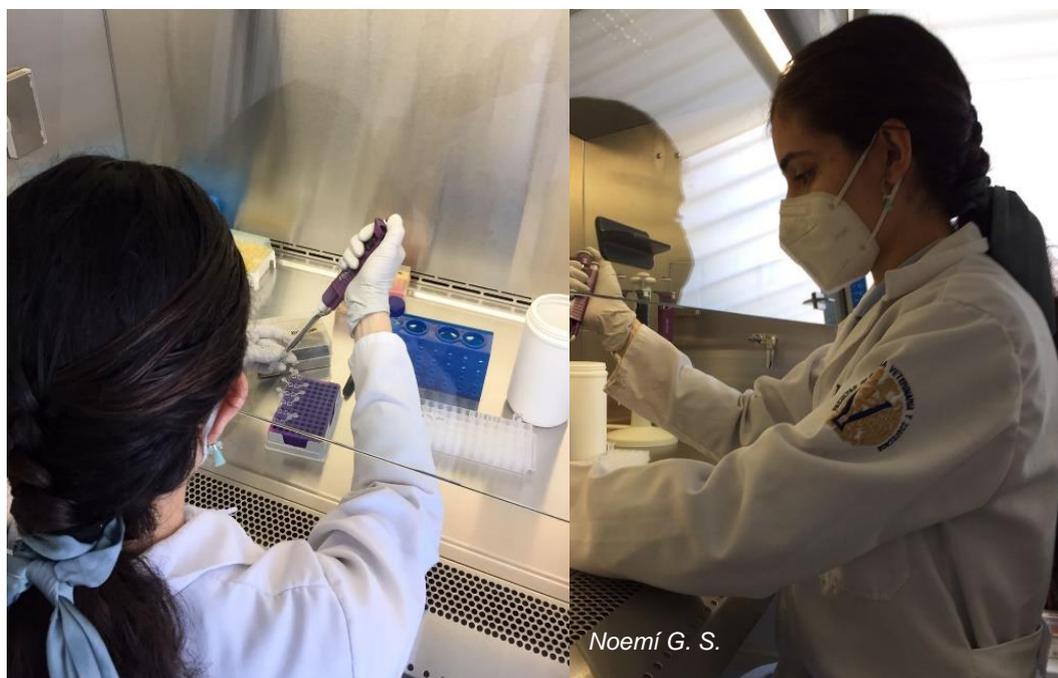


Imagen 3. Preparación de las muestras de AND y los reactivos necesarios para la qPCR en campana de flujo laminar.

Las qPCR se realizaron en la Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM. Se identificaron los siguientes microorganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. equi*, *L. mucosae*, *L. delbruekii*, cuyos primers, correspondientes al ITS (*Intergenic Spacer Region*) 16s-23s, se seleccionaron a partir de una búsqueda bibliográfica y se analizó el porcentaje de similitud de secuencia en el sitio web del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (véase cuadro 3).

Para llevar la técnica de qPCR a cabo se utilizó un termociclador de qPCR (Rotor-Gene® Q MDx, E.U.A.) programado con las condiciones señaladas en la ficha técnica del *Máster mix* (KAPA SYBR® FAST qPCR Máster Mix (2X) Kit):

- Desnaturalización inicial: 95°C por 15 minutos
- Desnaturalización (45 ciclos): 94°C por 15 segundos
- Alineación: 60°C por 30 segundos
- Extensión: 72°C por 30 segundos
- *Melting*: 65 a 95°C por 20 segundos

Cuadro 3. Microorganismos seleccionados y sus *primers* correspondientes

Microorganismo	Secuencia	Tamaño aproximado, número de pares de bases (pb)	% de similitud de secuencia (NCBI-BLAST)	Referencia
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F: CCT TTC TAA GGA AGC GAA GGA T R: ACG CTT GGT ATT CCA AAT CGC	129	100	Kim et al., 2020
<i>Lactobacillus salivarius</i>	F: GTT CTC CTA CGG CTA CCT TGT TAC G R: TTC TCA GTT CGG ATT GTA GGC TG	225	100	Kim et al., 2020
<i>Lactobacillus reuteri</i>	F: GAT TGA CGA TGG ATC ACC AGT R: CAT CCC AGA GTG ATA GCC AA	161	100	Kim et al., 2020
<i>Lactobacillus equi</i>	F: TGA CCT GGG CTA CCA CGT G R: ACT GGA CCC GAT GGT GCA C	150	100	Li et al., 2022
<i>Lactobacillus mucosae</i>	F: ACG GAC TTG ACG TTG GTT TAC R: GTG ATA GCC GAA ACC ACC TT	156	100	Kim et al., 2020
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	F: CAT GTG CAG ACA TGC TAT CCT T R: CTC TGA AGT GCC ATG TCT CAG T	192	100	Kim et al., 2020
Bacterias generales	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: GT1TT1CCGCGGCTGCTG	122	-	

6.8 Cálculo de abundancia relativa

La abundancia relativa de los microorganismos se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (García-Rodríguez, 2019).

6.9 Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los valores fueron representados como los promedios \pm el error estándar de la media. Los valores de expresión relativa de cada tratamiento (IVM, IVM+SP, SP) se compararon por un ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Tukey ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados mediante el uso del programa *Rstudio*:

$$\text{Modelo } Y_{ij} = \mu_i + \epsilon_{ij} \quad i=1,2 \dots, t; j=1,2 \dots, r$$

Donde Y_{ijk} =variable de respuesta (abundancia relativa de las especies de lactobacilos), μ = media general, τ_i =efecto del tratamiento al nivel 1, ϵ_{ijk} efecto de error aleatorio.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación de ADN de las muestras seleccionadas

Se cuantificó el ADN de las muestras seleccionadas (concentración mayor a 10 ng/ μ L), y se analizó su pureza con base en la relación A260/A280. En los tres tratamientos, la relación A260/A280 se encuentran dentro del parámetro mencionado en la literatura siendo 1.8 el promedio en el tratamiento 1 (IVM); respecto al tratamiento 2 (IVM + SP) el promedio de la relación A260/A280 es de 1.84 y del tratamiento 3 (SP) 1.89 (véase cuadro 4).

7.3 Integridad de ADN: electroforesis en gel agarosa

Mediante la técnica de electroforesis en gel agarosa se comprobó la integridad del ADN extraído. Las muestras correspondientes al día 0 (véase Imagen 4a) extraídas con el kit *Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)*, presentaron un peso molecular cercano a las 10 kpb. La muestra T1-C15-D0 no se observó en la primera electroforesis realizada, por lo que se repitió su procesamiento y se comprobó que se trató de un error al realizar la técnica. Las

muestras obtenidas al día 15 (véase imagen 4b) extraídas con el kit *Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)*, al igual que el caso anterior, presentaron un peso molecular cercano a las 10 kpb. En el caso de las muestras obtenidas al día 30 (véase imagen 4c) extraídas mediante el uso del kit *QIAamp® PowerFecal® DNA kit*, tienen un peso molecular cercano a las 9 kpb.

Cuadro 4. Concentración de ADN, valores de la relación A260/A280 y de la relación A260/A230 de las muestras seleccionadas.

