



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

EXPRESION DE MIRNA DURANTE EL DESARROLLO DEL TUBO DIGESTIVO  
EN BECERROS Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA Y LA INMUNIDAD

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

CAROLINA ROBLES RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA OFELIA MORA IZAGUIRRE  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR

DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. CARLA DANIELA ROBLES ESPINOZA  
LABORATORIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL GENOMA  
HUMANO, LIIGH

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

**"Con gratitud y amor inquebrantable, dedico este logro a mis queridos padres y a mi apreciado hermano. Su constante apoyo, sabiduría y cariño han sido la brújula que guió mis pasos en este viaje académico. Cada desafío superado y cada logro alcanzado son también suyos, pues su aliento incondicional ha sido mi combustible. En cada página de esta tesis reside un pedacito de ustedes, y en cada logro que la vida me depare, su influencia perdurará. Gracias por ser mi inspiración y mi roca en este camino. Con amor eterno,  
Carolina Robles Rodríguez"**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Mi gratitud va especialmente dirigida a mi asesora la Dra Ofelia Mora, cuya orientación experta y apoyo constante fueron fundamentales en cada etapa de esta investigación, y al Dr Armando Shimada por su apoyo a lo largo de este proceso.

Este logro no habría sido posible sin el amor y el apoyo inquebrantable de mi familia. A mis padres, Roberto y Zulema les debo mi profundo agradecimiento por su sacrificio, paciencia y confianza en mí a lo largo de este camino. Mi hermano Gerson también merece un reconocimiento especial por su ánimo constante y palabras de aliento en los momentos más desafiantes. A Diego Cardoso por todo el apoyo y el amor brindado durante este proceso y por formar parte importante de mi vida.

Quiero extender mi más sincero agradecimiento a María Laura González Dávalos quien con su experiencia y conocimientos ha estado detrás de cada experimento realizado y de cada resultado logrado, gracias por estar siempre al pie del cañón con y por todos nosotros, los estudiantes.

Quiero agradecer a Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica, a Carlos Lozano Flores, a Bárbara Moguel por su valiosa asistencia a lo largo de estos años de formación, sus comentarios y sugerencias fueron esenciales para perfeccionar esta investigación.

Este proyecto fue financiado en por PAPIIT (IN211518)-UNAM y gracias a CONAHCYT por la beca otorgada, agradezco su respaldo, ya que su apoyo hizo posible llevar a cabo esta investigación. A Luis Aguilar Bautista, Alejandro de León Cuevas, Alejandro Ávalos Fernández, Jair García del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS), y al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) por el apoyo.

Mis compañeros de laboratorio merecen mi reconocimiento por ser una fuente de inspiración y motivación, sus discusiones y debates enriquecieron mis ideas y me

ayudaron a crecer académicamente. Mis amigos merecen un agradecimiento especial por su apoyo emocional y momentos de distracción que aliviaron la tensión durante la elaboración de esta tesis, sus risas y amistad hicieron que este viaje fuera más llevadero.

## RESUMEN

La producción de ganado bovino en el trópico mexicano es vital ya que en este se produce gran parte de los becerros que se utilizarán para la producción de carne y leche, sin embargo la mortalidad de neonatos por trastornos digestivos como la diarrea, los cambios dietéticos y fármacos, afecta la salud y la rentabilidad de las unidades de producción. La microbiota intestinal, adquirida al nacer de la madre y del ambiente, desempeña un papel crucial en el desarrollo inmunológico y metabólico del neonato. El equilibrio entre microbiota, dieta y respuesta inmunológica es vital para la salud gastrointestinal. Los microARNs (miARNs) emergen como actores en las interacciones huésped-microbio, mostrando correlaciones entre su expresión y la población microbiana en las primeras etapas de vida de los becerros. Con el objetivo de determinar la relación entre los niveles de expresión de miRNA con los mRNA blanco y la microbiota en rumen y yeyuno de animales pre-rumiantes durante su transición a rumiantes podremos determinar el efecto de estos sobre el desarrollo e inmunidad en dichos órganos. Para esto se utilizaron 12 becerros de edades de 0, 7, 28 y 42 días de edad. Se recolectaron muestras de contenido y tejido de rumen y yeyuno, los cuales se utilizaron para la extracción de DNA para conocer el microbioma y de RNA para determinar los miRNA presentes así como sus RNAm blanco. Además por qPCR se analizaron la expresión de TLR, genes relacionados con la inmunidad. Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias temporales y regionales en el microbioma, expresión de TLR, miRNA y mRNA, que se complementan para establecer el sistema inmunológico de los becerros. Se identificaron cambios en las poblaciones bacterianas según la edad y la alimentación. En el rumen, prevalecen Bacteroidetes por dieta basada en leche y concentrado, mientras que en el yeyuno, abundan Firmicutes, indicando una colonización saludable. Los TLR se activan desde el nacimiento, adaptando su expresión con la microbiota para evitar respuestas inapropiadas a los comensales y monitorear cambios que puedan causar disbiosis. Los miRNA desempeñan un papel clave en diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo inmune desde el nacimiento hasta el día 42. Se resalta la importancia del poco estudiado mir-3431 en la respuesta inmune. Los análisis de

