



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**EXTRACCIÓN DE ADN FECAL DE EQUINOS INFECTADOS NATURALMENTE CON  
CIATOSTOMINOS SUPLEMENTADOS CON UN PRODUCTO DE SOPORTE DIGESTIVO  
COMERCIAL PARA MEDIR CAMBIOS EN LA ABUNDANCIA DE ALGUNAS ESPECIES DE  
CLOSTRIDIALES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**MARIANA PÉREZ OLVERA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. CINTLI MARTÍNEZ ORTÍZ DE MONTELLANO**

**DRA. CLAUDIA CECILIA MÁRQUEZ MOTA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 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.

## **Dedicatorias**

Para Mercedes Olvera y Martín Pérez, por su esfuerzo constante para brindarme todo lo necesario para poder descubrir y enfrentar el mundo. Este logro es tan suyo como mío.

Para Roberto Pelaéz, que gracias a su amor y apoyo incondicional me ayudó a retomar las riendas de mi vida y mis sueños.

Para Pinky, Valentino, Huesos, Khali, Yatzil y todos los animales que han pasado por mi vida acompañando mi sueño de convertirme en Médico veterinario.

Para las personas que, al igual que yo, se encuentran dentro del espectro autista y durante gran parte de su vida sintieron que no pertenecían a este mundo y crecieron escucharon comentarios negativos sobre su capacidad de lograr algo en la vida. Solo quiero decirles que nuestra capacidad de ver el mundo es diferente y no hay nada malo en nosotros. No estás solo.

*“El mundo necesita todo tipo de mentes.” Temple Grandin*

## **Agradecimientos**

A mis asesoras de tesis; Cintli Martínez Ortiz de Montellano, mi madre en la ciencia, por transmitirme todo su amor y pasión por la parasitología desde el segundo semestre de la carrera y ser mi fuente de inspiración desde ese entonces, por trascender en mí al plantar sus conocimientos, por ayudarme a cultivar y luchar por mis sueños.

Claudia Cecilia Márquez Mota por enseñarme un mundo totalmente nuevo, compartirme sus conocimientos con mucha paciencia, amor y dedicación.

Gracias doctoras, por guiarme cuando el camino se nublabá, por sus palabras de aliento, apoyo y confianza que plantaron en mí.

A Noemí González Serrano, la hermana que la carrera me dejó, no sé a quién debo agradecer por ponerte en mi camino desde el primer semestre de la carrera, gracias por todas las horas de tareas, estudio, cirugías, prácticas, exposiciones, historias y risas que compartimos. Sin duda alguna eres tan parte de este logro como yo, sin ti estoy segura de que no hubiera podido continuar. Sigo sintiendo que este viaje es una broma, pero todo lo llevo grabado en el alma.

A Roberto Pelaéz Hernández, mi mejor amigo, mi compañero de vida, gracias por alumbrarme y guiarme cuando me era imposible seguir adelante. Gracias por hacerme sentir parte de este mundo y darme la fortaleza para continuar.

A Laura González y Mariana Arias por compartir sus conocimientos, consejos, amistad y palabras de aliento.

A Fernanda Calixto por brindarnos su ayuda en este proyecto.

A Sofía Frausto, Kennya Márquez, Luz Gutiérrez, Patricia Miranda, Tatiana Pico, Jesús Deluna, Miguel Martínez, Fernanda Ramírez, Norma Itzel Flores, María José Corlay, Miroslava Cantera, Ramsés Parra y mis demás colegas por compartir y aligerar este gran viaje.

## **Contenido**

Resumen.....	1
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Marco teórico .....</b>	<b>4</b>
2.1 El caballo ( <i>Equus Caballus</i> )	4
2.2 Macrobiota del holobionte equino	4
2.3 Microbiota equina	6
2.4 Probióticos	10
2.5 Antihelmínticos (Lactonas macrocíclicas)	10
2.6 <i>Clostridium</i> spp	11
2.6.1 <i>Clostridium perfringens</i>	12
2.6.2 <i>Clostridium difficile</i>	12
2.6.3 <i>Clostridium</i> cluster XIVa (Lachnospiraceae) <i>Clostridium</i> cluster IV(Ruminococcaceae)	13
2.6.4. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	13
2.7 Técnicas de Biología molecular	14
<b>3. Justificación .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Objetivo general .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>16</b>
<b>6. Materiales y métodos .....</b>	<b>16</b>
6.1 Lineamientos de ética	16
6.2 Obtención de la muestra	17
6.2 Extracción de ADN	18
6.3 PCR tiempo real (qPCR)	22
6.4 Análisis estadístico	24
<b>7. Resultados.....</b>	<b>25</b>
7.1 Cuantificación de ADN	25
7.2 Comprobación de integridad	26
7.3 Análisis de abundancia relativa	28
<b>8. Discusión .....</b>	<b>31</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>35</b>
<b>10. Perspectivas .....</b>	<b>35</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>37</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>45</b>

**6. Recomendaciones para realizar PCR .....48**

**Índice de Tablas**

**Tabla 1.** Reactivos utilizados en la reacción de qPCR.....23  
**Tabla 2.** Secuencias de nucleótidos para qPCR del gen 16S y su porcentaje de parentesco según el NCBI.....24  
**Tabla 3.** Resultados de la cuantificación de DNA de todas las muestras en los días 0, 15 y 30. ....25

**Índice de Figuras**

**Figura 1.** Ciclo biológico de Ciatostominos;1) El caballo consume pasto con larvas tres (L3), 2) Deglute el pasto, 3) llega al estómago donde los jugos gástricos desenvainaran las larvas tres (L3), 4) Pasan por el intestino delgado, 5) Colonizan la mucosa del colon .....5  
**Figura 2.** Establecimiento de la microbiota del potro (Adaptado de Mols et al., 2020, Ilustración creada con BioRender.com por Mariana Pérez Olvera). .....9  
**Figura 3.** Protocolo de extracción de ADN ( Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial/ Miniprep, Ilustración creada con BioRender.com por Mariana Pérez Olvera). ..... 19  
**Figura 4.** Protocolo de extracción de ADN (kit QIAamp® PowerFecal® DNA, Ilustración creada con BioRender.com por Mariana Pérez Olvera). .....20  
**Figura 5.** Abundancia relativa de C.cluster XIVA.....28  
**Figura 6.** Abundancia relativa de Clostridium cluster IV (Ruminococcaceae) .....29  
**Figura 7.** Abundancia relativa de Faecalibacterium prausnitzii .....30  
**Figura 8.** Abundancia relativa de Clostridium perfringens .....;Error! Marcador no definido.

**Índice de Imágenes**

**Imagen 1.** Extracción de ADN fecal equina, realizada en las instalaciones del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la FMVZ UNAM .....21  
**Imagen 2.** Cuantificación y comprobación de pureza del material genético extraído con con un espectrofotómetro NanoDrop.....21  
**Imagen 3.** Llenado de tubos Eppendorf en campana de extracción para la realización de las qPCR.....23  
**Imagen 4.** Comprobación de integridad de muestras en el día 0. ....26  
**Imagen 5.** Comprobación de integridad de muestras en el día 15 .....27  
**Imagen 6.** Comprobación de integridad de muestras en el día 30. ....27

## Resumen

PÉREZ OLVERA MARIANA.

Extracción de ADN fecal de equinos infectados naturalmente con *Ciatostominos* suplementados con un producto de soporte digestivo comercial para medir cambios en la abundancia relativa de algunas especies de clostridiales.

PhD Cintli Martínez Ortiz de Montellano, PhD Claudia Cecilia Márquez Mota

Los caballos están expuestos a parásitos gastrointestinales naturalmente. El control de nematodos consiste en la administración de antihelmínticos (AH) indiscriminadamente afectando de manera negativa la composición de la microbiota, alterando funciones esenciales para mantener la salud gastrointestinal de los individuos. El objetivo general de esta investigación es identificar el cambio en la población de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV* y *Faecalibacterium prausnitzii* en caballos parasitados con *Ciatostominos* al suplementar con un producto de soporte digestivo comercial con el fin de comprobar su utilidad, mediante extracción de ADN fecal y qPCR. Este estudio involucra 18 equinos cuarto de milla de 16 a 19 meses de edad parasitados por *Ciatostominos*, distribuidos aleatoriamente en 3 grupos de tratamiento experimentales; tratamiento 1: ivermectina (IVM) al 1.87%, tratamiento 2: ivermectina al 1.87% + producto de soporte digestivo comercial, tratamiento: 3 únicamente producto de soporte digestivo comercial . Se tomaron muestras de heces en los días 0,15 y 30 para posteriormente extraer ADN bacteriano y realizar pruebas de qPCR, con los resultados obtenidos, se determinó la abundancia relativa de nuestras bacterias de interés.

Se comprobó que el uso de ivermectina tiene un impacto directo en los Ciatostominos (macrobiota) y como consecuencia en la microbiota del caballo, en relación con esto podemos suponer sobre el impacto que tuvo el producto de soporte digestivo comercial al evitar una disminución marcada de microorganismos de interés. Se logró identificar limitantes en el estudio de microbiota fecal equina. Se debe cuestionar el criterio actual para la administración de antihelmínticos, así como, continuar investigando para lograr establecer un protocolo de uso de probióticos en el mantenimiento de la homeostasis intestinal equina.



## 1. Introducción

Tradicionalmente en el mundo ecuestre en México se realizan procedimientos preventivos con uso de antihelmínticos (AH) y antibióticos para lograr controlar la presencia de parásitos o bacterias, el principal inconveniente con estos procedimientos es que la mayoría de las veces son innecesarios y contraproducentes, se ha visto que la poca especificidad de los fármacos afecta de manera negativa a las bacterias que habitan en los animales, además el realizar estos procedimientos de manera continua ha dado como resultado poblaciones de nematodos y bacterias resistentes (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2022). Se sabe que los helmintos están presentes de manera ubicua en todos los equinos que pastorean (Bellaw *et al.*, 2017; Clark *et al.*, 2018; Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2022; Sauermann *et al.*, 2019). Esto quiere decir que el parasitismo ocurre en todo momento. Sin embargo, debemos recordar que el caballo es un animal que ha sobrevivido sin ayuda del ser humano por más de 6.000 mil años gracias a mecanismos propios generados con la necesidad de sobrellevar enfermedades (resiliencia). En la actualidad se están intentando entender qué mecanismos tiene el individuo para poder resistir una enfermedad, en este sentido se ha tenido en la mira la relación de las poblaciones de microorganismos (microbiota) establecidos dentro del huésped (holobionte) y organismos como los parásitos (macrobiota). El desarrollo de tecnologías de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN), ha proporcionado información valiosa sobre la microbiota intestinal equina. Sin embargo, debemos tener en cuenta que existe una gran variabilidad en la composición de la microbiota intestinal entre razas, edad, compartimentos intestinales, así como la variación individual. Los distintos protocolos de conservación de muestras y extracción de ADN dificultan poder generalizar y comparar resultados (Garber *et al.*, 2020; Kauter *et al.*, 2019). El valor que tiene el entendimiento de la intervención de la microbiota frente a distintas afectaciones, nos abrirá la puerta a la modernización de la prevención y tratamiento de distintos padecimientos comunes en el mundo ecuestre.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 El caballo (*Equus Caballus*)**

Cada organismo vivo está conformado por material genético único, estos genes cambian entre cada ente, gracias a diversos factores como recombinación genética, clima, nutrición, una gran diversidad de microorganismos y macroorganismos presentes (Aguilar-Díaz *et al.*, 2021). Por lo tanto, todos los organismos tienen una conexión mutualista con la gran variedad de microorganismos existentes, un holobionte es una asociación entre distintas especies que conforman una comunidad, por consiguiente podemos utilizar el término holobionte para referirnos a un hospedero, en este caso al caballo (Aguilar-Díaz *et al.*, 2021; Rosenberg y Zilber-Rosenberg.,2018).

A lo largo de los años, en el mundo de la medicina veterinaria, se han establecido prácticas de desparasitación continua con el objetivo de controlar parásitos, ya que han sido sentenciados de manera errónea a ser sinónimo de enfermedad y muerte en los ejemplares. El uso descontrolado de los AH ha traído consigo muchas repercusiones, la más estudiada hasta ahora es la presencia de poblaciones de parásitos resistentes (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*,2022).

### **2.2 Macrobiota del holobionte equino**

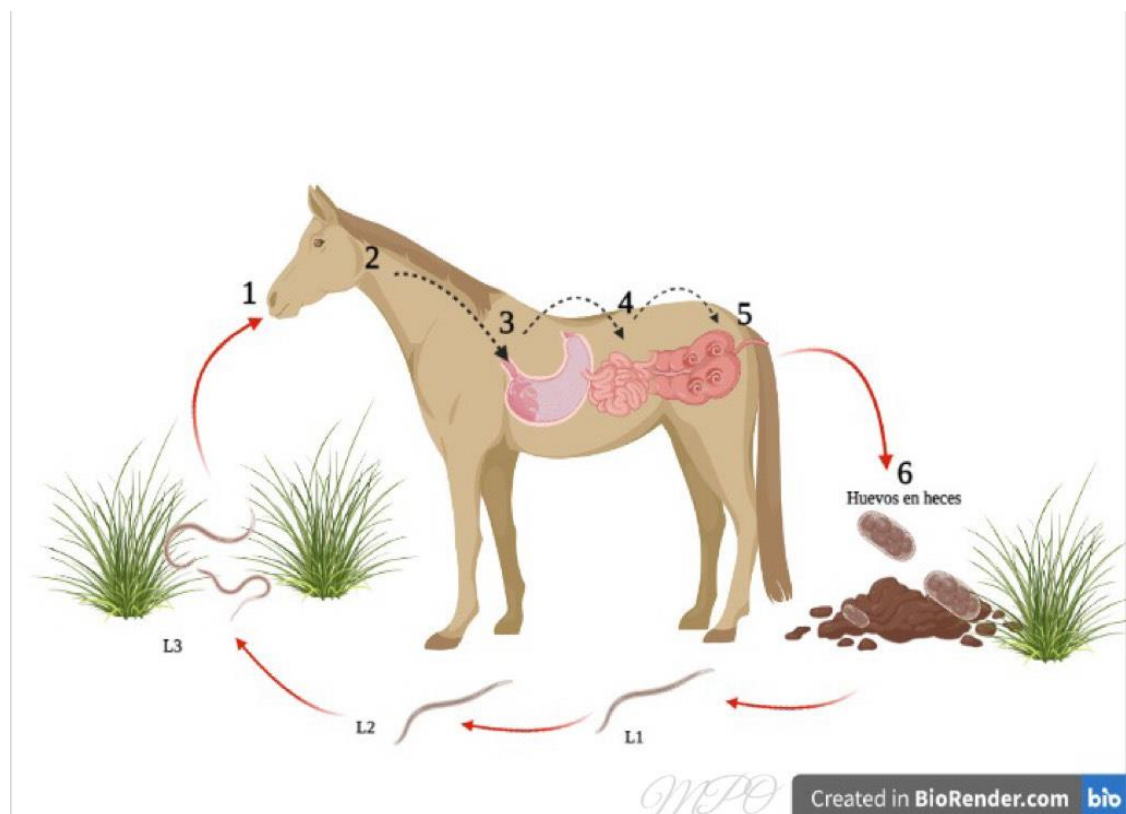
Los parásitos gastrointestinales (macrobiota) están presentes de manera normal en todos los caballos con acceso a pasturas (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*,2022; Sauermann *et al.*, 2019). Se sabe que el 95% de los nematodos se encuentran en el ambiente y el porcentaje restante dentro de los animales, a esto se le conoce como refugio parasitario (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*,2022).