Muestra*	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación A260/A280	Relación A260/A230	Muestra*	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación A260/A280	Relación A260/A230
T1-C13-D0	19.4	1.75	0.08	T2-C7-D15	14.9	1.88	0.48
T1-C14-D0	14.4	1.85	0.18	T2-C8-D15	18.2	1.86	0.03
T1-C15-D0	24	1.85	0.44	T2-C9-D15	8.3	1.74	0.16
T1-C16-D0	31.3	1.79	0.21	T2-C10-D15	28.6	1.73	0.83
T1-C17-D0	22.2	1.75	0.53	T2-C11-D15	23.5	1.84	0.73
T1-C18-D0	36	1.91	0.17	T2-C12-D15	20	1.70	0.03
T1-C13-D15	19	1.64	0.33	T2-C7-D30	97.25	1.90	2.16
T1-C14-D15	19	1.80	0.43	T2-C8-D30	108.68	1.87	2.14
T1-C15-D15	21.6	1.72	0.30	T2-C9-D30	83.9	1.89	2.12
T1-C16-D15	40.5	1.81	0.52	T2-C10-D30	188.92	1.88	2.02
T1-C17-D15	17.2	1.68	0.49	T2-C11-D30	110.64	1.87	1.93
T1-C13-D30	112.83	1.86	1.88	T1-C12-D30	117.84	1.87	2.13
T1-C14-D30	103	1.85	2.10	T3-C5-D0	13.6	1.93	0.15
T1-C15-D30	107.27	1.86	1.91	T3-C6-D0	22.1	1.82	0.04
T1-C16-D30	61.3	1.85	1.98	T3-C1-D15	13.4	1.97	0.41
T1-C17-D30	94.3	1.84	2.04	T3-C2-D15	10	1.88	0.14
T1-C6-D30	37.2	1.86	1.99	T3-C5-D15	12.8	1.97	0.21
T2-C7-D0	26.9	1.85	0.59	T3-C1-D30	71.83	1.87	2.14
T2-C8-D0	26.9	1.91	0.61	T3-C2-D30	108.68	1.87	2.18
T2-C9-D0	15.8	1.85	0.29	T3-C4-D30	112.72	1.88	2.11
T2-C10-D0	32	1.88	0.28	T3-C5-D30	65.91	1.89	2.21
T2-C11-D0	44.2	1.84	0.09	T3-C6-D30	100.57	1.89	2.24
T2-C12-D0	15.6	1.84	0.08				

*T: tratamiento, C: identificación del caballo, D: día

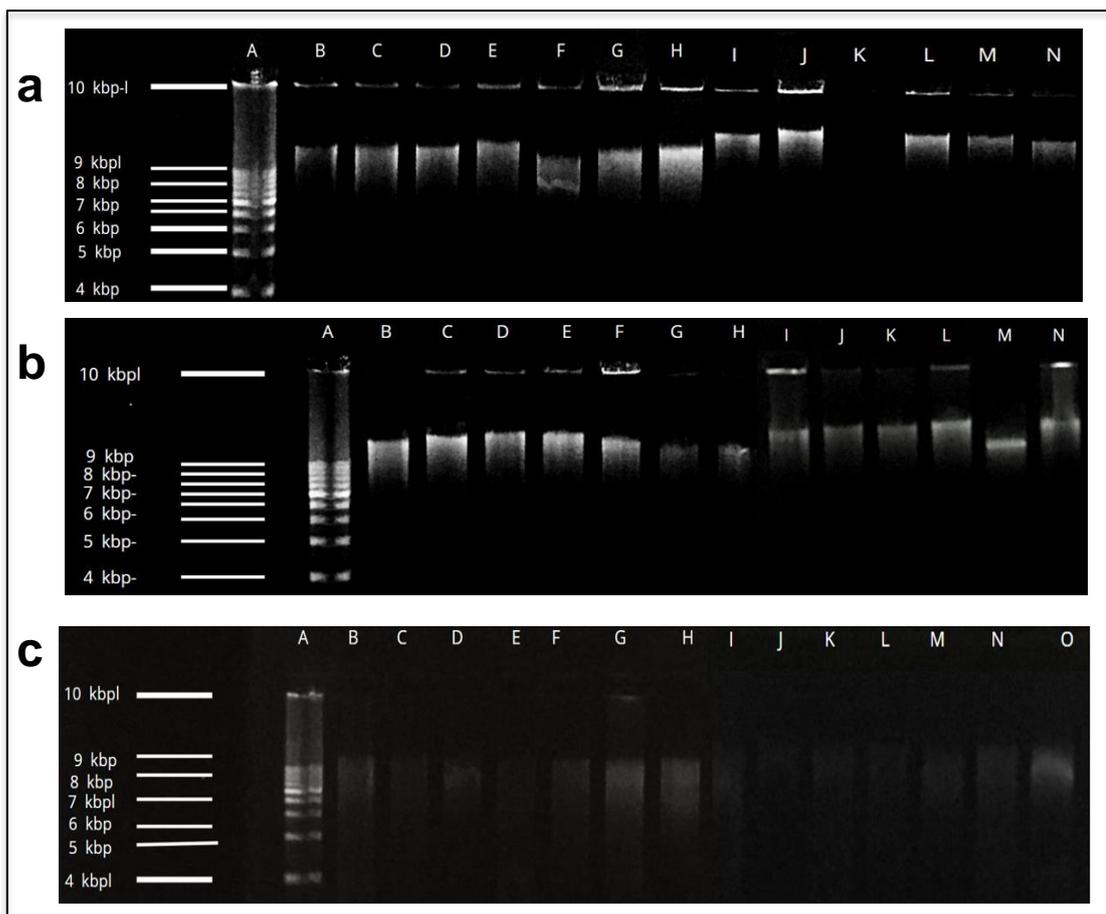


Imagen 4. Reconocimiento de la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. **4a:** ADN extraído mediante el *Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)* correspondiente al día 0 del tratamiento. **A:** carril donde se colocó el marcador de peso molecular, **B:** muestra T3-C5-D0, **C:** muestra T2-C7-D0, **D:** muestra T2-C8-D0, **E:** T2-C9-D0, **F:** muestra T2-C10-D0, **G:** muestra T2-C11-D0 **H:** T2-C12-D0, **I:** muestra T1-C13-D0, **J:** muestra T1-C14-D0, **K:** muestra T1-C15-D0, **L:** T1-C16-D0, **M:** muestra T1-C17-D0, **N:** muestra T1-C18-D0. La muestra T1-C15-D0 no se observa debido a un error durante la realización de la técnica. **4b:** ADN extraído mediante el *Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)* correspondiente al día 15 del tratamiento. **A:** marcador de peso molecular, **B:** muestra T1-C15-D0. **C:** muestra T3-C1-D15, **D:** muestra T3-C5-D15, **E:** muestra T2-C7-D15, **F:** muestra T2-C8-D15, **G:** muestra T2-C10-D15, **H:** muestra T2-C11-D15. En el carril B se observa la muestra T1-C15-D0 por lo que se comprueba que se trataba de un error durante el procesamiento y cuenta con material genético íntegro. **I:** muestra T2-C12-D15, **J:** muestra T1-C13-D15, **K:** muestra T1-C14-D15, **L:** muestra T1-C15-D15, **M:** muestra T1-C16-D15, **N:** muestra T1-C17-D15. **4c:** Reconocimiento de la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, de ADN extraído mediante el kit *QIAamp® PowerFecal® DNA kit)* correspondiente al día 30 del tratamiento **A:** marcador de peso molecular, **B:** muestra T3-C1-D30, **C:** muestra T3-C2-D30, **D:** muestra T3-C4-D30, **E:** muestra T3-C5-D30, **F:** muestra T3-C6-D30, **G:** muestra T3-C7-D30, **H:** T2-C8-D30, **I:** muestra T2-C9-D30, **J:** muestra T2-C10-D30, **K:** muestra T2-C11-D30, **L:** muestra T2-C12-D30, **M:** muestra T1-C13-D30, **N:** muestra T1-C14-D30, **O:** muestra T1-C15-D30

7.3 Abundancia relativa

continuación, se describen los datos obtenidos a partir del análisis realizado con base en los datos obtenidos de las PCR tiempo real. Como se puede observar en la Figura 11A, cuando los animales recibieron IVM, la abundancia relativa de *Lactobacillus acidophilus* en el día 15 disminuyó 94.5% ($p < 0.05$) en comparación con el día 0 y después, al día 30, su abundancia relativa incrementó ($p < 0.05$). En el caso del tratamiento 2 (IVM + SP) (Figura 11B) observamos que después de 15 días de tratamiento la abundancia relativa de este microorganismo disminuye 66.7% ($p < 0.05$) en comparación con el día 0 y de manera interesante, después de 30 días de tratamiento su abundancia incremento ($p < 0.05$) 36.7% en comparación con el día 0 y 375% en comparación con el día 15. Por último, en el caso del tratamiento 3 (SP) (Figura 11C) observamos un incremento ($p < 0.05$) en la abundancia relativa de *Lactobacillus acidophilus* de 124 y 120.6% en el día 15 y 30, respectivamente, en comparación con el día 0.