miRNA y mRNA en yeyuno muestran genes relacionados con la respuesta inmunológica, esencial para mantener la homeostasis y prevenir enfermedades como diarreas. El estudio destaca la asociación de bacterias en rumen y su impacto en la fermentación, activando miRNA y TLR que desencadenan respuestas inmunitarias. En yeyuno, se observa una mayor expresión de TLR y una regulación con el microbioma, mejorando la barrera epitelial y eficiencia alimenticia. Aunque se necesita más comprensión de las interacciones miRNA/mRNA-TLR-microbioma, se revela la función moduladora de los miARN en procesos biológicos y metabólicos que aseguran una inmunidad adecuada en la transición de becerros a rumiantes.

## SUMMARY

The production of bovine cattle in the Mexican tropics is vital since a large part of the calves that will be used for the production of meat and milk is produced here, however, the mortality of newborns due to digestive disorders such as diarrhea, dietary changes and drugs, affects the health and profitability of production units. The intestinal microbiota, acquired at birth from the mother and the environment, plays a crucial role in the immunological and metabolic development of the neonate. The balance between microbiota, diet, and immune response is vital for gastrointestinal health. MicroRNAs (miRNAs) emerge as actors in host-microbe interactions, showing correlations between their expression and the microbial population in the early stages of calf life. To determine the relationship between the expression levels of miRNA with the target mRNA and the microbiota in the rumen and jejunum of pre-ruminant animals during their transition to ruminants, we can determine the effect of these on development and immunity in said organs. For this, 12 calves of ages 0, 7, 28, and 42 days of age were used. Samples of rumen and jejunum content and tissue were collected, which were used for the extraction of DNA to know the microbiome and RNA to determine the miRNA present as well as their target RNAm. In addition, the expression of TLR, genes related to immunity, was analyzed by qPCR. The results obtained showed temporal and regional differences in the microbiome, and expression of TLR, miRNA, and mRNA, which complement each other to establish the immune system of the calves. Changes in bacterial populations according to age and diet were identified. In the rumen, Bacteroidetes prevailed by diet based on milk and concentrate, while in the jejunum, Firmicutes abounded, indicating a healthy colonization. TLRs are activated from birth, adapting their expression with the microbiota to avoid inappropriate responses to commensals and monitor changes that can cause dysbiosis. miRNAs play a key role in various biological processes, including immune development from birth to day 42. The importance of the little-studied mir-3431 in the immune response is highlighted. The miRNA and mRNA analyses in the jejunum show genes related to the immune response, essential to maintain homeostasis and prevent diseases such as diarrhea. The study highlights the association of bacteria in the rumen and its



impact on fermentation, activating miRNA and TLR that trigger immune responses. In the jejunum, a greater expression of TLR and a regulation with the microbiome are observed, improving the epithelial barrier and feeding efficiency. Although more understanding of miRNA/mRNA-TLR-microbiome interactions is needed, the modulatory role of miRNAs in biological and metabolic processes that ensure adequate immunity in the transition from calves to ruminants is revealed.

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES .....	3
<b>Sistemas producción tropical: doble propósito .....</b>	<b>3</b>
Biogénesis de los miRNA .....	10
Relación Hospedador/ microbiota.....	14
MicroRNA e inmunidad en becerros.....	15
JUSTIFICACIÓN .....	21
HIPÓTESIS .....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Animales y toma de muestras .....	23
Toma de muestras .....	23
Extracción de DNA.....	24
Extracción de RNA.....	25
PCR en tiempo real (qPCR).....	25
Análisis de abundancia relativa de las bacterias que habitan el rumen y el yeyuno .....	26
Análisis miRNA.....	27
Análisis de mRNA .....	28
Identificación de genes expresados diferencialmente (DE) .....	29
Análisis estadístico .....	29
Resultados y Discusión.....	30
Diversidad microbiana.....	30
Diversidad alfa .....	30
Abundancia de especies bacterianas encontradas en rumen y yeyuno.....	33
Expresión de mRNA en yeyuno.....	72
Relación miRNA-microbiota-TLR.....	83
CONCLUSIONES.....	92
LITERATURA CITADA .....	95
Anexos .....	113