Existe una gran cantidad de helmintos que pueden encontrarse en el organismo del equino, para fines de esta investigación únicamente se hablará de los estróngilos no migratorios.

En este grupo se encuentran los Ciatostominos, los cuales son nematodos de color rojo, con cápsula bucal corta, cilíndrica, carecen de dientes, poseen coronas radiadas externas e internas, se albergan en el colon y ciego, están conformados por más de 50 especies (Meana y Rojo, 2010). Las infecciones por Ciatostominos llegan alcanzar una tasa de prevalencia del 100%, la mayoría de los animales son asintomáticos o presentan signos

como pérdida de peso, pero pueden llegar a causar consecuencias muy graves (Clark *et al.*,2018).

El ciclo de vida de los Ciatostominos es directo (fig. 1), la fase infectante son las larvas 3(L3), las cuales serán ingeridas y migran al intestino delgado o grueso, mudan dos veces antes de ser sexualmente maduras, posteriormente pondrán huevos, los cuales llegarán a las pasturas a través de las heces (Clark *et al.*,2018). Se sabe que las L3 se enquistan por un largo tiempo, cuando las larvas enquistadas emergen de manera simultánea causa el síndrome de ciatostomosis larvaria, el cual tiene como consecuencia diarrea hemorrágica, tiflocolitis generalizada perdedora de proteínas, la cual tiene una mortalidad del 50% (Bellaw *et al.*,2017; Sauermann *et al.*, 2019).



**Figura 1.**Ciclo biológico de Ciatostominos;1) El caballo consume pasto con larvas tres (L3), 2) Deglute el pasto, 3) llega al estómago donde los jugos gástricos desenvainan las larvas tres (L3), 4) Pasan por el intestino delgado, 5) Colonizan la mucosa del colon

Dentro del holobionte, podemos encontrar millares de especies microscópicas compartiendo espacio, se cree que pueden interactuar entre sí, los mecanismos y el

resultado de la interacción aún se mantiene desconocido. Investigaciones recientes afirman que la presencia de algunos helmintos altera las funciones y constitución de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal (TGI) al producir y liberar compuestos antimicrobianos (Midha *et al.*, 2017; Peachey *et al.*, 2017). Conocer más al respecto podría darnos una explicación sobre la susceptibilidad de algunos individuos de presentar parasitosis (Clark *et al.*, 2018; Leung *et al.*, 2018).

Paralelamente, existen estudios en medicina humana donde se logra vislumbrar cualidades benéficas de los parásitos, dejando a un lado su título de dañino y abriendo un panorama sobre el mutualismo que llegan a tener con su huésped (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2022).

### **2.3 Microbiota equina**

En el año 2001 Joshua Lederberg afirmó que existen microorganismos simbióticos que colonizan al holobionte. A partir de ese momento, las investigaciones al respecto en medicina humana han avanzado a tal grado de poder definir a la microbiota como la comunidad de microorganismos vivos, que habitan en un ser (Rasillo de alba, 2020).

La microbiota intestinal humana está conformada principalmente por dos filotipos de bacterias: Firmicutes y Bacteroidetes (estos últimos corresponden el 90% de la microbiota intestinal). El filo Firmicutes incluye dos familias muy importantes: Lactobacillaceae y Clostridiaceae mientras que en el de los Bacteroidetes incluyen las bacterias pertenecientes al género Bacteroides y al Prevotella (Rasillo de alba, 2020). El desequilibrio de la microbiota es llamado disbiosis, y puede ser causado por cambios en la dieta, uso de antibióticos, edad o enfermedades (Gilroy *et al.*, 2022; Kauter *et al.*, 2019; Rasillo de alba, 2020; Swanson *et al.*, 2020).

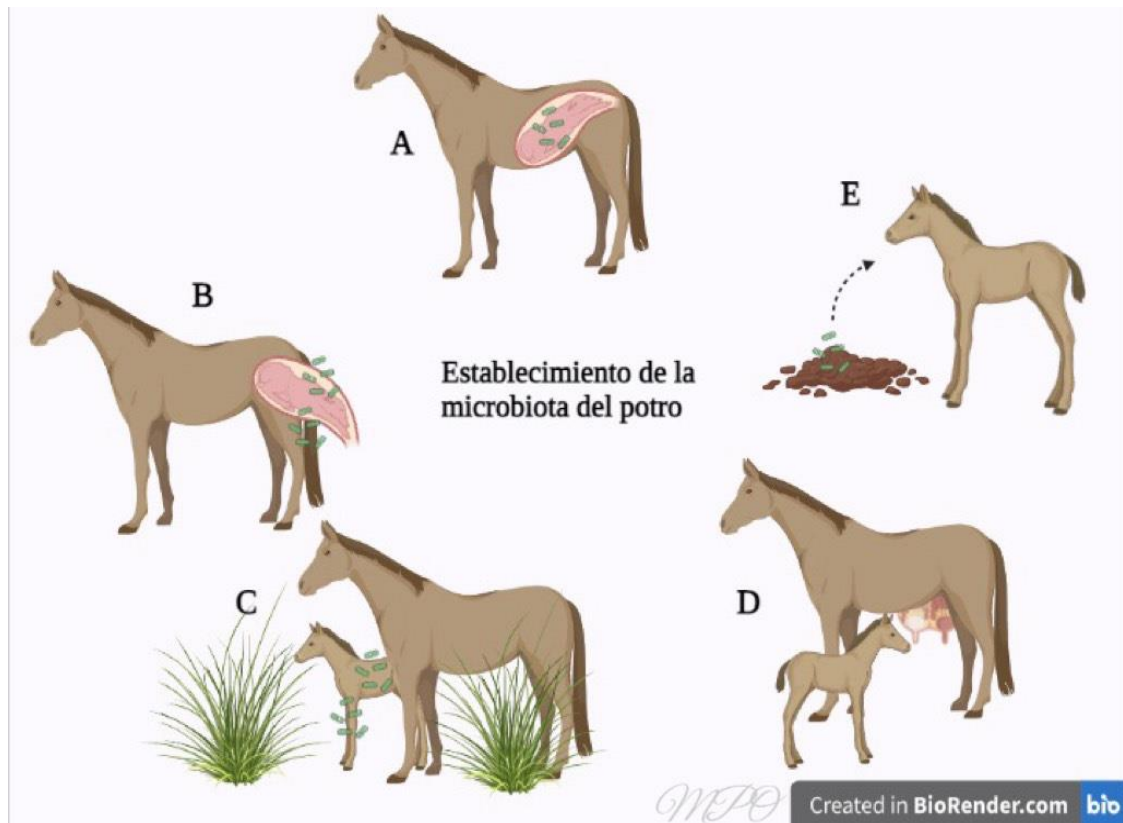
En el sector ganadero, se ha demostrado que la microbiota intestinal representa una pieza clave, ejerciendo un rol esencial en la recolección, almacenamiento de energía obtenida de la dieta, lo que señala una relación directa entre la salud y el peso del animal (Zommiti *et al.*, 2020).

Lo que se conoce actualmente del microbiota intestinal equina es que está conformada por un número menor de especies, donde la mayor diversidad se encuentra en el colon dorsal derecho (Kauter *et al.*, 2019). Firmicutes representan el filo más grande de la comunidad bacteriana intestinal equina que va desde el 40% hasta el 90% (Costa *et al.*, 2015; Dougal *et al.*, 2014).

Si bien es cierto que la microbiota es única para cada individuo, se busca encontrar una propuesta central para establecer qué microorganismos habitan en el TGI equino y poder definir los componentes de una microbiota "saludable" (Kauter *et al.*, 2019).

Los equinos, son una especie que sufre constantemente de enfermedades gastrointestinales que muchas veces pueden tener un desenlace letal. A raíz del descubrimiento de la importancia del microbiota en la homeostasis intestinal, se plantea la hipótesis de que la baja diversidad bacteriana en los equinos domésticos es la posible razón de la sensibilidad a las enfermedades gastrointestinales (Kauter *et al.*, 2019). En esta perspectiva la microbiota cumple con diferentes funciones la resistencia a la colonización de los patógenos intestinales mediante el cubrimiento de sitios que los patógenos suelen utilizar para establecerse, de esta forma se evita que los patógenos colonicen, competencia de nutrientes, incrementar la producción de mucina 2, gracias a la producción de butirato por parte de las bacterias como *C. cluster XIVa* y *C. cluster IV* (Sakaguchi *et al.*, 2010; Willemsen *et al.*, 2003; Wing *et al.*, 2010). Analizando la importancia de la microbiota, podemos comprender su valor en los animales jóvenes, a continuación se resume el establecimiento de la microbiota en potros (fig. 2). En los mamíferos, el intestino es colonizado por microorganismos después del nacimiento (Husso, 2020) sin embargo, existen autores que mencionan que dicha colonización comienza desde la vida uterina (Andrade *et al.*, 2021; Quercia *et al.*, 2018; Mols *et al.*, 2020). De este modo se han planteado 3 hipótesis aceptadas sobre la colonización intrauterina del potro, las cuales han surgido tras investigaciones en humanos y roedores, las cuales son: El ingreso de microorganismos a través de la vagina y el cuello uterino hasta el útero; migración por vía hematogena desde la cavidad oral o desde el tracto gastrointestinal a la placenta, por último, la translocación bacteriana por migración de células dendríticas desde la luz intestinal a la placenta (Mols *et al.*, 2020). El potro cuenta con una microbiota provisional, la cual estará sujeta a alteraciones, debido al cambio de alimentación y factores medioambientales (Lindenberg *et al.*, 2019). Una parte de esta microbiota la adquiere del meconio, el cual se compone de bacterias presentes en las heces y vagina de la madre, principalmente de los filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes (Quercia *et al.*, 2019; Husso *et al.*, 2020), estos filos están estrechamente relacionados con la digestión y fermentación de proteínas, azúcares y fibras. Durante los primeros tres días de vida del potro, perderá la microbiota meconial y obtendrá microorganismos fermentadores de fibra por el consumo de leche y calostro,

por lo tanto, son consideradas fuentes importantes para la microbiota del potro (Lindenberg *et al.*, 2019; Quercia *et al.*, 2019). En las primeras semanas de vida los potros comienzan a tener comportamientos como coprofagia donde adquirirán microorganismos como *Prevotella*, *Blautia*, *Ruminococcus* los cuales son degradadores de fibra, también existirá un cambio de alimentación, dejarán de consumir paulatinamente leche para alimentarse de forraje y concentrados lo cual se verá reflejado en la microbiota (Quercia *et al.*, 2019). A partir del día 7 hay un aumento de bacterias fermentadoras de fibra, el filo más abundante es Firmicutes (Husso,2020).El establecimiento de la microbiota del potro es un proceso paulatino y crucial en el animal, todas las etapas del establecimiento de la microbiota dependen de acciones del ser humano a cargo del animal, el cual a su vez va a depender de factores como suelo, época del año, temperatura, humedad, uso de fármacos, etcétera.(Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*,2022), pero se convierte en estable y lo más parecido a la de un equino adulto entre los seis y siete meses de vida (Lindenberg *et al.*, 2019; Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*,2022).



**Figura 2.** Establecimiento de la microbiota del potro (Adaptado de Mols et al., 2020, Ilustración creada con BioRender.com por Mariana Pérez Olvera).

Analizando todo lo anterior podemos decir que el parasitismo ocurre invariablemente en la vida de los animales y todo esto sucede en el mismo sitio donde encontramos una gran variedad de microorganismos, esto ha despertado dudas en el mundo científico: Si el parasitismo es algo que ocurre permanentemente, ¿Que interacciones deben ocurrir dentro del huésped para que no presente signos clínicos y pueda establecer una convivencia “sana” con los parásitos? A medida que surgen las dudas, se han comenzado a manejar términos con los cuales se intenta explicar las interacciones entre el holobionte-macrobiota-microbiota (Anexo 1.).

Retomando la pregunta planteada, pocos han sido los valientes que se atreven a estudiar la macrobiota para poder posicionarla como una pieza con funciones benéficas, dejando a un lado todas sus acciones patógenas y de esta forma descubrir su relación con la microbiota del huésped.

A continuación, se profundizará de manera concisa algunos elementos claves para el entendimiento de su consideración en esta tesis.

## 2.4 Probióticos

Los probióticos según la FAO (de sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization) son microorganismos vivos que, ingeridos en una cantidad adecuada, ofrecen un beneficio para la salud. Para ser considerado un probiótico, los microorganismos del suplemento deben estar vivos al momento de administrarse, contener microorganismos definidos taxonómicamente y ser seguros para su uso (Watson,2019).

Podemos agradecerle a la zootecnia y la gran necesidad de los humanos en el consumo de productos de origen animal, que las investigaciones del uso de probióticos llegaron a la medicina veterinaria, buscando contrarrestar la problemática de las poblaciones resistentes a los distintos fármacos (Zommiti *et al.*, 2020). Actualmente, los probióticos que más se utilizan en caballos son: *Saccharomyces* (levadura), *Lactobacillus* spp, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Bifidobacterium* (Schoster,2018). La levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* y *S. boulardii* se han utilizado para complementar la alimentación de los caballos con buenos resultados, como una mejor digestibilidad de la fibra y una reducción de la duración de hospitalización para caballos con enterocolitis aguda (Cook *et al.*, 2021). La escasa información del uso de probióticos en equinos está relacionada con las pocas investigaciones que existen sobre la microbiota en esta especie. Actualmente, en México no existen investigaciones relacionadas con la composición de la microbiota equina, por lo tanto, se desconoce cómo afectan las prácticas rutinarias de administración de AH en esta especie, por ahora, podemos estipular que la administración de AH puede ser un factor crucial en la homeostasis del TGI equino.

## 2.5 Antihelmínticos (Lactonas macrocíclicas)

Las lactonas macrocíclicas son uno de los grupos de AH más populares dentro de la medicina veterinaria. En 1981 se emplearon por primera vez en caballos, gracias a su amplio espectro contra nemátodos gastrointestinales de importancia y artrópodos se posicionaron como el AH de elección en esta especie. Una característica de esta familia es que son altamente lipofílicas, esto significa que formará un reservorio en el tejido graso que le ayudará a tener una eficacia prolongada (González *et al.*, 2007).

Su mecanismo de acción aún no se comprende del todo, pero se tienen dos teorías: la primera es liberación del ácido gamma aminobutírico (GABA) que inhibe los estímulos



nerviosos en la placa neuromuscular. La segunda es que presentan afinidad por los canales iónicos de cloro de las células nerviosas y musculares, esto ocasiona problemas nerviosos en el parásito (Tunay, 2018).