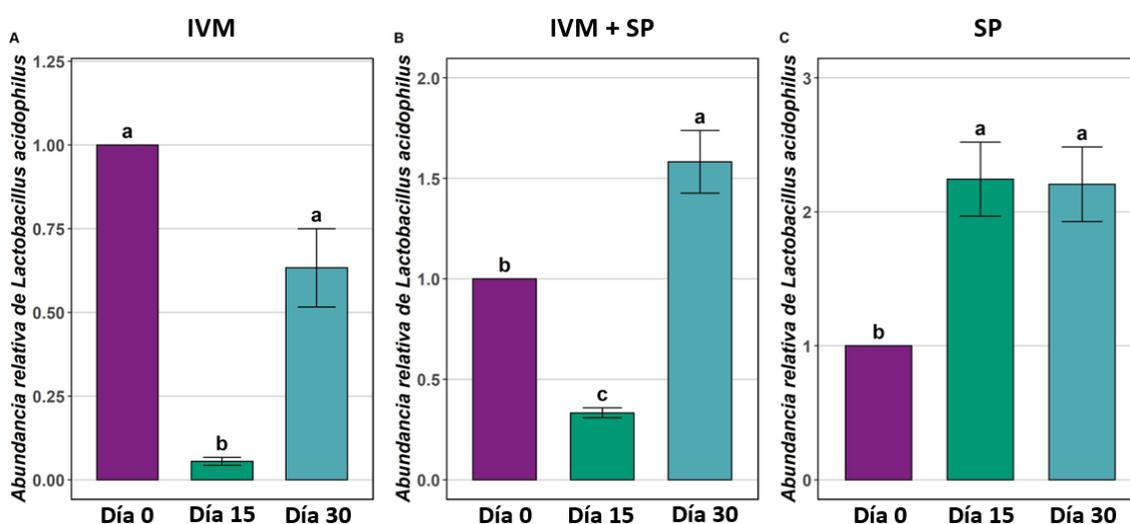


Figura 11. Abundancia relativa de *Lactobacillus acidophilus*

En la Figura 12A, correspondiente a *L. salivarius*; se observa una disminución ($p < 0.05$) de la abundancia relativa del 94.5% al día 15 pos tratamiento en comparación con el día 0 antes de la administración del tratamiento 1, mientras que al día 30 hay una disminución ($p < 0.05$) de 36.7% en comparación con el día 0 (pretratamiento). En el caso del tratamiento 2 (Figura 12B) hay una disminución ($p < 0.05$) del 52.2% al día 15, mientras que al día 30 tiene un aumento ($p < 0.05$) significativo de 94.70%. Al administrar únicamente el SP a los caballos (Figura 12C), se presenta un aumento ($p < 0.05$) del 33.2% en el día 15, mientras que a los 30 días de tratamiento disminuyó ($p < 0.05$) un 8.8%.

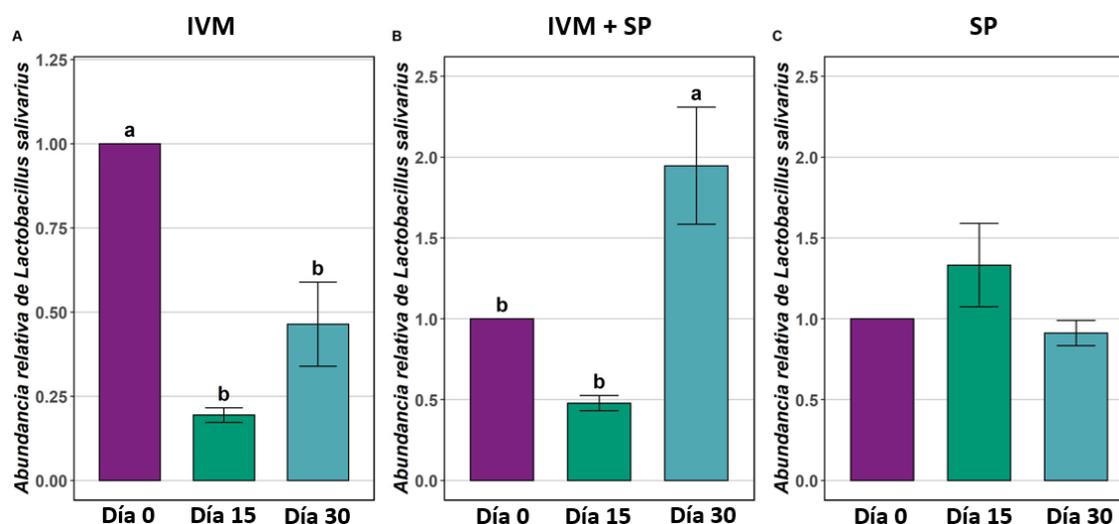


Figura 12. Abundancia relativa de *Lactobacillus salivarius*

El caso de *L. mucosae*, al administrar el tratamiento 1 se observa una disminución ($p < 0.05$) de la abundancia relativa al día 15 del tratamiento y al día 30, siendo de 96.5% y 91.9% respectivamente (Figura 13A). Cuando se combina el tratamiento antihelmíntico con el suplemento (IVM+ SP) (Figura 13B), también se presenta una disminución ($p < 0.05$), en este caso del 84% al día 15, mientras que al día 30 disminuye ($p < 0.05$) un 24.8% en comparación con el día 0. En aquellos individuos a los cuales solo se les administró el suplemento (SP) (Figura

13C), se observó una disminución ($p < 0.05$) del 61.2% al día 15, y del 92% a los 30 días de su administración.

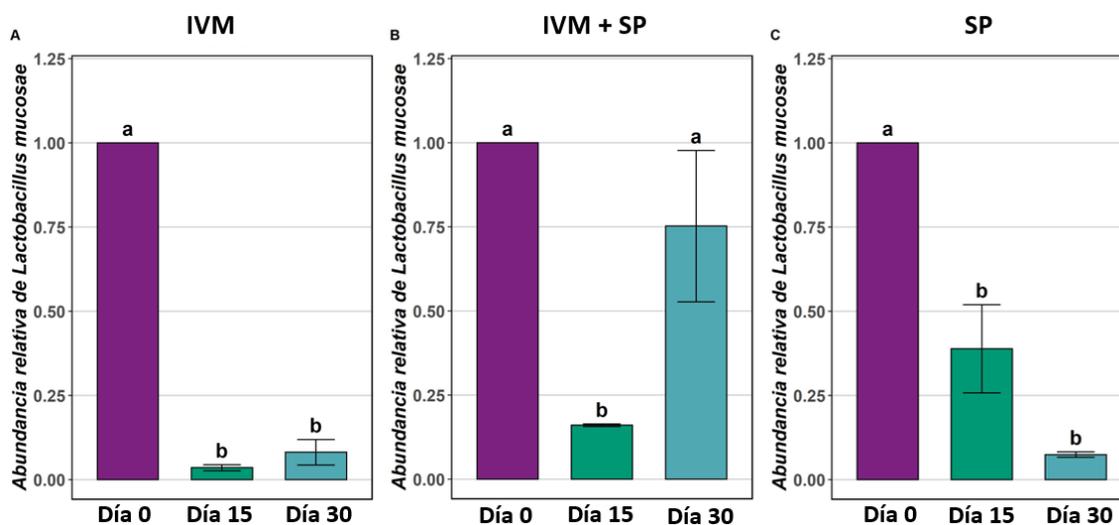


Figura 13. Abundancia relativa de *Lactobacillus mucosae*

Los resultados de la abundancia relativa de *Lactobacillus reuteri* al administrar el tratamiento 1 (Figura 14A) manifiestan una disminución ($p < 0.05$) al día 15 pos tratamiento del 83.6% y al día 30 hay un aumento de 57.10%. Al dar a los ejemplares el tratamiento 2, hay una disminución del 92.4% al día 15 ($p < 0.05$), mientras que al día 30 disminuye ($p < 0.05$) solo 35.2% en comparación con el día 0. En cambio, al administrar solo el suplemento (SP), la abundancia disminuyó ($p < 0.05$) 76.5% en el día 15, y 74% al día 30.