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> El procesamiento de los miRNAs.....	13
<b>Figura 2.</b> Diversidad alfa de las especies que se encuentran en rumen y yeyuno de becerros a los 0, 7, 28 y 42 días de edad en trópico mexicano. ....	31
<b>Figura 3.</b> Abundancia relativa de los filos en A) rumen y B) yeyuno en becerros de 0, 7, 28, 42 días de edad del trópico mexicano. ....	34
<b>Figura 4.</b> Cambios en el tiempo de la abundancia relativa de los filos más representativos que habitan el rumen, en becerros de 0, 7, 28, 42 días de nacidos en el trópico mexicano.....	35
<b>Figura 5.</b> Cambios en el tiempo de la abundancia relativa de los filos más representativos que habitan yeyuno en becerros de 0, 7, 28, 42 días de nacidos en el trópico mexicano. ....	37
<b>Figura 6.</b> OTU compartidas entre diferentes grupos. Gráfico de Venn que muestra las OTU compartidas y únicas que se encuentran en cada grupo trazado. A) OTU compartidas en la muestra de rumen. B) OTU compartidas en la muestra de yeyuno. ....	41
<b>Figura 7.</b> Expresión de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10, PGLYRP1 en rumen y yeyuno en becerros de 0, 7, 28, 42 días de edad del trópico mexicano. A) Expresión relativa de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10, PGLYRP1 en rumen. B) Expresión relativa de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10, PGLYRP1 en yeyuno..	44
<b>Figura 8.</b> Gráfico de volcán de resultados de expresión diferencial de miRNA en el rumen... ..	50
<b>Figura 9.</b> Gráfico de volcán de resultados de expresión diferencial de miRNA en el yeyuno. A) expresión diferencial entre los animales en el día 0 y el día 7. B) expresión diferencial entre los animales en el día 7 y el día 28. C) expresión diferencial entre los animales de nacidos en el día 28 y el día 42. ....	51
<b>Figura 10.</b> Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 0 al día 7 postnatal en rumen. a) Top 20 de los procesos biológicos enriquecidos del día 0 al día 7 en rumen. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 0 al día 7 en rumen. c) Top 20 de las funciones moleculares enriquecidas del día 0 al día 7 en rumen. ....	58
<b>Figura 11.</b> Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 7 al día 28 postnatal en rumen. a) Top 20 de los procesos biológicos enriquecidos del día 7 al día 28 posnatal en rumen. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 7 al día 28 posnatal en rumen. c) Top 20 de las funciones moleculares enriquecidas del día 7 al día 28 posnatal en rumen. ....	61
<b>Figura 12.</b> Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 28 al día 42 postnatal en rumen. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en rumen. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en rumen. c) Funciones moleculares enriquecidas del día 28 al día 42 posnatal en rumen. ....	63
<b>Figura 13.</b> Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 0 al día 7 postnatal en jejunio. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 0 al día 7	

posnatal en yeyuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 0 al día 7 posnatal en yeyuno. c) Funciones moleculares enriquecidas del día 0 al día 7 posnatal en yeyuno.....	65
<b>Figura 14</b> .....	68
<b>Figura 15.</b> Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. c) Top 20 de las Funciones moleculares enriquecidas del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. ....	70
<b>Figura 16.</b> a) Analisis de componentes principales (PCA) entre las muestras del día 7 y el día 42. b) Heatmap plot de la abundancia relativa entre muestras de los genes DE. ....	72
<b>Figura 17.</b> Términos de ontología génica (GO) enriquecidos a partir de RNAm en becerros nacidos en el trópico del día 7 al día 42 posnatal en yeyuno. a) Top 20 de los Procesos biológicos enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. c) Top 20 de las Funciones moleculares enriquecidas del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno.....	74
<b>Figura 18.</b> MicroRNA en el yeyuno. A) miRNA diferencialmente y sus genes blanco expresados en yeyuno de becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano. B) bta-mir-3431 y sus genes blanco expresados en becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano. Los puntos resaltados en verde corresponden a lo genes relacionados con la respuesta inmune.....	81
<b>Figura 19</b> .....	84
<b>Figura 20</b> .....	88