El control de los Ciatostominos se realiza con la administración de AH como bencimidazoles y lactonas macrocíclicas. Se ha reconocido que los bencimidazoles presentan mayor resistencia frente a los Ciatostominos, hasta el momento las lactonas macrocíclicas, como la ivermectina (IVM) y moxidectina conservan una buena eficacia (Caffe *et al.*, 2018). Se sabe que el tiempo de eficacia si ha disminuido, cuando comenzó a emplearse era de 8 semanas, pero actualmente ha disminuido a 5 - 6 semanas (Nielsen y Reinemeyer, 2018). La toxicidad de la ivermectina es rara, pero cuando se llega a presentar podemos observar midriasis, dermatitis, depresión, ataxia, decúbito y en casos muy severos, muerte (González *et al.*, 2007). Investigaciones recientes han demostrado que la administración de antihelmínticos como febendazol y moxidectina (lactona macrocíclica) influyen de manera negativa en la microbiota intestinal, a pesar de estas declaraciones, aún no se logra esclarecer el mecanismo en el que estos AH afectan la microbiota (Garber *et al.*, 2020).

Con todo lo anterior, es fundamental retomar la idea inicial: la microbiota y la macrobiota conviven en tiempo y espacio. Conocer la composición de la microbiota equina es indispensable para vislumbrar los cambios en ciertos grupos microbianos al momento de administrar AH. Este conocimiento nos llevará a entender cómo puede perjudicar al animal y podría ser la respuesta a su alta susceptibilidad a enfermedades del TGI. En los siguientes párrafos se presentará información sobre un género bacteriano que se ha seleccionado, el cual se asocia con alteraciones en la homeostasis del TGI equino.

## **2.6 *Clostridium* spp**

*Clostridium* spp es un género de bacteria anaerobia formadora de esporas, gram positiva, perteneciente al filo firmicutes, es un gran grupo conformado por aproximadamente 200 miembros, la mayoría son saprofitos e inclusive benéficos; sin embargo, principalmente son reconocidos por los miembros patógenos de este género, ya que son causantes de enfermedades bastante populares en la comunidad médica tanto humana como veterinaria: tétanos, botulismo, gangrena, colitis pseudomembranosa (Pahalagedara *et al.*, 2020). Los *Clostridium* son un género bastante complicado, porque gracias a la realización

de análisis filogenéticos se han podido identificar 19 clusters o también llamados grupos (Grenda *et al.*, 2022).

### **2.6.1 *Clostridium perfringens***

Es un bacilo anaerobio gram positivo formador de esporas que se asocia con infecciones gastrointestinales agudas que varían en gravedad desde diarrea hasta enterocolitis necrosante, existen 5 tipos: A, B, C, D, E (Shaw y Stämpfli,2018). Esta bacteria es considerada ubicua en el entorno, ya que se encuentra en el suelo y en la materia orgánica en descomposición (Farag *et al.*,2019; Mehdizadeh et al, 2020).

El más común en caballos adultos sanos y con diarrea es *C. perfringens* tipo A, en potros de *C. perfringens* tipo A y C (Shaw y Stämpfli,2018).

La toxina b2, que es producida por un subtipo de *C. perfringens* tipo A, se asocia con colitis, ulceración de la mucosa y diarrea hemorrágica. La enterotoxina, producida por las cepas tipo A y tipo C, crea poros y altera la permeabilidad de la membrana, lo que lleva a la necrosis celular. La toxina formadora de poros NetF también se ha identificado recientemente como un importante determinante de virulencia y se ha asociado con enteritis necrosante en potros (Mehdizadeh *et al.*, 2020; Shaw y Stämpfli,2018).

### **2.6.2 *Clostridium difficile***

Es un bacilo anaerobio gram positivo formador de esporas. Se asocia con enterocolitis, duodenitis/ yeyunitis proximal en caballos y potros. *C. difficile* se ha aislado de heces de caballos sanos, las tasas de prevalencia oscilan entre 0 % y 33%, por esta razón se ha considerado que los equinos son portadores (Mehdizadeh *et al.*, 2021; Shaw y Stämpfli,2018; Schoster *et al.*, 2019).

Una de las características más notables de esta enfermedad es que, en casi todos los casos, ocurre después de la terapia con antibióticos, principalmente b-lactámicos, gentamicina, trimetoprima, sulfonamidas, clindamicina, eritromicina y rifampicina (Farag *et al.*,2019; Shaw y Stämpfli,2018).

Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son dos toxinas principales, la toxina A enterotoxina (TcdA) y la toxina B citotoxina (TcdB) (Farag *et al.*,2019; Shaw y Stämpfli,2018).

Existe evidencia de que *Saccharomyces boulardii*, una levadura no patógena, puede destruir TcdA lo cual puede ser útil para limitar los efectos de estas toxinas (Shaw y Stämpfli, 2018).

### **2.6.3 *Clostridium* cluster XIVa y *Clostridium* cluster IV**

La infección natural por estróngilos y Ciatostominos en ponis coincidió con una disminución de las bacterias productoras de butirato *C. cluster XIVa* Y *C. cluster IV*. Las especies de *C. cluster XIVa* y *IV*, son de las bacterias predominantes en el intestino, representan del 10 al 40% del total de bacterias, sus componentes celulares y metabolitos, como el butirato, desempeñan un papel probiótico principalmente al energizar las células epiteliales intestinales, fortalecer la barrera intestinal e interactuar con el sistema inmunitario (Ayoub *et al.*, 2022; Clark *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020; Livanos *et al.*, 2018). La presencia de estas bacterias es normal en microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales, sin embargo, se sabe que una disbiosis puede ocasionar que las bacterias patógenas se establezcan (Lacey *et al.*, 2018; Schoster, *et al* 2019).

Se necesitan estudios más amplios para explorar más a fondo la microbiota con relación a la eliminación de clostridios (Schoster *et al.*, 2019).

### **2.6.4. *Faecalibacterium prausnitzii***

*Faecalibacterium prausnitzii* es una de las especies de bacterias con mayor abundancia en el colon de seres vivos sanos. Es reportada como una bacteria ubicua en el tracto gastrointestinal de animales. En medicina humana ha sido considerado un biosensor, ya que se han reportado disminuciones drásticas en presencia de enfermedades principalmente metabólicas (Leylabadlo *et al.*, 2020). Una de sus principales funciones es la producción de energía para los colonocitos y la síntesis de metabolitos antiinflamatorios, es una bacteria productora de butirato (Leylabadlo *et al.*, 2020). La reducción *F. prausnitzii* aumenta la probabilidad de colonización de patógenos oportunistas, aerotolerantes o anaerobios facultativos como los miembros proteo bacterianos Gram-negativos (Dam *et al.*, 2019).

Englobando la información anterior, estas son solo algunas especies que se asocian con alteraciones benéficas o perjudiciales en el holobionte, investigar más al respecto hará que la medicina veterinaria de un paso gigantesco al modernizar ciertos conceptos y protocolos de tratamientos y medicina preventiva para esta especie. Para que esto sea

posible es indispensable apoyarnos de tecnología de punta, como lo son las técnicas de biología molecular.

## 2.7 Técnicas de Biología molecular

El ADN es una molécula en la cual se encuentra toda la información genética para el funcionamiento de cualquier organismo y entre sus funciones más importantes está guardar la información genética. Su estructura fue estudiada y propuesta en 1953 por Rosalind Franklin, J. D. Watson y F. H. C. Crick (Acevedo *et al.*, 2016; Kopchak *et al.*, 2021). A partir de ese momento, la ciencia avanzó rápidamente y comenzaron a desarrollar tecnologías de secuenciación del ADN, las cuales han proporcionado información valiosa sobre la microbiota intestinal (Garber *et al.*, 2020; Kauter *et al.*, 2019). Sin embargo, la variabilidad individual y las diferencias metodológicas durante la extracción de ADN, dificulta generalizar y comparar resultados (Garber *et al.*, 2020). Para poder lograr secuenciar el ADN se debe considerar que en primer lugar debes tener una muestra de calidad, utilizar algún método de extracción de ADN, realizar métodos de análisis de calidad de esa extracción para su posterior almacenamiento y poder utilizarla para alguna técnica como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en este caso se utilizará la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). El fundamento de la qPCR está basado en la del PCR convencional. De manera general, lo único que cambia es que se emplea un fluoróforo y se usa un termociclador que tenga un sistema óptico, el cual pueda captar la señal de los fluoróforos que detectan el ADN sintetizado en tiempo real, la fluorescencia aumenta conforme el ADN se sintetiza, por lo tanto, con la qPCR se logra amplificar y detectar el ADN en una sola etapa. El fundamento está justificado en la replicación celular, en la cual actúan proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN, partiendo de una que es el molde (Cornejo *et al.*, 2014; Mas *et al.*, 2001), todo esto se realiza por ciclos. Un ciclo de PCR está conformado por 3 etapas importantes: 1) Desnaturalización: La doble hélice de ADN se separa en dos hebras. 2) Hibridación: se alinean los iniciadores a las zonas 3' complementarias del fragmento que queremos amplificar. 3) Extensión o elongación: Se logra la síntesis de una nueva cadena dirección 5' 3', mediante la enzima ADN polimerasa (Cornejo *et al.*, 2014; Mas *et al.*, 2001).

### 3. Justificación

La microbiota gastrointestinal cumple funciones específicas en el organismo tanto inmunológicas como metabólicas. Su estudio ha sido de gran interés en los últimos años, principalmente en la medicina humana. Cada vez existe más evidencia de la relación entre la disbiosis y un mayor riesgo de enfermedades inflamatorias, metabólicas, alérgicas o autoinmunes en animales, posicionándose como un pilar importante para mantener la homeostasis. Ranchos dedicados a la cría ecuestre de todo el mundo, buscan alternativas para los problemas gastrointestinales equinos. Tanto en potros como en equinos adultos existe predisposición a disbiosis por estrés durante transporte, competencias, administración de antibióticos, antihelmínticos, cambios de dieta. El 80% de los potros llegan a presentar problemas gastrointestinales en alguna etapa de su desarrollo.

La presencia de clostridios es normal en la microbiota del tracto gastrointestinal de los animales, sin embargo, se sabe que una disbiosis puede ocasionar que las bacterias patógenas se establezcan. *C. perfringens* y *C. difficile* son bacilos anaerobios asociados a infecciones gastrointestinales en caballos, mientras que *C. cluster XIVa* y *C. cluster IV* junto con *F. prausnitzii* son microorganismos altamente reconocidos en investigaciones de medicina humana y veterinaria por su acción probiótica. La macrobiota habita en el mismo ambiente que la microbiota del equino, se puede suponer que interactúan entre sí, investigaciones recientes afirman que la presencia de parásitos altera las funciones y constitución de la microbiota.

Actualmente, no existen estudios en México sobre la microbiota equina, explicando una posible simbiosis, tolerancia o competitividad con su macrobiota, tampoco sobre suplementación con probióticos comerciales y su efecto en la abundancia relativa de la microbiota en caballos parasitados.

Motivar la investigación en esta área de la medicina también le compete al médico veterinario, es inminente la actualización de tratamientos y procedimientos de medicina preventiva en esta especie (y todas las demás).

### 4. Objetivo general

Identificar el cambio en la población de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV* y *Faecalibacterium prausnitzii* en caballos parasitados con

Ciatostominos al suplementar con un producto de soporte digestivo comercial con el fin de comprobar su utilidad, mediante extracción de ADN fecal y qPCR.

### **Objetivos específicos**

- Extraer ADN fecal equino de distintos grupos de tratamiento con el fin de obtener material genético de calidad para identificar la variación en la población de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV* y *Faecalibacterium prausnitzii* a través de la técnica qPCR.
- Interpretar la variación en la población de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV* y *Faecalibacterium prausnitzii* en los diferentes grupos de tratamientos para evaluar la eficacia del suplemento mediante ANOVA de una vía *post hoc Tukey*

## **5. Hipótesis**

Se espera la disminución en la población de *Clostridium difficile*, *C. perfringens* y el aumento de *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV* y *Faecalibacterium prausnitzii* al suplementar con producto comercial a los caballos infectados naturalmente por Ciatostominos.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Lineamientos de ética**

El protocolo de investigación 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. El presente trabajo forma parte de un proyecto más extenso, sin embargo, nuestra aportación comienza a partir de los grupos seleccionados.

## 6.2 Obtención de la muestra

La toma de muestras de heces de equinos fue realizada en el Rancho Hacienda Santiago, ubicado en Sierra de Lobos, León, Guanajuato. El clima en esta zona ecológica es templado y subhúmedo.

El Rancho Hacienda Santiago cuenta con caballos raza cuarto de milla. Los criterios de inclusión en este estudio fueron: potros y potrancas de 16 a 19 meses con un peso promedio de 360 kg y que se encuentren naturalmente infectados por Ciatostominos, diagnosticados por medio de la técnica de McMaster para estimar la cantidad de huevos de tipo estróngilido que se encuentran en 2 gramos de heces de estos caballos, fueron seleccionados aquellos que presentaban cargas a partir de 200 huevos por gramo de heces (HPG), de los cuales se realizaron cultivos larvarios por método tradicional y con la técnica de Corticelli lai para posteriormente poder ejecutar la técnica de migración larvaria con el dispositivo baermann. Para poder realizar la identificación de las larvas y determinar que los potros y potrancas estaban infectados por Ciatostominos(Calixto-Tlacomulco,2022).

Con esta información fueron seleccionados los animales, se formaron tres grupos de manera aleatoria conformados por seis caballos, cada grupo representa un tratamiento diferente:

- **Tratamiento 1** : IVM al 1.87 % a una sola dosis
- **Tratamiento 2** : IVM al 1.87 % a una sola dosis, más un producto de soporte digestivo comercial que brindará protección gastrointestinal que está conformado por: ácidos grasos omega-3, antioxidantes, vitaminas, oligoelementos, junto con Bio-Sponge®, prebióticos, probióticos (*Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces c. boulardii 1079* y *Saccharomyces cerevisiae1077*) y glutamina
- **Tratamiento 3** : únicamente el producto de soporte digestivo comercial.

El suplemento fue administrado durante 30 días, 147 g dividido en 2 tomas con el alimento, siguiendo la dosificación recomendada en el producto. Durante el tiempo de la investigación todos los potros y potrancas pastoreaban de siete de la mañana a cinco de la tarde, terminando el pastoreo regresaban a sus caballerizas individuales donde permanecen toda la noche hasta la mañana siguiente, el pastoreo lo realizan separando a los animales por sexo, el pasto que se tiene en el rancho es ray grass y adicional al pastoreo los animales consumen 5 kg de alimento comercial y 3 kg de alfalfa, el agua se mantenía ad libitum.