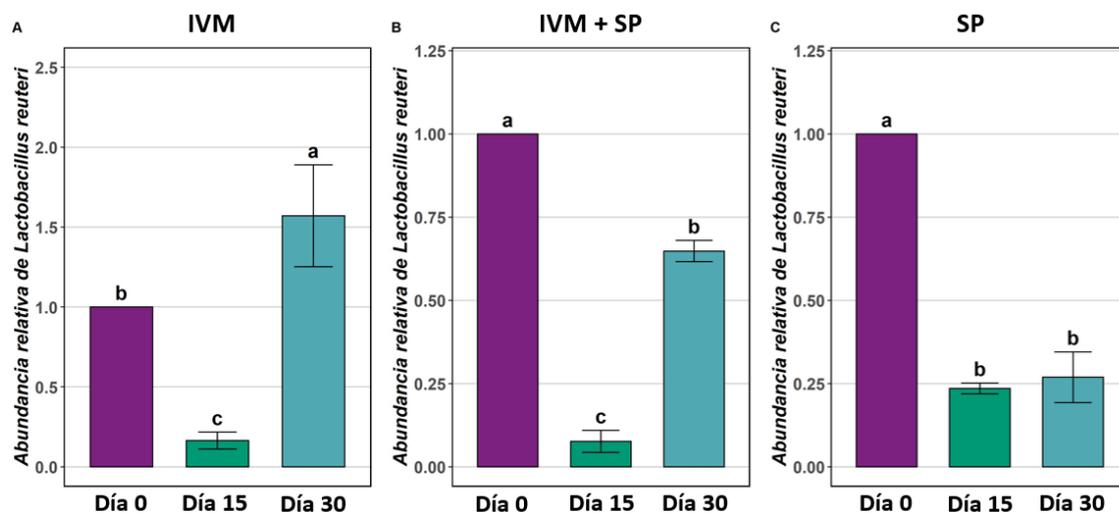


Figura 14. Abundancia relativa de *Lactobacillus reuteri*.

Lactobacillus delbruekii presenta un evidente aumento ($p < 0.05$) de su abundancia relativa del 365.1% al día 15 del tratamiento 1 (Figura 15A) en comparación con el día 0 antes de la administración del tratamiento, mientras que al día 30 hay una disminución ($p < 0.05$) interesante del 90% en comparación con el día 0 (pretratamiento). Respecto al tratamiento 2 (Figura 15B) hay una disminución ($p < 0.05$) a lo largo de los días, siendo del 77% al día 15 y del 95.7% al día 30. De igual manera, al administrar el tratamiento 3, la abundancia relativa disminuye ($p < 0.05$) a lo largo del periodo siendo de un 59.7% al día 15 y de un 98.3% a los 30 días.

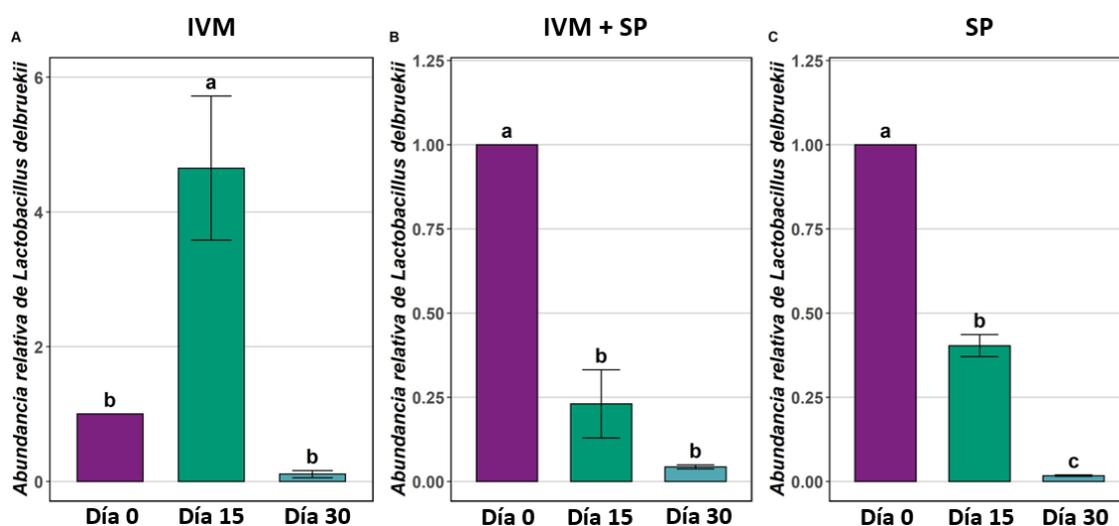


Figura 15. Abundancia relativa de *Lactobacillus delbruekii*

Por último; la abundancia relativa de *Lactobacillus equi* presenta los siguientes cambios. Después de la administración del primer tratamiento (Figura 16A), los valores de la abundancia relativa no son detectables a los 15 días, mientras que al día 30 hay un aumento ($p < 0.05$) interesante del 390.30% en comparación con el día 0. Al administrar en conjunto con el fármaco el suplemento (IVM + SP) (Figura 16B), se presenta una disminución ($p < 0.05$) del 86% al día 15, mientras que al día 30 aumenta ($p < 0.05$) sorprendentemente un 292.9% en comparación

con el día 0. Cuando solo se administra el suplemento (SP) (Figura 16C), hay un aumento ($p < 0.05$) del 51.20% en el día 15, mientras que al día 30 aumenta ($p < 0.05$) un 27.20% respecto al día 0.

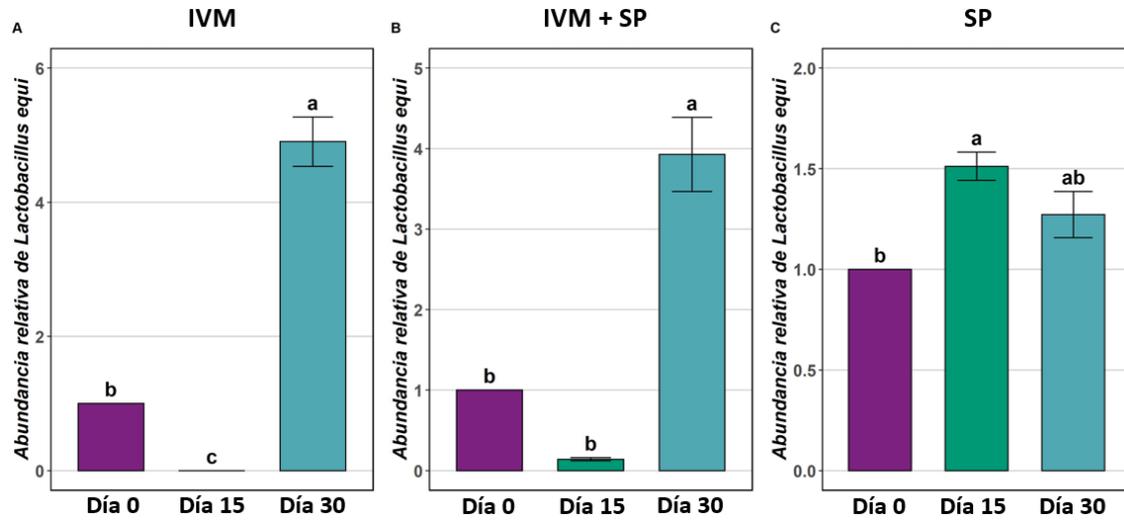


Figura 16. Abundancia relativa de *Lactobacillus equi*.

8. DISCUSIÓN

Se sabe comúnmente que los caballos domésticos son vulnerables a enfermedades del tracto gastrointestinal (Ang *et al.*, 2022; Al Jassim *et al.*, 2009), lo cual se relaciona con su domesticación que los condujo a modificaciones dentro de su microbioma, reduciendo la resistencia a enfermedades (Ang *et al.*, 2022). Por esta razón, es importante el estudio de la microbiota y macrobiota equina a través de herramientas como son las técnicas moleculares.

En el presente estudio, fue posible extraer y obtener DNA de buena calidad de muestras de heces de caballo. Este DNA permitió la identificación, por medio de qPCR, de diferentes especies de *Lactobacillus*.

Para lograr los resultados mencionados, existen varios aspectos a considerar a lo largo de todo el proceso, comenzando por la recolección de las muestras. Los procedimientos de recolección de muestras representan uno de los primeros pasos cruciales que aseguran la integridad y estabilidad del material recolectado. En el caso de las heces, es uno de los materiales biológicos más complejos para el aislamiento de ADN bacteriano (Panek *et al.*, 2018) por la gran cantidad de bacterias, células vegetales y una variedad de moléculas inhibidoras presentes que dificultan la posterior amplificación por PCR (Panek *et al.*, 2018; Kazantseva *et al.*, 2021). Por lo tanto, para la realización de técnicas moleculares, es indispensable ser minuciosos en cada uno de los pasos que se llevan a cabo, implementando una selección detallada del diseño experimental desde la obtención de la muestra para la posterior interpretación de los resultados.