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Oligonucleótidos utilizados para la identificación de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10 y PGLYRP1 por qPCR en rumen y yeyuno de becerros. ....	26
<b>Cuadro 2.</b> miRNA expresados diferencialmente entre el día 0 y el día 7 en rumen.....	57
<b>Cuadro 3.</b> Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 0 al día 7 en rumen.....	59
<b>Cuadro 4.</b> miRNA expresados diferencialmente entre el día 7 y el día 28 en rumen.....	60
<b>Cuadro 5.</b> Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 7 al día 28 en rumen.....	62
<b>Cuadro 6.</b> miRNA expresados diferencialmente en rumen entre el día 28 y el día 42 en rumen .....	62
<b>Cuadro 7.</b> Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 28 al día 42 en rumen.....	64
<b>Cuadro 8.</b> miRNA expresados diferencialmente entre el día 0 y el día 7 en yeyuno.....	64
<b>Cuadro 9.</b> Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 0 al día 7 en yeyuno.....	66
<b>Cuadro 10.</b> miRNA expresados diferencialmente entre el día 7 y el día 28 en yeyuno.....	67
<b>Cuadro 11.</b> Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 7 al día 28 .....	69
<b>Cuadro 12.</b> miRNA expresados diferencialmente entre el día 28 y el día 42 .....	69
<b>Cuadro 13.</b> Genes implicados en Vías KEGG de interés del día 28 al día 42 para yeyuno .....	71
<b>Cuadro 14.</b> Top 20 de las Vías KEGG enriquecidas de los mRNA en yeyuno del día 7 al día 42.....	75
<b>Cuadro 15.</b> Top 30 de las Vías KEGG enriquecidas para respuesta inmune en yeyuno .....	76
<b>Cuadro 16.</b> Top 20 de los genes implicados en la vía de respuesta inmune. ....	77

## INTRODUCCIÓN

La producción de ganado bovino se desarrolla bajo diferentes contextos agroclimáticos, tecnológicos y de manejo. Los sistemas para producción de carne que destacan son el intensivo en corrales de engorda que representa 21.5% y el extensivo (praderas y agostaderos) que representa 78.5% (Jaramillo *et al.*, 2018).

El trópico de México representa el 26% del territorio nacional y su importancia radica en el aprovechamiento de producción de forrajes en forma natural, estas áreas juegan un papel importante en la producción de carne y leche (Magaña *et al.*, 2006). Existen más de 500 mil unidades de producción en la región tropical, donde se ubica cerca del 60% del pie de cría del país; sin embargo, la productividad de los hatos está por debajo del 50% de su capacidad por diversos factores tanto climáticos como de manejo zootécnico y la eficiencia reproductiva sigue siendo limitada (REDGATRO, 2018).

Uno de los desafíos principales que enfrentan las unidades de producción en esta región es la mortalidad de los animales neonatos asociadas a trastornos del tubo digestivo (disbiosis de la microbiota), la cual cobra relevancia por la alta incidencia e impacto económico que estas tienen en las unidades de producción (Pardo *et al.*, 2012; Cadavid *et al.*, 2014; Margueritte *et al.*, 2005).

La manifestación clínica más evidente de enfermedad del tubo digestivo es la diarrea. Las causas más comunes de diarrea son: 1) infecciosas (bacterias, virus, hongos, parásitos), 2) nutricionales (cambio de alimentación, uso de sustitutos o fórmulas lácteas comerciales), 3) uso de fármacos, entre otras. Los costos asociados a la diarrea incluyen no solo la mortalidad de los animales, sino también mermas en el rendimiento (ganancia diaria de peso y eficiencia alimenticia de los animales), así como los costos del tratamiento, pérdida de animales genéticamente valiosos, entre otros.

El nacimiento expone al recién nacido a la microbiota vaginal de la madre y al ambiente, iniciando la colonización bacteriana del tubo gastrointestinal (Klein *et al.*, 2019). La microbiota intestinal tiene un efecto importante en la maduración y adaptación del sistema inmune innato durante el desarrollo temprano, además,

tiene importantes efectos metabólicos y nutricionales, una microbiota intestinal equilibrada constituye una barrera eficaz contra la colonización de patógenos; para mantener la homeostasis y por lo tanto, en la salud del sistema gastrointestinal debe haber un equilibrio entre el microbioma presente, la dieta y la respuesta inmune, así como las secreciones de la mucosa intestinal (Reis de Souza, 2010; Pejenaute *et al.*, 2018).