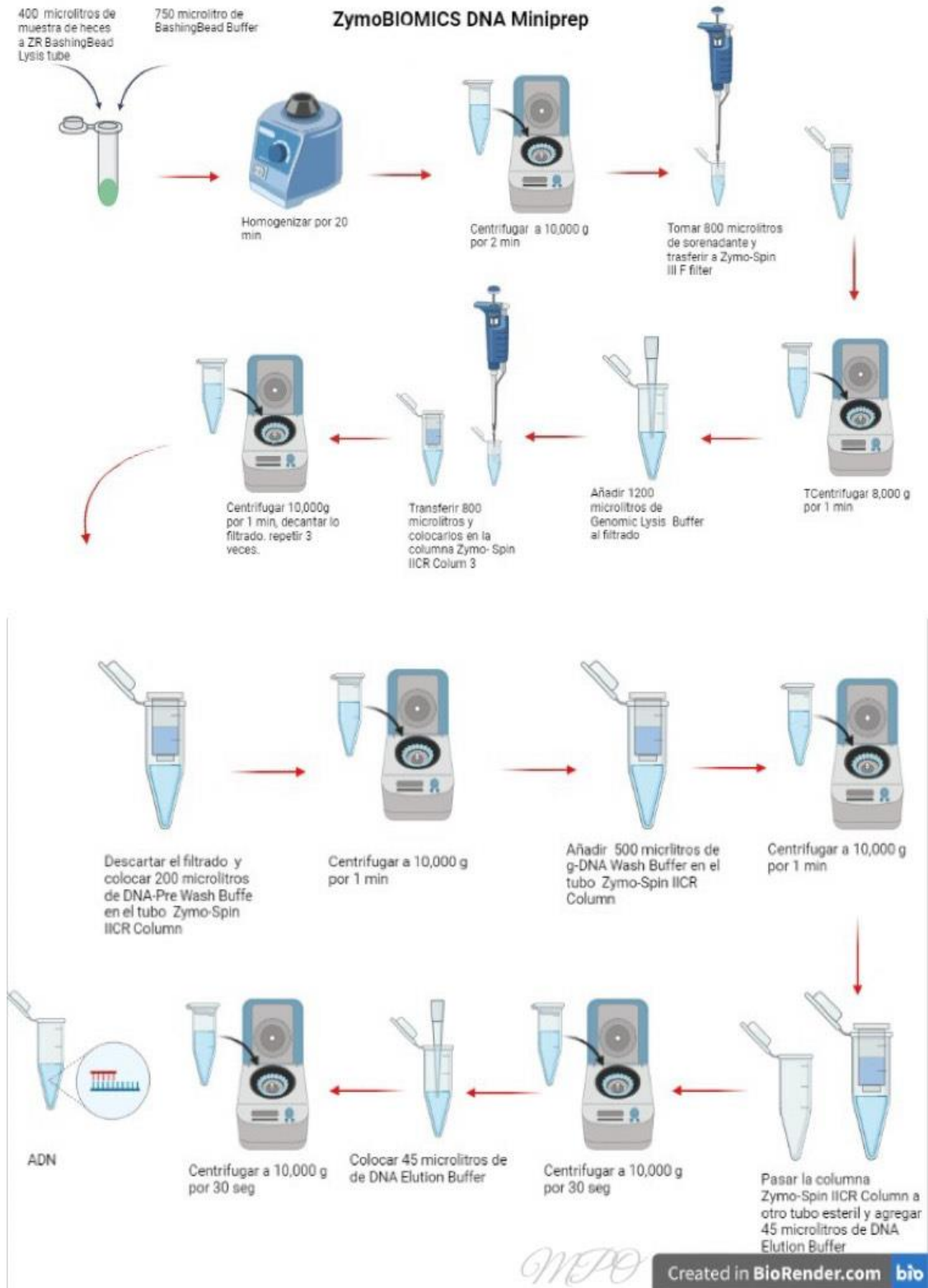
Respecto a la toma de muestras de heces se obtuvieron directamente del recto al día 0, 15 y 30 pos tratamiento. Con ayuda de un asa biológica se colocaron 0.25 g de heces en tubos de 2 ml y se añadió 2 ml de protector de ADN excepto en las muestras del día 30, no se añadió el protector, solo fueron congeladas al momento. Este producto de la marca ZYMO RESEARCH promete conservar la integridad genética de las muestra. La razón por la que se consideró el uso del protector de ADN es que el almacenamiento es uno de los pasos fundamentales para poder extraer ADN de bacterias de interés para el estudio de la microbiota intestinal, poder observar las diferencias producidas por el uso de dos métodos diferentes (protector de ADN y por congelación) podría ayudar a tomar decisiones más acertadas en un futuro (Kazantseva *et al.*,2021).

Los tubos con el material biológico fueron debidamente identificados y preservados en condiciones de temperatura de 4-8 °C hasta su transportación al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ UNAM). Esta técnica de obtención de muestra para extracción de ADN es considerada de gran utilidad y es utilizada principalmente en animales de alto valor genético como fauna silvestre o animales de alto estima como los equinos (Nardelli *et al.*, 2011).

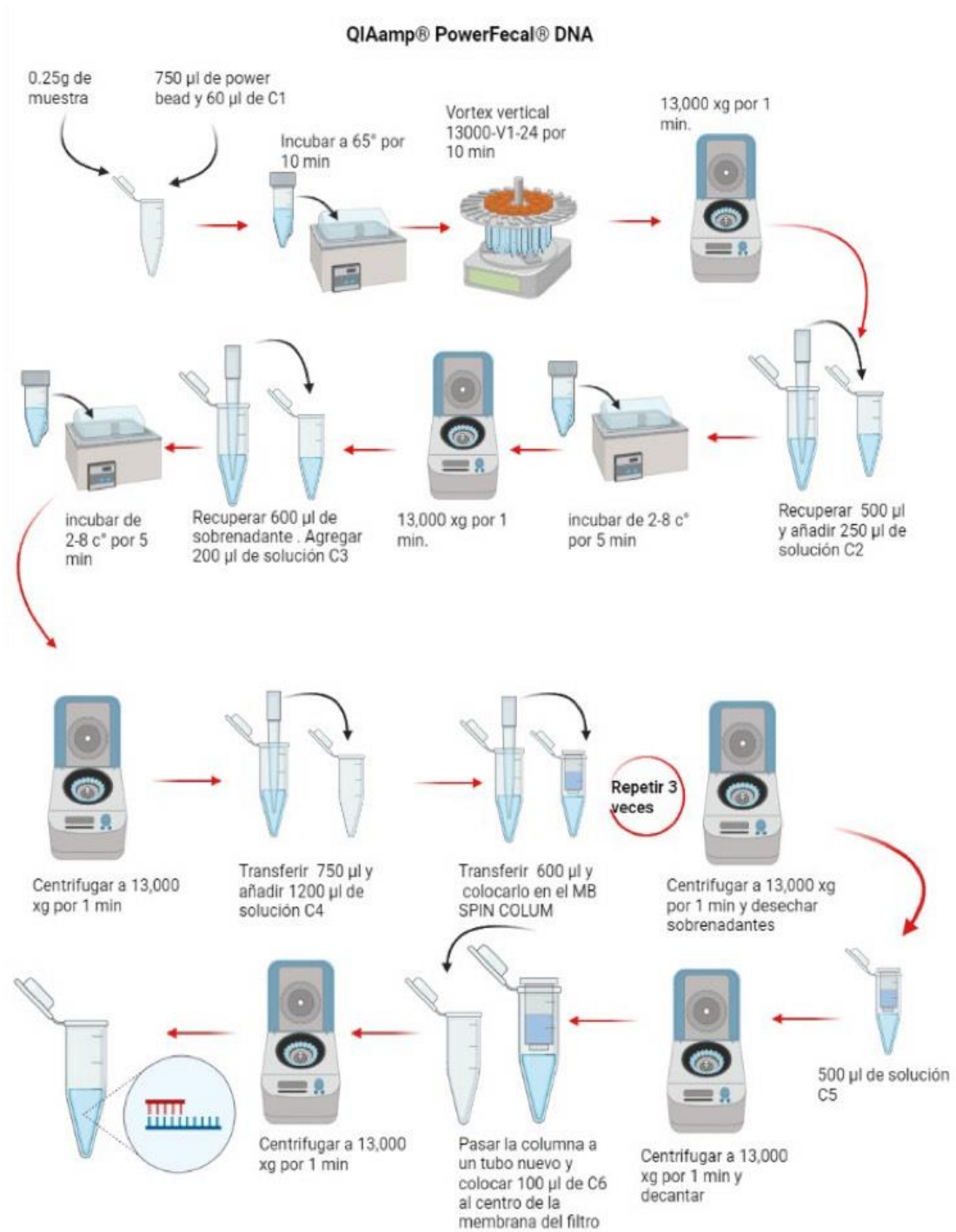
## **6.2 Extracción de ADN**

Se realizaron las extracciones de ADN en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la FMVZ UNAM (Imagen 1.), de las muestras del día 0 y 15 con el kit comercial Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial/ Miniprep siguiendo el protocolo del fabricante (fig.3, Anexo 2 y 3.). Las muestras del día 30 se realizaron con el kit QIAamp® PowerFecal® DNA siguiendo el protocolo del fabricante (fig.4, Anexo 4 y 5). Esta decisión fue tomada con el fin de poder comparar resultados en cuanto a calidad y cantidad de ADN.





**Figura 3.** Protocolo de extracción de ADN ( Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial/Miniprep. Ilustración creada con BioRender.com por Mariana Pérez Olvera)



MPO

Created in BioRender.com

**Figura 4.** Protocolo de extracción de ADN (kit QIAamp® PowerFecal® DNA. Ilustración creada con BioRender.com por Mariana Pérez Olvera).



**Imagen 1.** Extracción de ADN fecal equina, realizada en las instalaciones del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB) de la FMVZ UNAM

Durante el procesamiento de las muestras descartamos aquellas que contaban menos de  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de ADN. Todo este procedimiento se analizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One) a partir de  $2\mu$  de ADN obtenido previamente (Imagen 2). El NanoDrop cuantifica y comprueba la pureza del material genético. Para poder estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a  $260 \text{ nm}$  y  $280 \text{ nm}$ . a partir de  $1.8$  es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas (Cornejo *et al.*, 2014).



**Imagen 2.** Cuantificación y comprobación de pureza del material genético extraído con un espectrofotómetro NanoDrop

La comprobación de la integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa con 0.24 g de agarosa ultrapura en 30 mL de buffer TAE 1X.

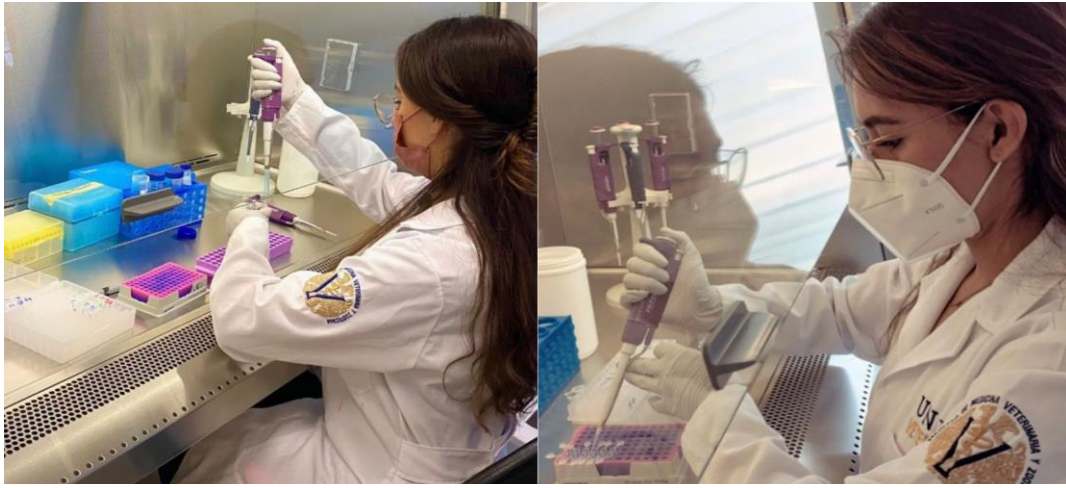
La mezcla utilizada para la electroforesis fue preparada en un volumen final de 10  $\mu$ L, con una concentración de ADN de 5 ng/ $\mu$ L en todas las muestras, el SYBRgreen fue añadido a 0.3 $\mu$ L por cantidad de DNA en  $\mu$ L utilizada. Se comparó el peso molecular de cada muestra con un marcador de peso molecular que va de los 150 pares de bases (pb) a 10,000 pb (Jena Bioscience). La electroforesis se realizó a 85 V durante 40 min, al finalizar el tiempo se observó a través de un transiluminador UV (Accuris™ SmartDoc™ 2.0)

### **6.3 PCR tiempo real (qPCR)**

Todas las qPCR se realizaron en la Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM (Imagen 3).

El volumen de reacción con los reactivos y en cantidades están descritas en la Tabla 1. Se utilizó un termociclador (Rotor-Gene® Q MDx, E.U.A.), el cual se programó bajo las condiciones dadas por la ficha técnica de Máster mix (KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix).

- Desnaturalización inicial(1 ciclo)  
95°C por 15 min
- Desnaturalización (45 ciclos)  
94°C por 15 seg
- Alineación  
60°C por 30 seg
- Extensión  
72°C por 30 seg
- Temperatura de fusión  
65-95°C por 20 seg  
(Véase anexo 4-6)



**Imagen 3.** Llenado de tubos Eppendorf en campana de extracción para la realización de las qPCR.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados en la reacción de qPCR

Reactivo	Volumen	Función
Agua Biología molecular	1.4 $\mu$ L	Agua ultrapura, desionizada para aplicar en PCR
Master mix	6 $\mu$ L	Es una solución concentrada 2X de ADN polimerasa Taq , dNTPs y MgCl <sub>2</sub> .
Primer	0.6 $\mu$ L.	Es una secuencia de oligonucleótido que flanquea y delimita la secuencia blanco que se desea amplificar y complementaria de esta.
ADN	2 $\mu$ L [10ng/ $\mu$ L]	ADN blanco será sintetizado y copiado para poder analizarse

Los microorganismos que fueron utilizados para este proyecto con sus respectivas secuencias de nucleótidos del gen 16S para realizar el qPCR, fueron seleccionadas después de una búsqueda bibliográfica, posteriormente se analizó su porcentaje de homogeneidad con el microorganismo de interés en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) véase en tabla 2.

**Tabla 2.** Secuencias de nucleótidos para qPCR del gen 16S y su porcentaje de parentesco según el NCBI

Microorganismo	Secuencia de Nucleótidos	Tamaño aproximado o número de bases (pb)	Porcentaje de homogeneidad NCBI	Referencia
<i>Clostridium perfringens</i>	F:TGA AAC TGG GAG ACT TGA GTC C R: CTT AGG TAA GGT TCT TCG CGT TGC	100	95%	Persson <i>et al.</i> , 2008.
<i>Clostridium difficile</i> toxina A	F:GCA TGA TAA GGC AAC TTC AGT GGT A R:AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	629	97.2%	Persson <i>et al.</i> , 2008.
<i>Clostridium difficile</i> toxina B	F:CCA AAG TGG AGT GTT ACA AAC AGG TG R:GCA TTT CTC CGT TTT CAG CAA AGT A	410	94.5%	Persson <i>et al.</i> , 2008.
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	F: AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA R: CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	625	78.3%	Schwab y Gänzle 2011
<i>Clostridium</i> cluster IV	F:GCA CAA GCA GTG GAG T R: CTT CCT CCG TTT TGT CAA	626	56%	Schwab y Gänzle 2011
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	F: GGA GGA AGA AGG TCT TCG G R: AAT TCC GCC TAC CTC TGC ACT	119	100%	Ramirez-Farias <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacterias Universales</i>	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R:GTITTICCGCGGCTGCTG	122	-	Frank <i>et al.</i> , 2008

## 6.4 Análisis estadístico

El experimento tiene un diseño completamente al azar. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los valores se expresan como los promedios  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores se compararon por una ANOVA (análisis de varianza) de una vía con la prueba post-hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos están procesados con el programa Rstudio.