En la conservación de las muestras de heces, para la realización de técnicas moleculares como extracción de ADN, la congelación inmediata es aceptada como la mejor práctica, sin embargo, no siempre es posible (Kazantseva *et al.*,

2021); sobre todo cuando se recolectan en campo, como es en la mayoría de los casos dentro de la Medicina Veterinaria. Además, el microbioma de las muestras fecales congeladas puede cambiar con el tiempo. Es por esto, que surge la necesidad de la búsqueda de nuevas tecnologías como es el uso de protectores de ADN, p. ej. *DNA/RNA Shield*®, una solución confiable que presenta un impacto bajo en la distribución bacteriana, al menos durante tres semanas, a diferentes temperaturas y ciclos de descongelación (Kazantseva *et al.*, 2021; Natarajan *et al.*, 2021). Siendo una herramienta útil para la recolección, conservación y almacenamiento de muestras de heces en campo cuando no se cuenta con materiales para mantenerlas bajo congelación y facilitando el transporte de estas.

La extracción de ADN de las heces representa el paso esencial para obtener ADN de buena calidad y garantizar una identificación precisa de la composición microbiana y la abundancia relativa (Panek *et al.*, 2018). Puede ser un desafío, como se mencionó anteriormente, debido a la gran cantidad de moléculas inhibitoras como polisacáridos, polifenoles, bilis, entre otros. Aunque se han utilizado protocolos que no son de kit, como el fenol-cloroformo y el fenol EDTA, los kits comerciales se utilizan rutinariamente ya que reducen la exposición del personal a reactivos tóxicos y agilizan el proceso de extracción, permitiendo un procesamiento rápido de muestras (Shepherd *et al.*, 2015). Por lo tanto, es fundamental evaluar las metodologías disponibles para la extracción de ADN bacteriano de las heces y optimizar los protocolos para obtener suficiente cantidad, pureza e integridad de ADN, es decir, muestras de alta calidad para estudios posteriores. En el desarrollo del presente estudio, fueron necesarias modificaciones en los protocolos de extracción evidenciando el desafío que

representa la extracción de ADN fecal, específicamente de equinos, considerando también la escasa información que describe el procesamiento de muestras para estos fines. Por lo tanto, este estudio permite sentar precedentes sobre la extracción de DNA, ya que, de acuerdo con nuestro conocimiento, en el país actualmente son escasos los estudios que se enfocan en el estudio de la microbiota de las heces de caballos.

La mayoría de las muestras de ADN obtenidas cumplen con los estándares de calidad de ADN genómico de procariontes considerando los valores de la relación A260/A280, entre 1.8-2.0 nm, (Suddin *et al.*, 2019) a pesar de que se utilizaron dos kits diferentes para su extracción. Sin embargo, hay diferencias en la concentración de ADN entre las muestras del día 30 y las demás siendo mayor en las primeras. A pesar de esto, las imágenes de los geles de electroforesis en gel agarosa del ADN obtenido del día 0 y día 15 pos tratamiento, cuyas muestras fueron preservadas con *DNA/RNA Shield*® y el material genético fue extraído con el kit *Zymo Research (Quick DNA fungal/bacterial Miniprep Kit)*, presentan una mejor calidad en comparación con las obtenidas a partir de las muestras de ADN del día 30, las cuales fueron procesadas por el kit *QIAamp*® *PowerFecal*® *DNA kit* y no se conservaron con *DNA/RNA Shield*®. Esto puede deberse a la intervención del *DNA/RNA Shield*®.

Respecto al procedimiento de qPCR, se logró la identificación de los lactobacilos seleccionados en este experimento, los cuales se habían reportado con anterioridad presentes dentro de la microbiota cecal y colónica de los caballos (Dicks *et al.*, 2014) a excepción de *L. acidophilus* que se ha demostrado tras su administración, que tiene posibles propiedades probióticas dentro de la microbiota equina (Laghi *et al.*, 2018; Collinet *et al.*, 2019). Por lo tanto, el haberlo

encontrado como parte de la microbiota, representa un hallazgo que, hasta el momento, de acuerdo con nuestro conocimiento, no se ha reportado con anterioridad.

Sin embargo, es importante destacar que la amplificación de los lactobacilos se basó en el 16S, siendo los *primers* correspondientes a la ITS 16s-23s, por medio del cual, las clasificaciones son más efectivas a nivel de phyla y, en menor medida, a nivel de género y carecen de precisión a nivel de especie (McDonald *et al.*, 2005; Konstantinidis *et al.*, 2006; Poretsky *et al.*, 2014). Esto se debe a que el amplicón 16S amplifica sólo una región de todo el genoma bacteriano y esto representa un reto porque existe la posibilidad de transferencia horizontal de genes dificultando la identificación de especies bacteriana (Xia *et al.*, 2011; Ranjan *et al.*, 2016; Tettamanti *et al.*, 2020). Por lo tanto, se requieren más estudios, que incluyan técnicas que presentan más ventajas que usar la región 16s como la Secuenciación de escopeta (*Shotgun sequencing*), para confirmar lo observado en el presente estudio.

Es fundamental retomar el concepto de holobionte para poder ampliar nuestro panorama en cuanto a las diversas interacciones que existen entre los componentes tanto de la microbiota como de la macrobiota equina, así como el propio holobionte (véase Figura 7). En el caso que nos compete, los resultados evidencian una compleja relación entre los ciatostominos y la microbiota bajo los efectos tanto del antihelmíntico como del suplemento; al administrar el tratamiento antihelmíntico, la población de ciatostominos se ve afectada, y se observa que las especies de lactobacilos seleccionadas también por lo que existe una alteración en la microbiota como se ha reportado con anterioridad, (Peachey *et al.*, 2018; Kunz *et al.*, 2019; Garber *et al.*, 2020) incluyendo la

interacción entre los parásitos y la microbiota intestinal (Daniels *et al.*, 2020), así mismo, el efecto de las lactonas macrocíclicas, en este caso IVM, tiene un efecto negativo en los lactobacilos seleccionados (a excepción de *L. delbrueckii*) caso contrario a lo observado anteriormente por Hu *et al.* 2021 y Daniels *et al.* 2020 en equinos, que reportan una reducción en las bacterias celulolíticas y el pH cecal seguido de un aumento en los lactobacilos después del tratamiento con moxidectina (Daniels *et al.*, 2020, Hu *et al.*, 2021).

Podemos sospechar de una relación simbiótica, entre los ciatostominos y las especies de lactobacilos a excepción de *L. delbrueckii*, tal como se ha reportado en otras especies como los ratones (Garber *et al.*, 2020). Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar estas sospechas.

Dada la importancia de la microbiota bacteriana comensal para la regulación inmunitaria y la resistencia a la colonización (véase Figuras 2 y 3), existe interés en el uso de suplementos de soporte digestivo que incluyen probióticos, es decir, cepas específicas o mezclas de especies bacterianas que benefician la microbiota de los individuos, y prebióticos, alimentos o nutrientes, normalmente fibras, destinados a fomentar el crecimiento de bacterias beneficiosas (Garber *et al.*, 2020), por lo tanto, el conocer el efecto que estos productos comerciales tienen en la microbiota equina resulta interesante. A continuación, se dan a conocer interpretaciones de los posibles escenarios que están ocurriendo dentro del microbioma equino y se reflejan en los cambios en la abundancia de los lactobacilos seleccionados para este estudio.

La disminución tras la administración de IVM en la abundancia de *L. acidophilus*, seguida por un aumento, sin llegar al valor inicial, podría deberse a un efecto de resiliencia por parte de la microbiota, y algunos grupos de microorganismos,

entre ellos *L. acidophilus*, cambiaron en cuanto a cantidad. Cuando se combina IVM con SP, ocurre algo similar, sin embargo, la abundancia de *L. acidophilus* no solo regresa a su valor inicial, sino que también aumenta a los 30 días, lo cual, indica que el suplemento ayuda a la respuesta de resiliencia por parte de *L. acidophilus* ante el causante de la perturbación en la microbiota (IVM); al dar solamente SP, se observan únicamente un incremento y se mantiene a los 30 días por lo que posiblemente se trate de un escenario de resistencia, por parte del lactobacilo al efecto del suplemento. Por lo tanto, si consideramos a *L. acidophilus* como una especie benéfica para los equinos (Laghi *et al.*, 2018; Collinet *et al.*, 2019), el suplemento tiene un efecto positivo.