Estudios recientes muestran que los microRNA (miRNA) están involucrados en las interacciones hospedero-microbio (Dalmasso *et al.*, 2011).

Se han observado cambios temporales y regionales en la expresión de los miRNA, así como una correlación entre la expresión de estos y la población microbiana del tubo digestivo en las primeras etapas de vida en becerros (Liang *et al.*, 2014).

Si bien la función de los miRNAs en la respuesta del huésped a las bacterias es cada vez más reconocida, es necesario profundizar en este tipo interacciones, de tal forma que en futuro podamos contar con información a partir de la cual se pueda predecir la respuesta celular de los animales y/o proponer terapias con base en el conocimiento de los mecanismos moleculares de acción.

## ANTECEDENTES

### **Sistemas producción tropical: doble propósito**

En las regiones tropicales de América Latina, el sistema de producción bovina de Doble Propósito (DP) se desarrolla principalmente bajo el esquema de manejo de pastoreo extensivo y es una de las principales actividades productivas del sector agropecuario para la producción de leche y carne (Orantes *et al.*, 2014).

La ganadería de DP se caracteriza por producir carne y leche en áreas tropicales, combinando el ordeño con el amamantamiento de los becerros hasta el destete y generalmente requiere de bajos insumos con escaso uso de tecnología (Torres, 2015) y no corresponde a una raza o a un grupo específico de raza de ganado bovino, sino que está relacionado con los cruces de varias razas (Sánchez, 2018), su alimentación la constituyen los pastos tropicales nativos o inducidos, manejados bajo sistemas de pastoreo rotacional con carga animal; variando de menos de 0.5 a 3.5 unidades animales por hectárea al año, con mínima suplementación durante la época seca, principalmente con subproductos agroindustriales baratos (Magaña *et al.*, 2006).

Las vacas se ordeñan a mano una vez al día, permitiendo que la cría apoye y después se le deja que mame un cuarto completo y/o leche residual, a veces el ordeño de los cuatro cuartos es incompleto. El destete de la cría no siempre coincide con el final de la lactancia, ello depende de la persistencia de la vaca y de algunos criterios del productor considerando el crecimiento del becerro, la época del año y la condición corporal de la vaca (Monforte *et al.*, 2006). La fuente genética es la cruce entre las razas *Bos indicus* x *Bos taurus* (F1) (Cebú x suizo; Cebú x Holandés y Cebú x Simmental, entre otras) (Orantes, 2014). A este modo de producción se le ha considerado un sistema rentable (Pech *et al.*, 2007).

En México, la ganadería de bovinos de DP es un sistema tradicional que aporta al mercado 25% de la leche (Veneces-Pérez *et al.*, 2021); y la producción de carne se basa en la venta del becerro al destete (Nájera *et al.*, 2016; Melendez *et al.*, 2018; Veneces-Pérez *et al.*, 2021). Por la adaptabilidad del sistema de bovinos de DP en las regiones tropicales, es notoria su resistencia a enfermedades (Vilaboa y Díaz 2009; Orantes *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2012; Román *et al.*, 2013). Es por esto



que en las zonas tropicales se ha trabajado con nuevos tipos de cruza de bovinos en la búsqueda de mejores índices de desarrollo en las crías, mejor eficiencia productiva, reproductiva y mayor rusticidad dentro del sistema de ganado de DP (Orantes *et al.*, 2014).

Ante un mercado demandante de carne y lácteos es necesario poder seleccionar genéticamente a los animales productivos (Bilbao *et al.*, 2013), para lograr este objetivo se necesita disminuir la mortalidad.

Entre las causas de mortalidad neonatal, las atribuibles a agentes infecciosos y parasitarios son las de mayor importancia originando, principalmente, procesos diarreicos, respiratorios y septicémicos, constituyendo las diarreas el grupo más importante, dada su repercusión económica, no sólo por las altas tasas de mortalidad, sino también debido al retraso en el crecimiento de los animales, los costos en medicamentos y los gastos derivados de la atención veterinaria y horas de trabajo (Tepan, 2011; Fernández *et al.*, 2007). Los porcentajes de mortalidad en la etapa de cría pueden variar entre un 1 y un 50%, y las diarreas neonatales de los becerros representan entre un 40 y un 70% de la causa de dichas muertes (Bilbao *et al.*, 2013).