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

Dónde  $Y_{ij}$  = observación de la  $j$ -ésima unidad experimental del  $i$ -ésimo tratamiento,  $\mu_i$  = media del  $i$ -ésimo tratamiento,  $\epsilon_{ij}$  = error experimental de la unidad  $ij$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Cuantificación de ADN

Se cuantificó la cantidad de ADN y se comprobó su pureza analizando la relación A260/A280. La nomenclatura utilizada es **T**= tratamiento, T1= tratamiento 1(IVM 1.87%) T2= tratamiento 2 (IVM 1.87% + suplemento de soporte digestivo) T3=tratamiento 3 (solo suplemento de soporte digestivo), **A**= Número de identificación del animal, **d**= día (tabla 3).

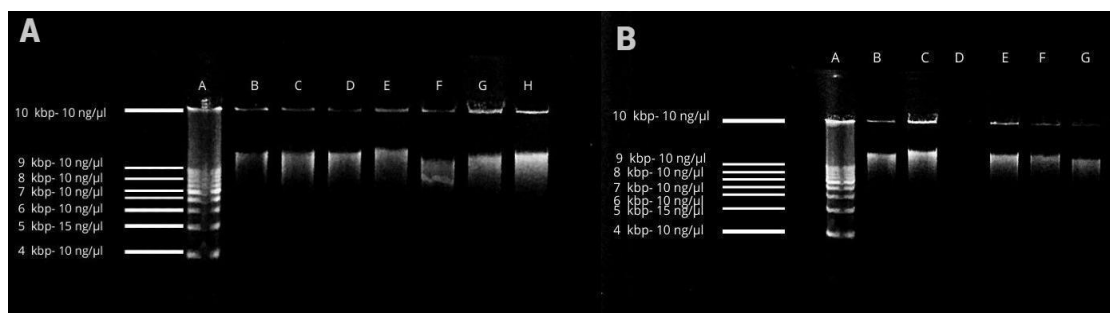
**Tabla 3.** Resultados de la cuantificación de DNA de todas las muestras en los días 0, 15 y 30.

Muestra*	Concentración de ADN (ng/μl)	Relación A260/A280	Muestra*	Concentración de ADN (ng/μl)	Relación A260/A280
T1-A13-D0	19.4	1.75	T2-A7-D15	14.9	1.88
T1-A14-D0	14.4	1.85	T2-A8-D15	18.2	1.86
T1-A15-D0	24	1.85	T2-A9-D15	8.3	1.74
T1-A16-D0	31.3	1.79	T2-A10-D15	28.6	1.73
T1-A17-D0	22.2	1.75	T2-A11-D15	23.5	1.84
T1-A18-D0	36	1.91	T2-A12-D15	20	1.70
T1-A13-D15	19	1.64	T2-A7-D30	97.25	1.90
T1-A14-D15	19	1.80	T2-A8-D30	108.68	1.87
T1-A15-D15	21.6	1.72	T2-A9-D30	83.9	1.89
T1-A16-D15	40.5	1.81	T2-A10-D30	188.92	1.88
T1-A17-D15	17.2	1.68	T2-A11-D30	110.64	1.87
T1-A13-D30	112.83	1.86	T1-C12-D30	117.84	1.87
T1-A14-D30	103	1.85	T3-A5-D0	13.6	1.93
T1-A15-D30	107.27	1.86	T3-A6-D0	22.1	1.82
T1-A16-D30	61.3	1.85	T3-A1-D15	13.4	1.97
T1-A17-D30	94.3	1.84	T3-A2-D15	10	1.88
T1-A6-D30	37.2	1.86	T3-A5-D15	12.8	1.97
T2-A7-D0	26.9	1.85	T3-A1-D30	71.83	1.87
T2-A8-D0	26.9	1.91	T3-A2-D30	108.68	1.87
T2-A9-D0	15.8	1.85	T3-A4-D30	112.72	1.88
T2-A10-D0	32	1.88	T3-A5-D30	65.91	1.89
T2-A11-D0	44.2	1.84	T3-6-D30	100.57	1.89
T2-A12-D0	15.6	1.84			

## 7.2 Comprobación de integridad

La mezcla utilizada para la electroforesis fue preparada en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , la concentración para todas las muestras de ADN fue de 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , SYBRgreen fue añadido a 0.3  $\mu\text{L}$  por cantidad de DNA en  $\mu\text{L}$  utilizada. Se realizó electroforesis a 85 V durante 40 min.

En las electroforesis de las muestras de ADN extraídas mediante el Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial/ Miniprep Kit podemos observar que mantienen un peso aproximado de 10 kbpl. Mientras que las muestras extraídas con el kit QIAamp® PowerFecal® DNA presentan un peso aproximado de 9 kbpl y logran visualizar degradadas. Pero podemos comprobar que tenemos ADN de calidad suficiente para poder realizar qPCR(Imagen 4-6).

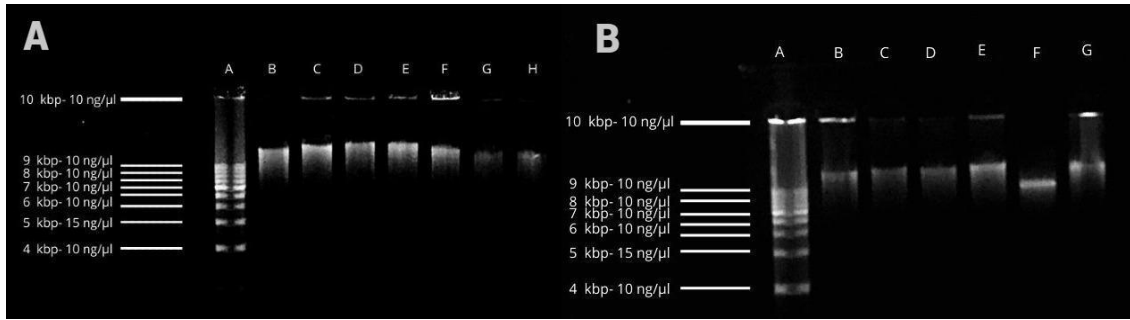


**Imagen 4.** Comprobación de integridad de muestras en el día 0.

En el lado **A** de la imagen, se observa la electroforesis de las muestras de ADN extraídas mediante Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial/ Miniprep Kit del día 0. A) marcador de peso molecular, B) muestra T3-A5-d0, C) muestra T2-A7-d0, D) muestra T2-A8-d0 E) muestra T2-A9-d0, F) muestra T2-A10-d0, G) muestra T2-A11-d0 H) muestra T2-A12-d0.

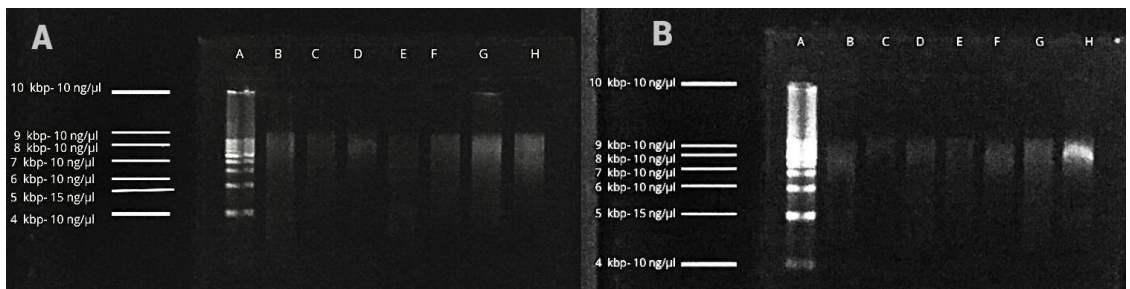
En el lado **B** se aprecia la continuación de las muestras de ADN A) marcador de peso molecular, B) muestra T1-A13-d0, C) muestra T1-A14-d0, D) muestra T1-A15-d0, E) muestra T1-A16-d0, F) muestra T1-A17-d0, G) muestra T1-A18- d0. La muestra T1-A15-d0 no se observa debido a un error al momento de cargar la muestra en el pocillo del gel de agarosa.





**Imagen 5.** Comprobación de integridad de muestras en el día 15

En esta electroforesis podemos observar del lado **A** las muestras de ADN extraídas mediante Zymo Research Quick DNA fungal/bacterial/ Miniprep Kit del día 15 postratamiento. A) marcador de peso molecular, B) muestra T1-A15-d0, C) muestra T3-A1-d15, D) muestra T3-A5-d15, E) muestra T2-A7-d15, F) muestra T2-A8-d15, G) muestra T2-A10-d15 H) muestra T2-A11-d15. En el pocillo **B** podemos observar que la muestra T2-A15-d0 si cuenta con material genético íntegro y que el fallo anterior fue debido a un error técnico. En el lado **B** observamos la continuación de las muestras de ADN del día 15 post tratamiento. A) marcador de peso molecular, B) muestra T2-A12-d15 C) muestra T1-A13-d15, D) muestra T1-A14-d15, E) muestra T1-A15-d15, F) muestra T1-A16-d15, G) muestra T1-A17-d15.



**Imagen 6.** Comprobación de integridad de muestras en el día 30.

En esta electroforesis podemos observar del lado **A** las muestras de ADN extraídas mediante el kit QIAamp® PowerFecal® DNA del día 30 postratamiento A) marcador de peso molecular, B) muestra T3-A1-d30 , C) muestra T3-A2-d30, D)muestra T3-A4-d30, E) muestra T3-A5-d30, F) muestra T3-A6-d30, G) muestra T2-A7-d30, H) muestra T2-A8-d30. Mientras que del lado **B** la continuación de las muestras de ADN del día 30 post tratamiento. A) marcador de peso molecular, B) muestra T2-A9-d30, C) muestra T2-A10-

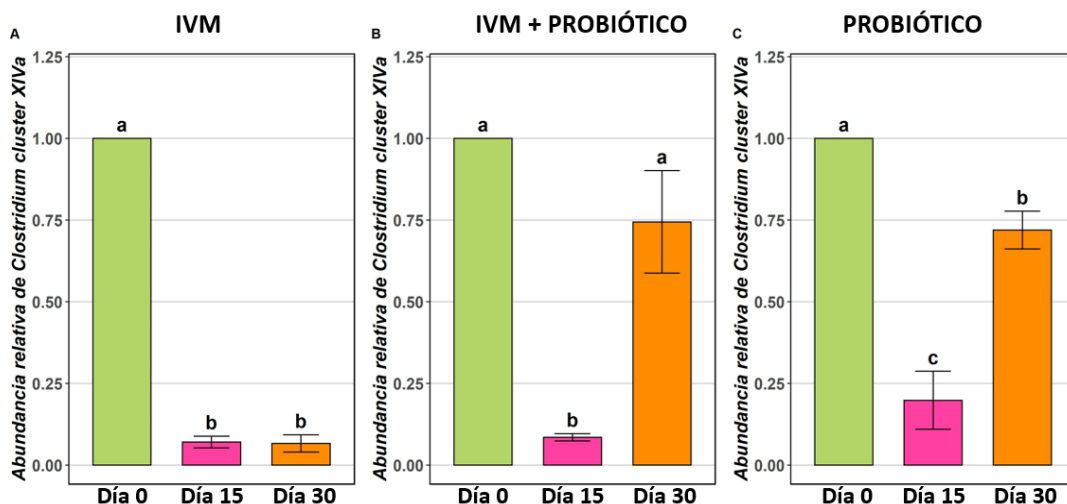
d30, D)muestra T2-A11-d30, E) muestra T2-A12-d30, F) muestra T1-A13-d30, G) muestra T1-A14-d30, H) muestra T1-A15-d30.

### 7.3 Análisis de abundancia relativa

A continuación, se presentan los resultados de los qPCR.

Se puede observar que en el **tratamiento 1 (IVM 1.87%)** existe una menor abundancia relativa de *C.cluster XIVa* en comparación con el día 0. **Tratamiento 2 (IVM 1.87% + suplemento comercial de soporte digestivo)** se observa una disminución del 91.5% ( $p<0.05$ ) en la abundancia relativa de *C.cluster XIVa* en comparación del día 0, sin embargo, existe un notable incremento del de 68.07% ( $p<0.05$ ) en la abundancia relativa en comparación con el día 15.

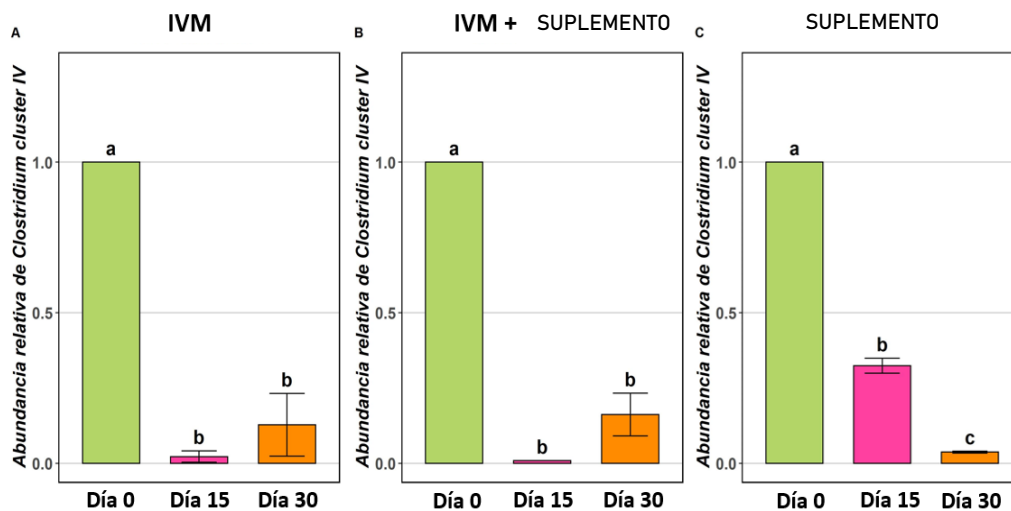
**Tratamiento 3 (suplemento comercial de soporte digestivo)**, al día 15 observamos una disminución del 81% ( $p<0.05$ ) de la abundancia relativa de *C.cluster XIVa*, mientras que para el día 30 existe un incremento del 65.78% ( $p<0.05$ ) en relación al día 15 (fig.5). En cuanto a la expresión de *C. cluster IV* de manera general, sin importar el tratamiento, la abundancia relativa de este microorganismo disminuye conforme pasa el tiempo.