El efecto de IVM en la abundancia de *L. salivarius* es similar al anterior, mostrando también resiliencia ante IVM, curiosamente, al dar IVM y SP, esta población aumenta incluso más que su valor inicial posiblemente porque se encontraba en competencia con otras bacterias. Finalmente, solo con el SP, los cambios en la abundancia son menores semejando estabilización de la microbiota por parte del SP. Al considerar a *L. salivarius* como una especie cuya demasía dentro de la microbiota podría resultar contraproducente por la producción de AGV's en exceso (Milinovich *et al.*, 2010; Dicks *et al.*, 2014), entonces, el suplemento cumple con su función al menos en la regulación de esta bacteria.

De acuerdo a los resultados de abundancia relativa observados, *L. reuteri*, disminuye drásticamente bajo los efectos de IVM posiblemente por el fenómeno de resiliencia que esta ocasiona teniendo como consecuencia otras bacterias mayor proporción con las cuales existe una relación de competitividad con *L. reuteri* (Bernard *et al.*, 2011; Dicks *et al.*, 2015), luego la abundancia incrementa,

lo cual podría ser porque, pasado el periodo de supresión temporal de la producción de huevos en lactonas macrocíclicas que va de los 14 a los 17 días (Coles *et al.*, 2006), esta población se recupera (resiliencia). Al administrar el suplemento, esta especie bacteriana no vuelve a su abundancia inicial, sin embargo, al considerar la competitividad que se ha reportado por parte de esta especie y que los equinos se mostraron aparentemente sanos, podemos concluir que no era necesario el aumento de *L. reuteri*, al no presentarse disbiosis y mantenerse el equilibrio de la microbiota y macrobiota, por lo tanto, el suplemento parece funcionar.

Al analizar los cambios de abundancia relativa de *L. mucosae*, dentro de las alteraciones a la microbiota que ocasiona IVM, se observa una evidente disminución de *L. mucosae* en cambio, con el suplemento, este deceso se presenta a lo largo del tiempo de manera aparentemente escalonada. Esto se puede relacionar con la estabilización de la microbiota por parte del suplemento que apoya la resiliencia de la microbiota. A pesar de que se conoce poca información sobre la función de esta bacteria dentro de la microbiota del TGI equino, podemos intuir que para mantener la salud intestinal no es conveniente su proliferación de manera exacerbada (Milinovich *et al.*, 2010; Elghandour *et al.*, 2019) y por ello no vuelve a su abundancia inicial.

L. delbruekii es una especie bacteriana que se ha llegado a considerar peligrosa en grandes cantidades dentro de la microbiota equina pues se relaciona con la manifestación de laminitis en equinos (Milinovich *et al.*, 2010; Elghandour *et al.*, 2019), por lo tanto, el incremento en su abundancia es una consecuencia de la alteración por parte del antiparasitario, lo cual, cuando se administra el

suplemento, no ocurre, sino por el contrario, la abundancia disminuye como parte de la resiliencia de la microbiota en conjunto.

Finalmente, *L. equi*, especie de lactobacilo que se considera predominante dentro de la microbiota del intestino sano de equinos (Li *et al.*, 2022), se ve afectada con la administración del fármaco alcanzando niveles de abundancia no detectables, pero luego responde proliferando alcanzando niveles mayores a los observados antes del tratamiento (como parte de la resiliencia), en cambio, al juntar ambos tratamientos, antihelmíntico y suplemento, pareciera que el suplemento evita la desaparición de esta y al solo dar suplemento, se presenta un aumento de *L. equi*, pero los niveles de abundancia continúan cercanos al inicial, posiblemente se trata de un fenómeno de estabilidad como parte del efecto probiótico del suplemento.

Los potros y potrancas de este estudio, que, a su vez, forma parte de otro estudio a mayor escala, a pesar de encontrarse naturalmente parasitados por ciatostominos, no presentaron signos clínicos de enfermedad parasitaria, por lo tanto, los animales cursaban una parasitiasis e incluso podemos considerarlos como animales resilientes. Demostrando que el parasitismo no es un hecho aislado, siendo los principales factores para una resiliencia el bienestar animal y la buena alimentación (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2023). A su vez, a pesar de presentarse alteraciones dentro de su microbiota, no alcanzaron cuadros de disbiosis, demostrando la capacidad de resiliencia, por parte de las comunidades microbianas.

Por lo tanto, considero fundamental hacer énfasis en que existe una coevolución de los helmintos, la microbiota gastrointestinal y los hospederos, la cual se puede conocer y lograr su comprensión, a través de estudios de metagenómica y

metaproteómica para de esta manera integrar el conocimiento e implementar estrategias de control parasitario (ej. MIP Manejo Integrado de Parásitos) que contribuyan a la salud animal, salud pública y del medio ambiente.

9. CONCLUSIÓN

La hipótesis resultó no ser acertada, ya que se evidencian cambios en las poblaciones de lactobacilos seleccionadas incluso administrando el suplemento de soporte digestivo, los cuales son parte de diversas alteraciones dentro del holobionte (caballo) en cuanto a las poblaciones tanto de su microbiota como de su macrobiota. Así mismo, dichos cambios parecen relacionarse con el proceso de resiliencia de la microbiota ante el efecto perturbador de la IVM y, aparentemente, el suplemento sirve como apoyo en este proceso.

Existe una posible relación simbiótica entre los lactobacilos y los ciatostominos, esta relación podría tratarse de mutualismo, sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo.

10. PERSPECTIVAS

A partir de lo planteado en el presente escrito, los trabajos futuros relacionados con el estudio de la microbiota de ciego y colon en equinos, se orientan en el mejoramiento de los procedimientos de las técnicas moleculares como extracción de ADN y qPCR, así como el manejo de las muestras. Otro aspecto importante es el conocer las funciones que tienen otros grupos bacterianos dentro de la microbiota de los caballos para posteriormente identificar cambios en abundancias de estos otros grupos y su relación con otros factores además de los tratamientos antihelmínticos y suplementos de soporte digestivo.

Queda por dilucidar la compleja relación que existe entre las bacterias y los parásitos, en este caso, lactobacilos y ciatostominos, así como otras de las diversas relaciones que hay dentro del universo de la microbiota gastrointestinal equina para así llevar a cabo un manejo integral de los animales y evitar la presentación de complicaciones por parasitosis o disbiosis. Otro tema importante es la resistencia a los antihelmínticos que se vive en la actualidad, por lo que, el manejo de la microbiota equina, bien fundamentado basado en investigaciones, representa una potencial herramienta para mantener la salud intestinal de los animales y evitar el uso de fármacos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Al Jassim, R. A., Andrews, F. M., 2009. The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Vet. Clin. N. Am* 25,2, 199-215.
- 2) Allaband, C., McDonald, D., Vázquez-Baeza, Y., Minich, J., Tripathi, A., Brenner, D., Knight, R., 2019. Microbiome 101: studying, analyzing, and interpreting gut microbiome data for clinicians. *JGH*. 17, 218-230.
- 3) Ang, L., Vinderola, G., Endo, A., Kantanen, J., Jingfeng, C., Binetti, A., Salminen, S., 2022. Gut Microbiome Characteristics in feral and domesticated horses from different geographic locations. *Commun. Biol.*, 5,1, 1-10.
- 4) Bernard, W. V., Sebastian, M., Hemming, B., 2011. Salmonella antimicrobial activity of selected strains of enterolactobacillus species isolated from the gastrointestinal tract of the horse. *J Am Vet Med Assoc* 31,7, 396-399.
- 5) Clark, A., Sallé, G., Ballan, V., Reigner, F., Meynadier, A., Cortet, J., Mach, N., 2018. Strongyle infection and gut microbiota: profiling of resistant and susceptible horses over a grazing season. *Front. physiol*, 9, 272.
- 6) Collinet, A., Grimm, P., Julliand, S., Julliand, V., 2019. Oral administration of antibiotics alters fecal ecosystem of adult horses in the long-term. *J Equine Vet Sci* 76, 94.
- 7) Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Vercruyse, J. 2006. The detection of

- anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 136,3-4, 167-185.
- 8) Daniels, S. P., 2018. Anthelmintic treatment in horses: efficacy and effects on intestinal health. Tesis de Doctorado, Universidad de Surrey, Reino Unido, 1-8.
 - 9) Daniels, S. P., Leng, J., Swann, J. R., Proudman, C. J., 2020. Bugs and drugs: A systems biology approach to characterizing the effect of moxidectin on the horse's faecal microbiome. *Animal Microbiome* 2,1, 1-14.
 - 10) De La Torre, U., Henderson, J. D., Furtado, K. L., Pedroja, M., Elenamarie, O. M., Mora, A., Mienaltowski, M. J., 2019. Utilizing the fecal microbiota to understand foal gut transitions from birth to weaning. *PLoS One* 14,4, e0216211.
 - 11) Dicks, L. M. T., Botha, M., Dicks, E., Botes, M., 2014. The equine gastro-intestinal tract: an overview of the microbiota, disease, and treatment. *Livest. Sci.* 160, 69-81.
 - 12) Dicks, L. M., Botha, M., Loos, B., Smith, C., 2015. Adhesion of *Lactobacillus reuteri* strain Lr1 to equine epithelial cells and competitive exclusion of *Clostridium difficile* from the gastro-intestinal tract of horses. *Ann. Microbiol.*, 65,2, 1087-1096.
 - 13) Elghandour, M. M., Adegbeye, M. J., Barbabosa-Pilego, A., Perez, N. R., Hernández, S. R., Zaragoza-Bastida, A., Salem, A. Z., 2019. Equine contribution in methane emission and its mitigation strategies. *J. Equine Vet. Sci.*, 72, 56-63.

- 14) ESCCAP, 2019. A guide to the treatment and control of equine gastrointestinal parasite infections.
- 15) Garber, A., Hastie, P., Murray, J. A., 2020. Factors influencing equine gut microbiota: Current knowledge. *J. Equine Vet. Sci.* 88, 102943.
- 16) García, E., 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5ta Edición. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía.
- 17) García-Rodríguez Alicia., 2019. Implementación de técnicas de extracción de ADN a partir de líquido ruminal para la detección e identificación de microorganismos mediante PCR. Tesis digitales UNAM. 23-24.
- 18) Hesta, M., Costa, M., 2021. How Can Nutrition Help with Gastrointestinal Tract–Based Issues? *Vet Clin Equine*, 37,1, 63-87.
- 19) Hu, D., Yang, J., Qi, Y., Li, B., Li, K., Mok, K. M., 2021. Metagenomic analysis of fecal archaea, bacteria, Eukaryota, and virus in Przewalski's horses following anthelmintic treatment. *Frontiers in veterinary science*, 868.
- 20) Intriago Loor, Á. A., Velásquez Zambrano, F. J. ,2019. Eficacia antihelmíntica de las avermectinas (ivermectina y doramectina) en equinos. Bachelor's thesis, ESPAM MFL.
- 21) Jenkins, T. P., Brindley, P. J., Gasser, R. B., Cantacessi, C., 2018. Helminth microbiomes—a hidden treasure trove? *Trends Parasitol.* 35,1, 13-22.
- 22) 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, 1-15.

- 23) Kazantseva, J., Malv, E., Kaleda, A., Kallastu, A., Meikas, A. 2021. Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies. BMC microbiology, 21,1, 1-13.
- 24) Konstantinidis, K. T., Ramette, A., Tiedje, J. M., 2006. The bacterial species definition in the genomic era. Biological Sciences is Philos. Trans. R. Soc., 361,1475, 1929-1940.
- 25) Kunz, I. G., Reed, K. J., Metcalf, J. L., Hassel, D. M., Coleman, R. J., Hess, T. M., Coleman, S. J., 2019. Equine fecal microbiota changes associated with anthelmintic administration. J. Equine Vet. Sci. 77, 98-106.
- 26) Laghi, L., Zhu, C., Campagna, G., Rossi, G., Bazzano, M., Laus, F., 2018. Probiotic supplementation in trained trotter horses: effect on blood clinical pathology data and urine metabolomic assessed in field. J Appl Physiol 125,2, 654-660.
- 27) Li, Y., Liu, C., Liu, Q., Liu, W., 2022. Comparative Genomic Analysis Reveals Intestinal Habitat Adaptation of *Ligilactobacillus equi* Rich in Prophage and Degrading Cellulase. Molecules, 27,6, 1867.
- 28) Mach, N., Ruet, A., Clark, A., Bars-Cortina, D., Ramayo-Caldas, Y., Crisci, E., Lansade, L., 2020. Priming for welfare: gut microbiota is associated with equitation conditions and behavior in horse athletes. Sci. Rep. 10, 1-19.

- 29) Mach, N., Lansade, L., Bars-Cortina, D., Dhorne-Pollet, S., Foury, A., Moisan, M. P., Ruet, A., 2021. Gut microbiota resilience in horse athletes following holidays out to pasture. *Scientific reports*, 11,1, 1-16.
- 30) Marques, G., Pompei, J. y Martini, M., 2017. Manual Veterinario de toma y envío de muestras. Panaftosa, 112.
- 31) Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Quiroz, R., Dantán, E., Aguilar, H., Márquez, C., Toledo, H., 2022a. Concepción integrativa del parasitismo: redefiniendo nuevos conceptos. *Bioagro 2007*, 431X.
- 32) Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Acosta, J., Robertos, N., Reyes, L., y Maldonado, S., 2022b. Manejo Integrado de Parásitos en Pequeños Rumiantes. *Bioagrociencias*, 15,2.
- 33) Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Márquez-Mota, C., Montes-Carreto, L., Quiroz-Catañeda, R., Dantán-González, E., Toledo-Alvarado, H., 2023. Caracterización de la Microbiota Fecal en Caballos con Ciatostominos en México. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 26, XXX.
- 34) Matthews, J. 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *Int. J. Parasitol. Drugs and Drug Resistance*, 4,3, 310-315.
- 35) McDonald, I. R., Kämpfer, P., Topp, E., Warner, K. L., Cox, M. J., Hancock, T. L. C., Oremland, R. S., 2005. *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. *IJSEM* 55,5, 1827-1832.
- 36) Meana, A., Rojo, F. A., 2010. 87 Q&A sobre parasitología equina. Editorial Servet.
- 37) Mehdi J., Justyna Z., Morteza J., 2017. Capítulo 1: The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. Edit. Morteza J.,

Francesca Y.L., Saldanha, Mehdi J., Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press 1-18.

- 38)Midha, A., Schlosser, J.,Hartmann, S., 2017. Reciprocal interactions between nematodes and their microbial environments. *Front. cell. infect.*, 7, 144.
- 39)Milinovich, GJ, Klieve, AV, Pollitt, CC y Trott, DJ., 2010. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis.*Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 26,1, 79-94.
- 40)Mols, K. L., Boe-Hansen, G. B., Mikkelsen, D., Bryden, W. L., Cawdell-Smith, A. J., 2020. Prenatal establishment of the foal gut microbiota: a critique of the in utero colonization hypothesis. *Anim. Prod. Sci.* 60, 18, 2080-2092.
- 41)Natarajan, A., Han, A., Zlitni, S., Brooks, E. F., Vance, S. E., Wolfe, M.,Singh,U.,Jagannathan, P.,Pinsky, B.,Boehm, A.,Bhatt, A. S., 2021. Standardized preservation, extraction and quantification techniques for detection of fecal SARS-CoV-2 RNA. *Nature communications.* 2,1, 1-12.
- 42)Nielsen, M. K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Kaplan, R. M., 2013. AAEP parasite control guidelines. *AAEP*, 24.
- 43)Panek, M., Čipčić Paljetak, H., Barešić, A., Perić, M., Matijašić, M., Lojkić, I., Verbanac, D., 2018. Methodology challenges in studying human gut microbiota—effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Scientific reports*, 8,1, 1-13.