La diarrea neonatal bovina es un síndrome clínico que se presenta en becerros dentro de sus primeras semanas de vida, es decir, durante su período neonatal, también la han denominado diarrea neonatal indiferenciada bovina por la gran cantidad de enteropatógenos que pueden estar involucrados en su presentación (Pardo *et al.*, 2012). El neonato diarreico es la mayor fuente de contaminación ambiental en la unidad de producción, con el inicio del problema de diarrea, el nivel de agentes infecciosos puede incrementar rápidamente llevando a un marcado incremento en la morbilidad (Pardo *et al.*, 2012).

En México la mortalidad por diarrea representa entre el 2 y 3% en explotaciones bovinas (Roman-Ponce *et al.*, 2009). Se ha reportado que el 23% de los becerros reciben un tratamiento para la diarrea (Windeyer *et al.*, 2014) y se ha estimado que el costo anual por problemas de diarrea es de \$700MXN por animal, esto sumando tratamientos, mortalidad, crecimiento reducido y efectos futuros sobre la productividad (Roche *et al.*, 2020). Rocha *et al.*, (2019), realizaron un análisis del

impacto económico sobre la mortalidad y morbilidad en las diarreas en 510 becerros Holstein de un hato ubicado en Coahuila, México, durante los meses de febrero a abril, este estudio reveló que la diarrea y neumonía afectan la salud de los becerros lactantes, lo que generó pérdidas económicas por mortalidad y tratamiento de \$ 242,000.00 durante el periodo en estudio, además en este estudio se detectó un 40.4% y 8.4% de prevalencia de crías con evento de diarrea y diarrea más neumonía, respectivamente.

Los tipos de diarreas más frecuentes en los sistemas de crianza artificial de becerros pueden ser de origen nutricional o infeccioso (Bilbao *et al.*, 2013). La diarrea infecciosa se origina por agentes virales, parasitarios o bacterianos. Generalmente, la presencia de estos agentes es simultánea y genera infecciones mixtas. Entre los agentes bacterianos se encuentran *Escherichia coli* y *Salmonella* como los más importantes, dentro de los virales se pueden considerar Rotavirus y Coronavirus y entre los agentes parasitarios se encuentran los coccidios y *Cryptosporidium* (Bilbao *et al.*, 2013; Pardo *et al.*, 2012; Tepan, 2011).

El principal agente infeccioso implicado es *E. coli*, que se adhiere a los enterocitos en los primeros días de vida y por la acción de sus toxinas provoca mayor secreción intestinal, excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y finalmente la muerte del animal (Tepan, 2011).

Los mecanismos de defensa en el bovino recién nacido no están completamente desarrollados, aunado a la condición de inmunosupresión promovida por niveles elevados de esteroides involucrados en el proceso del parto, hacen al becerro altamente susceptible a un amplio espectro de patógenos, lo que provoca que la morbilidad y mortalidad sean muy elevadas en esta etapa inicial (Olguin, 2019).

Debido a la placenta cotiledonaria de los rumiantes, el paso de inmunoglobulinas de la sangre materna hacia el feto está completamente impedido, por lo que el recién nacido es generalmente agammaglobulinémico al parto. La concentración de hidrocorticoides aumenta en forma abrupta en el feto inmediatamente antes del parto, y las concentraciones elevadas de esta hormona puede deprimir marcadamente la respuesta inmune celular (Beltrán, 2011).

Adicionalmente, el elevado pH gástrico, permite el libre paso de agentes microbianos, y debido a que la absorción intestinal durante las primeras horas está caracterizada por un paso abundante no selectivo de macromoléculas y transporte a través del intestino delgado, la entrada de virus y bacterias es muy probable que ocurra. La inmunoglobulina principal del calostro es la IgG, pero existen también cantidades importantes de IgM e IgA. Después de la ingestión por el recién nacido, una cantidad importante de estas Ig pasa a través de las células epiteliales del intestino delgado durante las primeras horas de vida y llega a la sangre por vía linfática. Dentro de las IgG hay dos isotipos (IgG1 e IgG2), las cuales actúan conjuntamente para proporcionar al ternero una inmunidad pasiva, hasta que su propia inmunidad activa haya madurado lo suficiente; la mayoría de las IgG del calostro bovino son IgG1 (Silva *et al.*, 2022).