**Figura 5.** Abundancia relativa de *C.cluster XIVa*

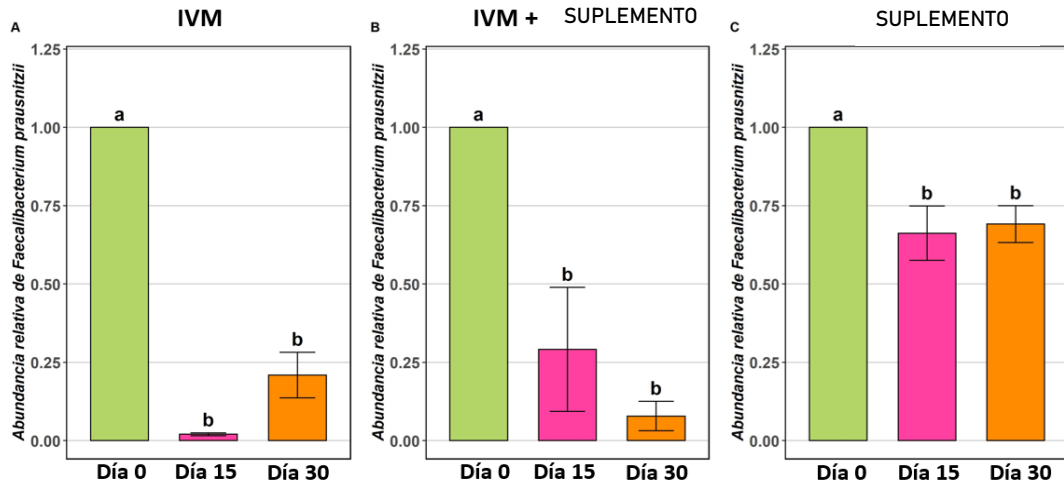
**A) Administración de IVM al 1.87%,** en el día 15 observamos un descenso del 97.8% ( $p<0.05$ ) de *C.cluster IV*, para el día 30 el descenso es de 87.7% ( $p<0.05$ ) en comparación con el día 0. **B) IVM al 1.87 % + suplemento comercial de soporte digestivo** Se

observa una reducción de 99.1% ( $p < 0.05$ ), mientras que en el día 30 incrementó en un 16.64% ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 15. **C) Únicamente se le administró el suplemento comercial de soporte digestivo** en el día 15 podemos observar una disminución del 67.8% ( $p < 0.05$ ) mientras que para el día 30 fue del 96.3% ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 0. En cuanto a la expresión de *C. cluster IV* de manera general, sin importar el tratamiento, la abundancia relativa de este microorganismo disminuye conforme pasa el tiempo (Fig. 6).



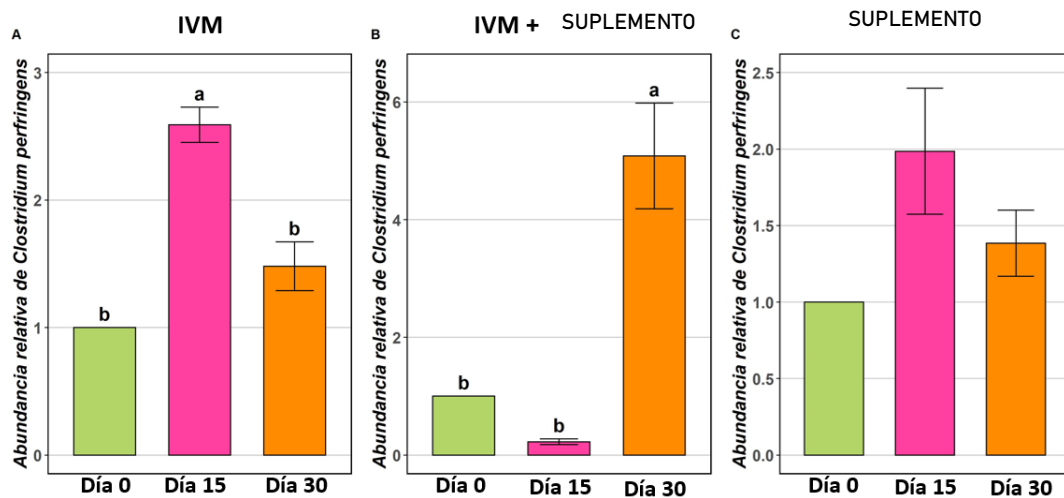
**Figura 6.** Abundancia relativa de *Clostridium cluster IV* (Ruminococcaceae)

Analizando los resultados de *F. prausnitzii* se puede distinguir que en el **tratamiento 1 (IVM 1.87%)** al día 15, existe un descenso del 98% ( $p < 0.05$ ) de abundancia relativa de *F. prausnitzii* en comparación con el día 0. **Tratamiento 2 (IVM 1.87% + suplemento comercial de soporte digestivo)** una disminución del 70.9% ( $p < 0.05$ ) en la abundancia relativa de *F. prausnitzii* en comparación del día 0, sin embargo, existe un sobresaliente resultado en el **tratamiento 3 (suplemento comercial de soporte digestivo)** Para el día 15 disminuye la abundancia relativa de *F. prausnitzii* solo en un 33.8% ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 0. (Fig.7)



**Figura 7.** Abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii*

El siguiente hallazgo fue bastante inesperado. En el **tratamiento 1 (IVM 1.87%)** al día 15, se puede observar un interesante aumento del 159.1% ( $p < 0.05$ ) *C. perfringens* en comparación con el día 0. **Tratamiento 2 (IVM 1.87% + suplemento comercial de soporte digestivo)** el incremento en la abundancia relativa de *C. perfringens* se observa al día 30, con un alarmante incremento de un 408.5% ( $p < 0.05$ ) con respecto al día 0. **Tratamiento 3 (suplemento comercial de soporte digestivo)**. Para el día 15 la abundancia relativa de *C. perfringens* incrementó en un 98.1% ( $p < 0.05$ ) en comparación con el día 0. (Fig. 8)



**Figura 8.** Abundancia relativa de *Clostridium perfringens*

## 8. Discusión

Conservar la microbiota intestinal en buenas condiciones es necesario para mantener la salud de los caballos. Se sigue discutiendo qué es lo primero que sucede, enfermedad o microbiota alterada. Todos los estudios que existen actualmente sobre la microbiota fecal de caballos tienen una variación impresionante en los resultados (Costa *et al.*, 2015; Stewart *et al.*, 2018), en consecuencia, nuestro conocimiento de lo que se puede estimar como variación normal o anormal en la microbiota fecal equina es limitada (Blackmore *et al.*, 2013; Dougal *et al.*, 2017).

Tradicionalmente en la medicina veterinaria equina en México, al intentar controlar los parásitos, se administran de manera continua desparasitantes (cada 2-3 meses). Uno de los antihelmínticos más utilizados en el mundo ecuestre es la ivermectina. Investigaciones recientes han demostrado que la administración de antihelmínticos como febendazol y moxidectina (lactona macrocíclica, al igual que la ivermectina) influyen de manera negativa en la microbiota intestinal, lo cual afecta la respuesta inflamatoria e inmune, pero sigue sin estar claro el mecanismo (Garber *et al.*, 2020; Kunz *et al.*, 2019; Walshe *et al.*, 2019). La hipótesis planteada para esta investigación no se cumplió, el crecimiento acelerado *C.perfringens* en todos los equinos del estudio (Figura 8.), nos lleva a suponer que existe una alteración en la microbiota de estos caballos, el cual podemos pensar que es ocasionado por el uso de esta lactona macrocíclica, si analizamos con detalle podemos estar frente a un claro ejemplo de resiliencia por parte del animal, a pesar de este aumento tan significativo de una bacteria catalogada como patógena, de alguna manera se puede equilibrar su presencia de tal modo que los animales nunca presentaron algún signo clínico de enfermedad. Por otra parte, también podríamos estar viendo un claro ejemplo de competencia, aunque se desconoce si la IVM tiene algún efecto en la bacteria, si lo tiene en los parásitos, al momento de controlar la población de Ciatostominos, disminuye la competencia de nutrientes brindando un ambiente oportuno para que proliferen las bacterias, en este caso *C.perfringens*. Tomando en cuenta lo planteado en investigaciones recientes realizadas por Garber *et al.*, Kunz *et al.*, Walshe *et al.*, de alguna manera que aún sigue en investigación, al administrarse un AH de amplio espectro disminuyen bacterias como *C.cluster XIVa* (Figura 5) y *C.cluster IV* (Figura 6), las cuales por competencia impedían que las bacterias nocivas se establecieran, al ya no estar presentes, dejan el lugar perfecto para la proliferación de microorganismos nocivos como *C.perfringens*. Se ha reportado que la disminución de *C.cluster XIVa* y *IV* puede

estar íntimamente relacionada con la presencia de cambios nocivos en la microbiota, en este caso, con el aumento de *C.perfringens* (Livanos *et al.*, 2018). En cuanto a los cambios observados en *F.prausnitzii*(Figura 7) en los tres tratamientos se puede observar que al día 15 disminuye su abundancia relativa, esta es una situación sin antecedentes reportados en investigaciones similares, por ahora podemos pensar que *F.prausnitzii* tiene mayor sensibilidad a cambios de la conformación de la microbiota, pero es importante destacar que aquellos caballos del tratamiento 3 (suplemento comercial) el descenso es menor, enfatizando que la disminución fue solo de un 33% ( $p<0.05$ ) con respecto al día 0, con lo que podemos plantear que el suplemento podría brindarle las herramientas necesarias a *F.prausnitzii* para volver a incrementar hasta los niveles iniciales a pesar del ambiente hostil (resiliencia). *C.cluster XIVa* también tiene una notable recuperación al día 30 de los tratamientos donde se utiliza el producto comercial, con lo analizado anteriormente podemos suponer que el uso del probiótico comercial ayudará a restablecer progresivamente a los 30 días la abundancia relativa de nuestras bacterias de interés o en su defecto ayudará a que la pérdida de estos no sea tan drástica. Con relación a nuestro estudio, *C.cluster XIVa*, *C.cluster IV* y *F. prausnitzii* cumplen funciones muy importantes en la regulación de la salud intestinal, producen ácidos grasos de cadena corta, el principal es el butirato, el cual es fuente de energía para las células epiteliales del colon, ayuda a disminuir la inflamación de la mucosa, regular la motilidad intestinal, disminuye el pH luminal para ayudar a la solubilidad de sales biliares (Ayub *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2020). El mantenimiento de estos microorganismos con funciones tan importantes en la homeostasis intestinal podría explicar el hecho de que a pesar de que los caballos del tratamiento 3 no fueron desparasitados y evidentemente sus cargas parasitarias no disminuyeron, se encontraron clínicamente sanos y sin ninguna alteración, siendo un claro ejemplo de resiliencia, mientras que los caballos desparasitados y suplementados con el producto de soporte digestivo lograron recuperar en gran porcentaje la presencia de estas bacterias. En cuanto a *C. difficile* toxina A y B no fue identificado en ninguna de nuestras muestras, esto puede atribuirse al primer seleccionado, un mal manejo a la hora de preparar la muestra, pero este resultado no significa que no está presente en los caballos. Debemos puntualizar que la amplificación de estos microorganismos se basó en el gen 16S, el cual es más específico a nivel de phyla, poco específico en género y con un margen de error más grande a nivel de especie (Konstantinidis *et al.*, 2006) esto se debe a que el gen 16S amplifica solo una región del genoma bacteriano, facilitando la transferencia horizontal de genes, en consecuencia a

esto se propone realizar estudios con distintas técnicas para evitar las desventajas del gen 16S(Tettamanti *et al.*, 2020).

Hasta el 2018 no existía ningún estudio sobre los efectos de las infecciones con *Ciatostominos* en equinos y su relación con la composición de su microbiota (Peachey *et al.*, 2018). En el 2020, Walshe *et al* descubrió que los *Ciatostominos* pueden originar un cambio en la microbiota intestinal ocasionando un conjunto de respuestas entre los microorganismos y el sistema inmune de la mucosa intestinal, sin embargo, se necesita investigar el origen de esta interacción y su efecto en un lapso de tiempo corto y largo. Podemos suponer que existe una relación de simbiosis mutualista compleja, en donde puede existir un punto de equilibrio en donde, una infección crónica moderada pueda asociarse con algún beneficio para la salud del huésped.

No cabe duda de que uno de los factores más importantes para el mantenimiento de la homeostasis es la nutrición. Los probióticos están siendo posicionados en el tratamiento de elección para prevenir o tratar enfermedades en humanos y en medicina veterinaria, si bien se sabe que brindan beneficios para el paciente, aún hace falta una investigación a profundidad de los productos comerciales que existen actualmente en México para determinar su verdadera eficacia, ya que uno de los principales retos de esta investigación fue la escasa información al respecto de la relación de los microorganismos declarados en el producto comercial (*Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces C. boulardii 1079* y *Saccharomyces cerevisiae 1077*) y los encontrados en la microbiota de los caballos de este estudio, por lo tanto, no sabemos si de alguna manera estas levaduras interfieren en el crecimiento de bacterias como lo son *C. cluster IV* la cual se vio disminuida a lo largo de los días o que en su defecto algún metabolito pudiera ser un factor que ayudará a la proliferación de algún microorganismo nocivo. Lo que sí podemos decir es que el administrar probióticos, provoca una serie de cambios en la microbiota, las bacterias que habitan de manera habitual en el organismo del individuo deberán pasar por un proceso de adaptación ante esta perturbación, pasando esta fase lograrán recuperar su cantidad inicial. El conjunto de estas causas (administración de AH y suplemento comercial) son la posible respuesta a los resultados que se obtuvieron.

Por otra parte, el protector de ADN promete conservar la integridad genética , esto podría explicar por qué al momento de extraer ADN, comprobar su integridad y secuenciar no existe ningún inconveniente, lo cual confirma que el uso del protector de ADN es de gran ayuda para preservar muestras, el productor de esta sustancia afirma que las muestras pueden ser transportadas a diferentes temperaturas y mantenerse en buenas condiciones

hasta por un año (Kazantseva *et al.*, 2021), lo cual es una gran ventaja frente a la conservación por congelación, ya que muchas veces se convierte en un reto durante los muestreos en campo contar con el material necesario para congelar las muestras de manera inmediata y evitar que se descongelen en el camino. Por otra parte, debemos considerar que el manejo adecuado de las muestras en la colección y conservación son pasos imprescindibles para lograr obtener resultados confiables en el estudio de la microbiota intestinal. Una gran limitante de los análisis genéticos no invasivos es la menor calidad del ADN a diferencia de las tradicionales (Waits y Paetkau 2005), esto es debido a que el ADN extraído de las heces es proveniente de células del lumen del epitelio intestinal, en este tipo de muestra podemos encontrar compuestos que no son de interés como lo son: comida no digerida, moco, sales biliares, bilirrubina polisacáridos de plantas causando interferencia para la obtención del material genético (Albaugh *et al.*, 1992; Bosch *et al.*, 2005; Nardelli *et al.*, 2011). Aún no existe un método eficaz y repetible para la extracción de ADN fecal, sin embargo, se ha concluido que el método ideal de extracción varía dependiendo la especie y ubicación geográfica (Waits y Paetkau 2005). Es por esto que la extracción de ADN fecal presenta limitantes como lo son: poca cantidad y calidad de ADN obtenido, la extracción tiene un costo elevado porque se necesitan kits comerciales, los protocolos no son repetibles para toma, conservación y extracción de muestras, se requieren establecer umbrales de concentraciones de ADN que se adecuen a las muestras no invasivas de heces dependiendo de la especie, al menos lograr establecer una para herbívoros y otra para carnívoros, ya que actualmente no existe tal umbral y esto es un factor crucial para obtener datos de calidad y con un respaldo previamente estandarizado (Hausknecht *et al.*, 2010). Estas limitaciones deben considerarse al momento de decidir trabajar con ADN fecal. No obstante, a pesar de los inconvenientes mencionados, son consideradas como una gran alternativa para poder realizar estudios en varias especies (Bosch *et al.*, 2005; Nardelli *et al.*, 2011).