- 44) Parmentier, E., Michel, L., 2013. Boundary lines in symbiosis forms. *Symbiosis*, 60,1, 1-5.
- 45) Peachey, L. E., Molena, R. A., Jenkins, T. P., Di Cesare, A., Traversa, D., Hodgkinson, J. E., Cantacesso, C., 2018. The relationships between faecal egg counts and gut microbial composition in UK Thoroughbreds infected by cyathostomins. *Int. J. Parasitol.* 48,6, 403-412.
- 46) Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., Konstantinidis, K. T., 2014. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PloS one*, 9,4, e93827.
- 47) Premiani, B., Premiani, B., 2010. *El Caballo*. Distal, Buenos Aires. 79-90.
- 48) Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., Perkins, D. L., 2016. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing., *BBRC* 469,4, 967-977.
- 49) Rasillo-de-Alba, A., 2020. *Microbioma equino*. Trabajo Fin de Grado en Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 3-10.
- 50) Reguera, A., 2020. Estudio de mercado. El mercado de la genética de equina en México 2020. *ICEX España Exportación e Inversiones*, 3-4.
- 51) Requena, T., Velasco, M. 2021. The human microbiome in sickness and in health. *Revista Clínica Española*, 2214, 233-240.

- 52) Rowan-Nash, A. D., Korry, B. J., Mylonakis, E., Belenky, P., 2019. Cross-domain and viral interactions in the microbiome. *Microbiol. Mol* 83,1, e00044-18.
- 53) Samuel, B. S., Rowedder, H., Braendle, C., Félix, M.-A., Ruvkun, G., 2016. *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E3941–E3949
- 54) Schoster, A., 2018. Probiotic use in equine gastrointestinal disease. *Vet Clin Equine* 34,1, 13-24.
- 55) Schumacher, J., Taintor, J., 2008. A review of the use of moxidectin in horses. *EVE* , 20,10, 546-551.
- 56) Shepherd, M. L., Swecker Jr, W. S., Ponder, M. A., 2015. Effect of two different commercial DNA extraction kits on the bacterial 16S ribosomal RNA gene denaturing gradient gel electrophoresis profile of Arabian gelding feces. *JEVS*, 35,2, 165-169.
- 57) Sommer, F., Anderson, J., Bharti, R., Raes, J., Rosenstiel, P. 2017. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature*, 1510, 30-638.
- 58) 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.
- 59) Suddin, S., Mocosuli, Y. S., Marcelina, W., Orbanus, N., Ardi, K., 2019. Molecular barcoding based 16S rRNA gene of Thermophilic bacteria from volcanic sites, Linow Lake, Tomohon. In *Materials Science Forum*, 967, 83-92. Trans Tech Publications Ltd.

- 60) Tamay, L., Ibarra, C., Velasquillo, C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2,2, 70-78.
- 61) Tettamanti Boshier, F. A., Srinivasan, S., Lopez, A., Hoffman, N. G., Proll, S., Fredricks, D. N., Schiffer, J. T., 2020. Complementing 16S rRNA gene amplicon sequencing with total bacterial load to infer absolute species concentrations in the vaginal microbiome. *MSystems*, 5,2, e00777-19.
- 62) Walshe, N., Duggan, V., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P., Feehan, O., Mulcahy, G., 2019. Removal of adult cyathostomins alters faecal microbiota and promotes an inflammatory phenotype in horses., *Int. J. Parasitol.* 496, 489-500.
- 63) Xia, L. C., Cram, J. A., Chen, T., Fuhrman, J. A., Sun, F., 2011. Accurate genome relative abundance estimation based on shotgun metagenomic reads. *PloS one*, 6(12), e27992.

ANEXO

Principales helmintos gastrointestinales en equinos y su localización

Especie	Localización
<i>Anoplocephala perfoliata</i>	Intestino delgado/ciego
Ciatostominos	Intestino grueso Larvas fase 3 enquistadas en mucosa
<i>Oxyuris equi</i>	Intestino grueso/recto
<i>Parascaris equorum</i> , <i>P. univalens</i>	Intestino delgado
<i>Strongyloides westeri</i>	Intestino delgado
<i>Trichostrongylus axei</i>	Estómago
<i>Strongylus vulgaris</i> , <i>Strongylus equinus</i> , <i>Strongylus edentatus</i>	Intestino grueso Etapas migratorias: endotelio vascular

(ESCCAP, 2019)

Géneros de ciatostominos y sus características morfométricas

Género	Tamaño (mm)	Características morfométricas
<i>Cylicocylus</i>	10-25	Cápsula bucal corta y de paredes delgadas pero el borde posterior engrosado en forma de anillo. Gotera esofágica dorsal generalmente ausente. Los elementos de la corona interna son pequeños y bacilares.
<i>Poteriostomum</i>	12-18	Cápsula bucal de paredes gruesas sobre todo en la parte posterior. La corona externa está formada por pequeños y numerosos elementos y la interna por elementos de mayor tamaño que nacen de la parte anterior de la cápsula bucal.
<i>Gylocephalus</i>	7-11	Cápsula bucal corta y de gruesas paredes con tres placas quitinosas triangulares y delgadas en su base, delimitando un embudo esofágico muy grande.
<i>Cyathostomum</i>	5-12	Cápsula bucal y de delgadas paredes, gotera esofágica muy corta o ausente. La base de la corona radiada interna es muy posterior al borde anterior de la cápsula bucal.
<i>Cylicodontophorus</i>	7-14	Cápsula bucal corta, de paredes gruesas. Los elementos de la corona interna son tan largos o incluso más que los de la externa, más anchos y menos numerosos.
<i>Cylicostephanus</i>	4-10	Cápsula bucal corta y de paredes uniformemente gruesas por lo general, gotera dorsal usualmente visible y elementos de la corona interna en menor número que los de la externa, pero más largos y anchos.

(Meana A. y Rojo F., 2010)

Reactivos empleados en el protocolo del kit Zymo para extracción de ADN y su función.

Reactivo	Función
<i>Bashing Bead Buffer</i>	Lisis de células bacterianas para la liberación de material genético (ADN)
<i>Buffer Genomic Lysis</i>	Lisis de muestras biológicas (células, sangre, entre otros), degradar el ARN
<i>Pre-Wash Buffer</i>	Eliminación de contaminantes proteicos
<i>g-DNA buffer Wash</i>	Está diseñado para usarse como lavado de columna para eliminar las sales y otros contaminantes antes de la elución del ADN. Esto asegura la recuperación de ADN de alta pureza
<i>DNA Elution</i>	Va a despegar el DNA de la membrana de sílica de la columna permitiendo que atraviese ésta una vez se centrifugue

Reactivos empleados en el protocolo del kit QIAamp® PowerFecal® DNA kit para extracción de ADN y su función

Reactivo	Función
<i>Power Bead Buffer</i>	Ayudará a dispersar las partículas contaminantes en la muestra.
<i>C1</i>	La solución C1 contiene SDS y otros agentes de disrupción necesarios para la lisis celular completa. Además de ayudar a la lisis celular, SDS es un detergente aniónico que descompone los ácidos grasos y los lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos.
<i>C2</i>	Contiene un reactivo que puede precipitar material orgánico e inorgánico que no es ADN, incluidos polisacáridos, restos celulares y proteínas. Es importante eliminar la materia orgánica e inorgánica contaminante que puede reducir la pureza del ADN e inhibir las aplicaciones posteriores del ADN.
<i>C3</i>	Es un segundo reactivo para precipitar material orgánico e inorgánico adicional que no es ADN, incluidos polisacáridos, restos celulares y proteínas.
<i>C4</i>	Es una solución salina de alta concentración. Dado que el ADN se une fuertemente a la sílice a altas concentraciones de sal, esto ajustará las concentraciones de sal de la solución de ADN para permitir la unión del ADN, pero no del material orgánico e inorgánico que no es ADN que aún puede estar presente en niveles bajos, a las columnas de centrifugación MB.
<i>C5</i>	Es una solución de lavado a base de etanol que se utiliza para limpiar aún más el ADN que está unido a la MB Spin Column. Esta solución de lavado elimina la sal residual y otros contaminantes mientras permite que el ADN permanezca unido a la columna de centrifugación MB.
<i>C6</i>	A medida que la solución C6 pasa a través de la membrana de sílice de la columna de centrifugación MB, el ADN que se unió en presencia de un alto contenido de sal es liberado selectivamente por la solución C6 (10 mM Tris), que carece de sal.