Por estas razones la ingestión de calostro inmediatamente después del nacimiento es de extrema importancia para el recién nacido, por constituir su primera y única fuente de protección inmunológica. La vaca desarrolla inmunidad sistémica basada en inmunoglobulinas de tipo IgG1, IgG2 e IgM circulantes, e inmunidad local en las mucosas basada principalmente en IgA secretora (IgAs) (Beltrán, 2011; Olguin, 2019).

Aproximadamente seis semanas antes del parto ocurre un transporte selectivo de IgG1 del plasma de la vaca, así como de otras sustancias a través de las células epiteliales de los acinis de la ubre, el transporte y síntesis se incrementa de dos a tres semanas antes del parto y disminuye inmediatamente después de que este ocurre (Olguin, 2019).

La IgG1 constituye el 80% del total, IgG2 representa el 7%, IgA alcanza el 8% y la IgM solamente el 5% del total. El origen de las inmunoglobulinas es diverso, la mayor cantidad de IgG es transferida desde el suero sanguíneo materno; sin embargo, en el caso de la IgA, el 60% se sintetiza localmente, mientras que las IgM provienen del suero materno y de la glándula mamaria. Es importante recordar que las Ig son solo una parte del sistema inmune del becerro, una buena alimentación, mínimo estrés y un ambiente limpio ayudan a mantener becerros sanos (Beltrán, 2011).

Los becerros antes de nacer están predominantemente protegidos por el sistema inmune innato, posteriormente se desarrollará el sistema inmune adaptativo. La inmunidad innata incluye barreras físicas como la piel y mucosas, barreras químicas como el pH, sales biliares, ácidos grasos, lisozima, peroxidasa, transferrina, lactoferrina, espermina, lisina y barreras biológicas como la microbiota normal. Sus componentes son células fagocíticas, neutrófilos y macrófagos, eosinófilos, linfocitos asesinos naturales y citocinas cuyos mecanismos de acción determinan un proceso inflamatorio (Abbas *et al.*, 2022; Chase, 2018). La inmunidad adaptativa activa poblaciones celulares de linfocitos B, linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos, con la finalidad de eliminar a un agente infeccioso de forma específica.

A partir de este concepto se establecen dos tipos de inmunidad adquirida: inmunidad humoral y celular. La inmunidad humoral consiste en la síntesis y secreción de anticuerpos específicos por las células plasmáticas, las cuales se originan en los tejidos linfáticos por diferenciación de linfocitos B activados y llegan a los tejidos por la circulación linfática y sanguínea, estos anticuerpos actúan frente a microorganismos extracelulares y toxinas. La inmunidad celular mediada por linfocitos T participa contra virus, bacterias y parásitos intracelulares, produciendo una respuesta específica, ante una gran variedad de antígenos. En el caso de los rumiantes, los linfocitos T producen mucha más interleucina 12 (IL-12) e interferón (IFN), mostrando un mecanismo para compensar la falta de madurez de su sistema inmune adaptativo durante el período neonatal (Concha, 2007; Taschuk *et al.*, 2012; Chase, 2018).

Cada vez hay más pruebas de que la microbiota del intestino desempeña un papel vital en la regulación de las funciones inmunes del huésped. El establecimiento de una microbiota comensal en el tubo digestivo de los becerros recién nacidos ha mostrado tener efectos positivos sobre el sistema inmune de la mucosa intestinal del bovino, proporcionando la primer barrera de defensa contra más del 90% de bacterias patógenas, además esta microbiota intestinal influye en el desarrollo del sistema inmune de todo el animal (Liang *et al.*, 2014; Chase, 2018).

Las primeras semanas después del nacimiento son esenciales para la inmunidad entérica a largo plazo, así como para la expresión de miRNA del huésped y los miRNA que expresarán la microbiota comensal, y para el establecimiento de sus interacciones (hospedero-microbioma). Para el día 21 de edad, existe una inducción máxima de miRNA del huésped por los altos niveles de microorganismos del microbioma que se han establecido en el tubo digestivo (Chase, 2018).