Este tipo de investigaciones representan una revolución en cuanto a los tratamientos tradicionales en la medicina veterinaria. Todos los estudios que se han hecho hasta el año 2022 nos muestran que hay futuro en el mercado para los probióticos y probablemente sean el rescate esperado para toda esta ola de resistencias que se han estado reportando en los últimos años en todas las especies.



## 9. Conclusiones

Se logró cumplir el objetivo general, se identificó el cambio de la población de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV* y *F. prausnitzii* en caballos parasitados con Ciatostominos suplementados con soporte digestivo comercial. Se comprobó que el uso de ivermectina tiene un impacto en la microbiota y como consecuencia en la microbiota del caballo. Se logró estipular sobre la resiliencia que existe en el huésped ante el incremento de poblaciones nocivas, en relación con esto también podemos creer en el impacto que tuvo el suplemento al evitar una disminución marcada de microorganismos de interés o en su defecto re establecerlos con mayor rapidez a los 30 días.

Se logró identificar limitantes en el estudio de microbiota fecal equina, como lo es el poder definir un valor umbral de ADN para las muestras fecales y establecerlo para cada especie, tipo de muestra (heces de carnívoros o herbívoros). Se rechaza nuestra hipótesis, ya que *C. perfringens* incremento y *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV*, *F. prausnitzii* disminuyeron; sin embargo, los animales se encontraron sin ninguna complicación clínica durante la investigación, mostrando un claro ejemplo de resiliencia.

La microbiota interviene en funciones esenciales para mantener la salud de los equinos, estudiarlo a mayor profundidad nos abrirá la puerta a la modernización de la prevención y tratamiento de distintos padecimientos comunes en el mundo ecuestre. Fomentar la investigación para la comprensión del papel que juegan los parásitos en el huésped más allá del conocimiento patológico actual, para lograr controlar el uso de fármacos. Finalmente, los clostridios son bacterias que se localizan de manera natural en el intestino de los mamíferos, en especial, *C. cluster XIVa*, *C. cluster IV*, *F. prausnitzii* tienen mucha evidencia de que a través de sus metabolitos, en especial el butirato, ayudan a mantener la salud intestinal. Sin duda alguna falta más investigación, pero resulta lógico que puedan ser utilizados en un futuro cercano como probióticos.

## 10. Perspectivas

Actualmente, existe una gran cantidad de estudios sobre probióticos en animales de producción, las demandas actuales y crecientes de alimentos, de origen animal, han obligado a mantener una producción continua y masiva de animales (Kritas.,2017). Durante muchos años en animales de producción se han utilizado antibióticos en dosis subterapéuticas como promotores de crecimiento, siendo un factor desencadenante de

poblaciones de microorganismos resistentes a los antibióticos, sin embargo, está comprobado que el consumir probióticos tiene un efecto en la absorción de alimento que se ve reflejado en el incremento de ganancia de peso diario (Zoomiti *et al.*, 2020). Existe un número limitado de investigaciones sobre los efectos de probióticos en equinos (Zommiti *et al.*, 2020). La deficiencia del conocimiento integral de la microbiota equina, ocasiona obstáculos para lograr un consenso sobre lo que es considerado una alteración normal o anormal (Garber *et al.*, 2020). El mundo ecuestre es bastante complicado, se sabe que los caballos sufren de enfermedades gastrointestinales que muchas veces son letales. Todas las problemáticas expuestas en este trabajo han mandado señales de alerta y motivado la investigación para buscar alternativas más amigables con los pacientes, como lo es el manejo integrado parasitario. A pesar de lo anterior, debemos tener en cuenta que la poca investigación respecto a los probióticos comerciales en medicina veterinaria, nos hacen tener incertidumbre sobre su eficacia y seguridad. Aún no existen estrategias para lograr una participación probiótica más conveniente para el animal, tomando en cuenta la gran diversidad de poblaciones de microorganismos que habitan en las distintas especies, ni para el control de enfermedades que se presentan en los animales (Kritas., 2017; Zhang *et al.*, 2021; Zoomiti *et al.*, 2020).

## 11. Bibliografía

1. Acevedo, J. A., García, A., 2016. Rosalind Franklin y la Estructura Molecular del ADN: Un caso de historia de la ciencia para aprender sobre la naturaleza de la ciencia. *Rev. Cient.* 25, 162-175.
2. Albaugh, G.P., Iyengar, V., Lohani, A., Malayeri, M., Bala, S., Nair, P.P., 1992. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *Int J Cancer.* 30;52(3)
3. Andrade, M., Leite, T., Pinto, R., Müller, V., Moreira, E., Rosa, B., Wayne, C.E., 2021. Factors influencing the composition and balance of foals' microbiota. *Res., Soc. Dev.* 10, 2-8.
4. Arrieta, G., Peña, C., Hurtado, V.L., Iregui, A., 2007. Utilización de materias primas regionales en la alimentación de equinos criollos adultos en el municipio de Villavicencio. *Orinoquia*, 11(1), 92-98.
5. Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Van Der Veecken, J., Deroos, P., Rudensky, A.Y., 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 504, 451-455.
6. Ayoub, C., Arroyo, L. G., Renaud, D. L., Weese, J. S., Gomez, D. E. 2022. Microbiota Comparison Between Healthy Teaching Horses and Client-Owned Horses. *J. Equine Vet. Sci.*
7. Berreta, A., Kopper, J.J., Alexander, T.L., Kogan, C. J., Burbick, C.R., 2021. Effect of an In Vitro Proximal Gastrointestinal Tract on Viability of Commercially Available Equine Probiotics. *J. Equine Vet. Sci.*, 104.
8. Blackmore, T.M., Dugdale, A., Argo, C.M., Curtis, G., Pinloche, E., Harris, P. A., McEwan, N. R., 2013. Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. *PLOS One* 8(9).
9. Behling, S. 2011. *Razas de caballos*. Hispano europeo. 5-8
10. Bellaw, J.L., Krebs, K., Reinemeyer, C.R., Norris, J. K., Scare, J. A., Pagano, S., Nielsen, M.K., 2018. Anthelmintic therapy of equine cyathostomin nematodes—larvicidal efficacy, egg reappearance period, and drug resistance. *Int.J.Parasitol.* 48, 97-105.
11. Bosch, M., Marmi, J., Ferrando, A., López-Giráldez, F., García, E., Ponsá, M., Kellermann, T., Guallar, B., Bisbal, F., Domingo-Roura, X., 2005. Genotipar sin capturar. *Galemys Spanish Journal of Mammalogy*; 17: 81- 102

12. Buffie, C.G., Pamer, E.G., 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Immunol.* 13, 790-801.
13. Caffè, G., Paz Bernard, B., Cerutti, J., Cooper, L. G., Signorini, M., Anziani, O. S. 2018. Resistencia antihelmíntica en equinos: Observaciones sobre el período de reaparición de huevos luego del tratamiento con ivermectina en potrancas y yeguas madres. *Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias*, 17(2), 40-44.
14. Clark, A., Sallé, G., Ballan, V., Reigner, F., Meynadier, A., Cortet, J., Koch, C., Riou, M., Blanchad, A., Mach, N., 2018. Strongyle infection and gut microbiota: profiling of resistant and susceptible horses over a grazing season. *Front. Physiol.* 9, 272.
15. Cook, C.G., Gibb, Z., Harnett, J.E., 2021. The Safety, Tolerability and Efficacy of Probiotic Bacteria for Equine. *J. Equine Vet. Sci.*, 99.
16. Cording, S., Fleissner, D., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Loddenkemper, C., Uematsu, S., Huehn, J., 2013. Commensal microbiota drive proliferation of conventional and Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* 3, 1-10.
17. Correa, A., Rodríguez, A., Ducoing, A., García, A., Gris, A.G., Gálvez, C.A., González, C., Loza, C.V., Guzmán, E., Pesado, F.A., Campos, G.R., Gómez, G., Jandete, G.H., Romero, J., Hernández, J., Monroy, J.F., Sánchez, J.I., Espinosa, L.G., Castro, L.A., Dejuan, L.F., Escorcía, M., Chavacán, M.L., Castañeda, M.P., Trujillo, M.E., Blanco, M.A., Marquéz, M.A., Martínez, M.A., Raygoza, M.E., Hernández, R., Martínez, R.G., Merino, R., Buntix, S.E., 2012. Introducción a la zootecnia. UNAM-FMVZ. 181-187
18. Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., Rocha, M.G., 2014. Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. *Vol. 1*
19. Costa, M.C., Arroyo, L.G., Allen-Vercoe, E., Stämpfli, H.R., Kim, P.T., Sturgeon, A., Weese, J. S. 2012. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLOS One* 7 (7).
20. Costa, M.C., Silva, G., Ramos, R.V., Staempfli, H.R., Arroyo, L.G., Kim, P., Weese, J.S., 2015. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet. J.* 205(1), 74-80.
21. Costa, M.C., Weese, J. S. 2018. Understanding the intestinal microbiome in health and disease. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 34(1), 1-12.

22. Dam, B., Misra, A., Banerjee, S. 2019. Role of Gut Microbiota in Combating Oxidative Stress. *Oxidative Stress in Microbial Diseases*. 43- 82
23. De La Torre, U., Henderson, J.D., Furtado, K.L., Pedroja, M., Elenamarie, O., Mora, A., Pechanec, M.Y., Maga, E.A., Mienaltowski, M.J. 2019. Utilizing the fecal microbiota to understand foal gut transitions from birth to weaning. *PLOS One*.
24. Dougal, K., De la Fuente, G., Harris, P.A., Girdwood, S.E., Pinloche, E., Geor, R.J., Nielsen, B.D., Schott II, H.C., Elzinga, S., Newbold, C.J. 2014. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLOS One*, 9(2).
25. Dougal, K., Harris, P.A., Girdwood, S.E., Creevey, C.J., Curtis, G.C., Barfoot, C.F., Newbold, C. J., 2017. Changes in the total fecal bacterial population in individual horses maintained on a restricted diet over 6 weeks. *Front. Microbiol.* 8.
26. Ericsson, A.C., Johnson, P.J., Lopes, M.A., Perry, S.C., Lanter, H. R., 2016. A microbiological map of the healthy equine gastrointestinal tract. *PLOS One*. 11(11).
27. ESCCAP, 2019. A guide to the treatment and control of equine gastrointestinal parasite infections.
28. Farag, E.F., Shalaby, B., El-Hamed, A., Taher, M. 2019. Potential role of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* as a cause of diarrhea in horses. *J. Vet. Sci.*, 4(2), 18-29.
29. Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S., 2014. Real-Time PCR. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech*.
30. Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., Olsen, G. J. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(8), 2461-2470.
31. Garber, A., Hastie, P., Murray, J. A., 2020. Factors influencing equine gut microbiota: Current knowledge. *J. Equine Vet. Sci.* 88, 2-9.
32. Gilroy, R., Leng, J., Ravi, A., Adriaenssens, E.M., Oren, A., Baker, D., La Ragione, R.M., Proudman, C., Pallen, M.J., 2022. Metagenomic investigation of the equine faecal microbiome reveals extensive taxonomic diversity. *PeerJ*, 10.

33. Grenda, T., Grenda, A., Domaradzki, P., Krawczyk, P., Kwiatek, K., 2022. Probiotic Potential of *Clostridium* spp.-Advantages and Doubts. *Curr Issues Mol Biol.* 7;44(7):3118-3130.
34. González, C.A., Sahagún, A.M., Díez, M.J., Fernández, N., Sierra, M., García, J.J., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Vet. J.* 179(1), 25-37
35. Guo, P., Zhang, K., Ma, X., He, P., 2020. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 11(1)
36. Hausknecht, R., Bayerl, H., Gula, R., & Kuehn, R. 2010. Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for noninvasive genetic monitoring. *J. Wildl. Manag.* 74(8), 1904-1910.
37. Hillebrant, R.S., Dittrich, J. R., 2015. Anatomia e fisiologia do aparelho digestório de equinos aplicadas ao manejo alimentar. *Revista Acadêmica de Ciência Equina*, 1(1), 16-22.
38. Husso, A., Jalanka, J., Alipour, M.J., Huhti, P., Kareskoski, M., Pessa-Morikawa, T., Iivanainen, A., Niku, M., 2020. The composition of the perinatal intestinal microbiota in horse. *Sci. Rep.* 1-10
39. Kauter, A., Epping, L., Semmler, T., Antao, E. M., Kannapin, D., Stoeckle, S. D., Gehlen, H., Lübke-Becker, A., Günther, S., Wieler, L.H., Walther, B., 2019. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. *Anim microbiome*, 14, 1-15.
40. Kazantseva, J., Malv, E., Kaleda, A., Kallastu, A., Meikas, A. 2021. Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies. *BMC Microbiol.*, 21(1), 1-13.
41. Kopchak, N., Lisovska, T., Pokotylo, O., Vichko, O., 2021. Biochemistry Structural biochemistry.
42. 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.
43. Kritas, S. K., 2018. Probiotics and prebiotics for the health of pigs and horses. In *Probiotics and prebiotics in animal health and food safety*. Springer INdAM Ser. 109-126.
44. Lacey, J. A., Stanley, D., Keyburn, A. L., Ford, M., Chen, H., Johanesen, P., Moore, R. J. 2018. *Clostridium perfringens*-mediated necrotic enteritis is not

- influenced by the pre-existing microbiota but is promoted by large changes in the post-challenge microbiota. *Vet. Microbiol.*, 227, 119-126.
45. Leung, J. M., Graham, A. L., & Knowles, S. C. 2018. Parasite-microbiota interactions with the vertebrate gut: synthesis through an ecological lens. *Front. Microbiol.*, 9, 843.
  46. Leylabadlo, H.E., Ghotaslou, R., Feizabadi, M.M., Farajnia, S., Moaddab, S. Y., Ganbarov, K., Kafil, H.S., 2020. The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microb. Pathog.* 149.
  47. Lindenberg, F., Krych, L., Kot, W., Fielden, J., Frøkiær, H., vanGalén, G., Nielsen, N.S., Hansen, A.K., 2019. Development of the equine gut microbiota. *Sci. Rep.* 1-7.
  48. Livanos, A. E., Snider, E. J., Whittier, S., Chong, D. H., Wang, T. C., Abrams, J. A., & Freedberg, D. E. 2018. Rapid gastrointestinal loss of clostridial clusters *iv* and *xiva* in the ICU associates with an expansion of gut pathogens. *PLOS One* 13(8)
  49. Mair, T.S., 2017. *The Equine Acute Abdomen.; Colic from Alternative Systems: False Colics.* 3rd Ed. 831-842.
  50. Martínez, C., Quiroz, R.E., Dantán, E., Aguilar, H., Marquéz, C.C., Toledo, H.O., 2022. Concepción integrativa del parasitismo: redefiniendo nuevos conceptos. *Bioagrobiencias*, 15 (2) 48-57.
  51. Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., Rodellar, C., 2001. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza España. 2-9
  52. Meana, A., Rojo, F. A., 2010. 87 Q&A sobre parasitología equina. Editorial Servet
  53. Mehdizadeh, I., Navarro, M.A., Li, J., Shrestha, A., Uzal, F., McClane, B.A., 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, 12 (1) 723-753.
  54. Mehdizadeh, I., Unterer, S., Whitehead, A.E., Prescott, J. F., 2020. NetF-producing *Clostridium perfringens* and its associated diseases in dogs and foals. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 32(2), 230-238.
  55. Midha, A., Schlosser, J., and Hartmann, S., 2017. Reciprocal interactions between nematodes and their microbial environments. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1-15

56. 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 colonisation hypothesis. *Anim Prod Sci*, 60: 2080–2092
57. Nardelli, M., Centrón, D., Cassini, M. H. 2011. Técnicas de muestreo no invasivas aplicadas al estudio genético de mamíferos. *Interciencia*, 36(6), 404-411.
58. Nielsen M.K., Reinemeyer, C.R., 2018. Ivermectin Egg Reappearance. In: Nielsen, M.K, Reinemeyer, C.R., (Eds.) *Handbook of Equine Parasite Control*, 2nd Ed. Wiley-Blackwell. 284pp.
59. Pahalagedara, A.S.N.W., Flint, S., Palmer, J., Brightwell, G., Gupta, T.B., 2020. Antimicrobial production by strictly anaerobic *Clostridium* spp. *int. J. Antimicrob. Agents*, 55(5).
60. Peachey, L.E., Jenkins, T.P., Cantacessi, C., 2017. This gut ain't big enough for both of us. or is it? Helminth-microbiota interactions in veterinary species. *Trends Parasitol.* 1-12
61. Pérez, E., 2019. La domesticación del caballo (*Equus ferus caballus*). Universidad de Alicante. 11-23.
62. Persson, S., Torpdahl, M., Olsen, K. E. P. 2008. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(11), 1057–1064.
63. Plaza, J., 2018. Pronóstico del síndrome del cólico equino. Universidad de Zaragoza.
64. Quercia, S., Freccero, F., Castagnetti, C., Soverini, M., Turrone, S., Biagi, E., Rampelli, S., Lanci, A., Mariella, J., Chinellato, E., Brigidi, P., Candela, M., 2018. Early colonisation and temporal dynamics of the gut microbial ecosystem in Standardbred foal. *Equine Vet. J.* 2-12
65. Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., Louis, P. 2008. Effect of inulin on the human gut microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.*, 101(4), 541-550.
66. Requena, T., Velasco, M. 2021. The human microbiome in sickness and in health. *Revista Clínica Española*, 221(4), pp. 233-240.
67. Roos, M.H., Pawlina, W., 2007. *Histología: Texto y atlas a color con biología celular y molecular*. 5a edición. Médica panamericana S.A. 579-600



68. Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I. 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1), 1-14.
69. Rosillo de alba, A., Cequier, A., Romero, A., 2020. Equine microbiome. Facultad de veterinaria, Universidad de Zaragoza. 11-34.
70. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A., 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Immunol.*, 10, 490-500.
71. Sauermann, C.W., Nielsen, M.K., Luo, D., Leathwick, D.M., 2019. Modelling the development of anthelmintic resistance in cyathostomin parasites: the importance of genetic and fitness parameters. *Vet. Parasitol.* 269, 28-33.
72. Schoster, A., Kunz, T., Lauper, M., Graubner, C., Schmitt, S., Weese, J. S., 2019. Prevalence of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in Swiss horses with and without gastrointestinal disease and microbiota composition in relation to *Clostridium difficile* shedding. *Vet. Microbiol.*, 239, 108433.
73. Schwab C, Gänzle M., 2011. Comparative analysis of fecal microbiota and intestinal microbial metabolic activity in captive polar bears. *Can J Microbiol.* 57(3):177-85
74. Shaw, S.D., Stämpfli, H., 2018. Diagnosis and treatment of undifferentiated and infectious acute diarrhea in the adult horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 34(1), 39-53.
75. Sommer, F., Anderson, J., Bharti, R., Raes, J., Rosenstiel, P. 2017. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature*, 15(10), pp. 630-638.
76. Sonnenburg, J.L., Chen, C.T.L., Gordon, J.I., 2006. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol.* 4, e413.
77. Stewart A.S., Pratt-Phillips S., González L.M., 2017. Alterations in intestinal permeability: the role of the “leaky gut” in health and disease. *J Equine Vet Sci*; 52:10-22.
78. Stewart, H.L., Pitta, D., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Engiles, J. B., Southwood, L.L. 2018. Characterization of the fecal microbiota of healthy horses. *Am. J. Vet. Res.*, 79(8).
79. Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K.P., Holscher, H.D., Azad, M.B., Delzenne, N.M., Sanders, M. E. 2020. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)

- consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 17(11), 687-701.
80. Tettamanti Boshier, F. A., Srinivasan, S., Lopez, A., Hoffman, N. G., Prohl, 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,
  81. Theelen, M.J., Luiken, R.E., Wagenaar, J.A., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., Rossen, J.W., Zomer, A. L. 2021. The equine faecal microbiota of healthy horses and ponies in the Netherlands: Impact of host and environmental factors. *Animals*, 11(6).
  82. Tunay ,C.S.,2018. Evaluación del efecto antiparasitario de la tintura a base de apazote (*Chenopodium ambrosioides*), semilla de ayote (*Cucurbita argyrosperma*) y flor de muerto (*Tagetes erecta*) versus ivermectina al 1% administradas por vía oral en equinos. Universidad San Carlos de Guatemala.14-16
  83. Van, D., Vervaecke, H.,2018. Social behavior and welfare in horses (*Equus caballus*). odisee university of applied sciences.
  84. Vercruysse ,J., Charlier, J., Van Dijk ,J., Morgan, E.R., Geary ,T, von Samson-Himmelstjerna, G., Claerebout ,E., 2018. Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology* 145:1655–1664.
  85. Waits,L.P., Paetkau,D.,2005Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection. *J. Wildl. Manage.*69 (4):1419-1433
  86. 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. Parasites Wildl.* 49, 489–500.
  87. Walshe, N., Mulcahy, G., Hodgkinson, J.,Peachey, L.2020. No Worm is an island; the influence of commensal gut microbiota on cyathostomin infections. *Animals*, 10 Warzecha, C.M., Coverdale, J.A., Janecka, J.E., Leatherwood, J.L., Pinchak, W.E., Wickersham, T.A., MacCann, J.C., 2017. Influence of short-term dietary starch inclusion on the equine cecal microbiome. *Anim. Sci. J.* 95.
  88. Watson, R., 2019. Probiotics, prebiotics and faecal microbial transplant. *Equine Health*, 2019(48), 31-32.

89. Weese, J. S., Holcombe, S. J., Embertson, R. M., Kurtz, K. A., Roessner, H. A., Jalali, M., Wismer, S. E. 2015. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post-partum colic. *Equine Vet Educ.* 47(6), 641–649.
90. Willemsen, L.E. M., Koetsier, M.A., Van Deventer, S.J.H., Van Tol, E.A.F., 2003. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. *Gut*, 52, 1442-1447.
91. Wing, K., Sakaguchi, S., 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self-tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 11, 7-13.
92. Zhang, X. F., Guan, X. X., Tang, Y. J., Sun, J. F., Wang, X. K., Wang, W. D., Fan, J. M., 2021. Clinical effects and gut microbiota changes of using probiotics, prebiotics or synbiotics in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* 60(5), 2855-2875.
93. Zommiti, M., Chikindas, M. L., Ferchichi, M. 2020. Probiotics live biotherapeutics: a story of success, limitations, and future prospects not only for humans. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 12(3), 1266-1289.

## Anexos

### 1. Glosario

**Resistencia:** Ante un intento de alteración, la composición de los microorganismos no será afectada (Sommer *et al.*, 2017; Requena y Velasco, 2021).

**Resiliencia:** Es la facultad de un organismo para acoplarse a situaciones hostiles (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2022) dicho de otra forma, ante una alteración la microbiota cambiará en composición, pero este cambio no afectará a los grupos con funciones metabólicas importantes (Sommer *et al.*, 2017; Requena y Velasco, 2021).

**Competitividad:** “rivalidad” para lograr conseguir un fin, en este caso podemos verlo al momento de competir por nutrientes, establecimiento en el epitelio o por cumplir funciones metabólicas.

**Mutualismo:** conjunto de especies que buscan un beneficio en común, pero su relación no es imprescindible para el funcionamiento.

**Redundancia:** El impacto de la alteración es tan fuerte que cambia la composición de la microbiota y nunca regresa a su composición original; sin embargo, este cambio no altera funciones metabólicas (Sommer *et al.*, 2017; Requena y Velasco, 2021).

**Disbiosis:** La alteración logra cambiar la composición de la microbiota y alterar funciones metabólicas importantes para el holobionte (Sommer *et al.*, 2017; Requena y Velasco, 2021).

## **2. Protocolo de extracción de ADN ZymoBIOMICS DNA Miniprep de la marca ZYMO RESEARCH**

Se colocan 400  $\mu$ L de la muestra de heces con DNA/RNA Shield® en ZR BashingBed Lysis Tube y agregar 750  $\mu$ L de BashingBeadBuffer. Se lleva al Disruptor Genie durante 20 min. Se centrifuga a 10,000 g por 2 min, posteriormente se toman 800  $\mu$ L de sobrenadante y se coloca en Zymo-Spin III-F-Filter y centrifugar a 8,000 g por 1 min. Colocar 1200  $\mu$ L de Genomic Lysis Buffer y homogeneizar gentilmente. Colocar 800  $\mu$ L en Zymo-Spin IICR Column, centrifugar a 10,000 g por 1 min, descartar lo filtrado. Repetir este paso 3 veces. Posteriormente, se agregan 200  $\mu$ L de DNA Pre-Wash Buffer a Zymo-Spin IICR Column y centrifugar a 10,000 g por 1 min, descartar el filtrado. Agregar 500  $\mu$ L de g-DNA Wash Buffer a Zymo-Spin IICR Column y centrifugar a 10,000 g por 1 min. Descartar el filtrado. Pasar la columna del Zymo-Spin IICR Column a un tubo ependorff y agregar 45  $\mu$ L de DNA Elution Buffer. Centrifugar a 10,000 g por 1 min y repetir el paso. El ADN obtenido se cuantificó y se almacenó a -80 °C.

### 3. Función de los reactivos del kit de extracción de ADN ZymoBIOMICS DNA Miniprep de la marca ZYMO RESEARCH

Reactivo	Función
Bashing Bead Buffer (Amortiguador de lavado de perlas)	Realiza la lisis de células bacterianas para liberar el material genético
Buffer Genomic Lysis (Amortiguador de lisis genómica)	Realiza la lisis de células, sangre etcétera y degrada el ARN
Pre-Wash Buffer (Amortiguador de pre lavado)	Elimina proteínas
g-DNA buffer Wash (Amortiguador de lavado de G-ADN)	Lava la columna de los tubos del kit para eliminar sales y contaminantes antes de terminar la extracción del ADN.
DNA Elution (Elución de ADN)	Despega el ADN de la membrana de la columna del tubo para que pueda atravesar mientras se centrifuga

### 4. Protocolo de extracción de ADN con el kit QIAamp PowerFecal de Qiagen

Pesar 0.25 g (250 mg) de la muestra de heces, agregar 750  $\mu$ L de power bead y 60  $\mu$ L C1(homogeneizar). Incubar a 65 °C por 10 min, colocar los tubos en el vortex horizontal a 13000-V1-24 por 10 min, posteriormente centrifugar a 13,000 g por 1 min. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2 ml (recuperar lo más cercano a 500  $\mu$ L) y añadir 250  $\mu$ L de solución C2, incubar de 2-8 °C por 5 min. Pasando ese tiempo centrifugar tubos a 13,000g por 1 min, transferir más de 600  $\mu$ L de sobrenadante y ponerlo en un tubo de 2 ml, teniendo cuidado de no tocar el pellet. Agregar 200 ml de solución C3 e incubar a 2-8 °C por 5 min. Centrifugar a 13,000 g por 1 min. Recuperar sobrenadante en un tubo de 2 ml, cuidando de no transferir más de 750  $\mu$ L y evitando tocar el pellet, añadir 1200  $\mu$ L de solución C4 al sobrenadante. Tomar 650  $\mu$ L del sobrenadante, colocarlo en el MB SPIN COLUMN y centrifugar 13,000 g por 1 min, Hacerlo 3 veces y cada vez colocar 650  $\mu$ L del líquido, desechar los sobrenadantes. Añadir 500  $\mu$ L de solución C5 y centrifugar otra vez por 1 min a 13,000 g. Decantar y centrifugar 1 minuto 13,000 g. Pasar el MBS COLUMN a un tubo de 2 ml y añadirle 100  $\mu$ L de C6 al centro de la membrana del filtro, para finalizar centrifugar 13,000 g 1 minuto.

## 5. Función de los reactivos del kit de extracción de ADN QIAamp PowerFecal de Qiagen

Reactivo	Función
Power Bead Buffer (Amortiguador de perlas de poder)	Separa contaminantes de la muestra.
C1	Realiza lisis celular y contiene un detergente capaz de descomponer los ácidos grasos y lípidos de la membrana celular.
C2	Precipita todo material orgánico e inorgánico como: polisacáridos, restos celulares y proteínas.
C3	Precipita todo material orgánico e inorgánico como: polisacáridos, restos celulares y proteínas.
C4	Solución salina de alta concentración.
C5	Limpia el ADN de la solución salina y contaminantes, además ayuda a que el ADN se mantenga adherido a las membranas de las columnas de los tubos del kit.
C6	Libera el ADN que se encuentra adherido a la membrana de los tubos de extracción del kit

## 6. Recomendaciones para realizar PCR

La PCR es una técnica altamente sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado se amplifique y obtengamos un resultado que no es real. Se recomienda lo siguiente:

- Tener un lugar físico exclusivo para realizar PCR
- Limpiar el área de trabajo con cloro 10%, hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N o etanol 70%
- Descongelar todos los reactivos y ADN en hielo
- Contar con instrumental y material exclusivo para PCR
- Contar con reactivos y tubos estériles
- Utilizar guantes
- Contar con un control blanco (en lugar de ADN se añade agua, no debe amplificar)