Se ha visto que los miRNA tienen una función de defensa en la respuesta a las infecciones bacterianas, ya que actúan como desencadenantes de la respuesta inmune mediada por los receptores tipo Toll (TLR) (Eulalio *et al.*, 2012). Durante la infección microbiana, las células del hospedero, reconocen los patógenos invasores, o sus proteínas secretadas, llamadas patrones moleculares asociados a microbios (PAMPs, por sus siglas en inglés Pathogen-associated molecular patterns), son secuencias o partes pequeñas de estructuras o moléculas que se encuentran en grupos de patógenos, por ejemplo la pared bacteriana contiene manosa. Los PRRs son receptores especializados en la detección de patógenos tales como bacterias o virus, que reciben el nombre de receptores que reconocen patrones o receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés Pattern recognition receptor), son proteínas presentes en las células del sistema inmunológico, como fagocitos o los TLR, para identificar moléculas asociadas con patógenos microbianos o estrés celular. La vía de señalización de TLR es una de las respuestas inmunes innatas (Eulalio *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2014), la unión de ligandos bacterianos desencadena la activación respuesta inmune innata del huésped, mediada por un conjunto de proteínas adaptadoras y factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y la proteína activadora I (AP-I) (Eulalio *et al.*, 2012).

## **MicroRNA**

Los microRNA (miRNA) son moléculas pequeñas de RNA con la capacidad de reconocer, por complementariedad de bases, ciertas regiones de un RNA mensajero blanco.

Los miRNA son una clase de RNA no codificante cuyos productos son de aproximadamente 20-25 nucleótidos, secuencias que juegan papeles importantes en la regulación de la traducción y degradación de RNAm a través del emparejamiento de bases a sitios parcialmente complementarios en las regiones no traducidas (UTR) del mensaje. Se denomina UTR (del inglés, untranslated region) a las regiones no traducidas de los genes. Se asocian con miembros de la familia de las proteínas Argonata para ser guiados a su secuencia blanco o complementaria en el RNAm (Pabón, 2011).

Esta unión resulta en la inhibición de la expresión de dicho mensajero, es decir, su silenciamiento.

La regulación se consigue mediante la síntesis de un transcrito policistrónico, que posteriormente es fragmentado para generar múltiples miRNA, lo que sugiere en algunos casos una organización de tipo operón (Lugo *et al.*, 2009). También se sabe que los miRNA se transcriben de regiones intergénicas, ya sea de manera individual o en grupos de varios miRNA contenidos en un solo transcrito, aunque también se ha visto que hay muchas regiones intrónicas que los contienen individualmente o en grupos.

A la fecha se han encontrado numerosos miRNA, de los cuales varios se encuentran conservados en muy diversas especies, lo que sugiere que la regulación por miRNA es un mecanismo que adoptaron los organismos multicelulares tempranamente en su evolución.

Algunos miRNA se expresan de manera ubícua, mientras muchos otros lo hacen de forma tejido-específica, o incluso temporal, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula o tejido, como es el caso de *lin-4* que actúa para dictar el inicio de las etapas larvales de los eventos de desarrollo en *C. elegans*. (Liang *et al.*, 2014; Griffiths, 2004a; Griffiths, 2004b; Bushati *et al.*, 2007).

Los miRNA conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares y del desarrollo en eucariotas, cumpliendo una gran cantidad de funciones. Se estima que el 30% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de miRNA y que un solo miRNA puede regular alrededor de 200 diferentes transcritos que pueden funcionar en

diferentes vías en la célula, así como que un mismo RNAm puede ser regulado por múltiples miRNA (Pabón, 2011).

Los miRNA tienen diferentes funciones regulatorias a nivel del desarrollo y proliferación celular en diferentes organismos. De igual forma, los miRNA median diferentes procesos en tumorigénesis, inflamación, regulación del ciclo celular, respuesta a estrés, diferenciación, apoptosis e invasión. En células madre de tejidos somáticos, los miRNA tienen diferentes funciones incluyendo la regulación de múltiples pasos de la hematopoyesis, modulación de la miogénesis y cardiogénesis, diferenciación osteogénica y de la piel, también actúan como oncogenes y genes supresores de tumor (Pabón, 2011). Una característica general de los miRNA es su apareamiento imperfecto con el RNA blanco, los miRNA, generalmente, se unen a la región 3'UTR (región no traducible) de sus RNAm blanco.

Actualmente, los mecanismos de represión postranscripcional siguen siendo ampliamente estudiados, sin embargo, entre los mecanismos que se han propuesto se encuentran: a) bloqueo del inicio de la traducción; b) represión pos-inicio de la traducción, y c) desestabilización del RNAm blanco a través de un proceso de desadenilación, aunque aparentemente diferentes, estos mecanismos no son mutuamente excluyentes (Lugo *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2007).

### **Biogénesis de los miRNA**

La mayoría de los genes de miRNA se transcriben mediante la RNA polimerasa II en forma de transcritos primarios (pri-microRNAs) cuya longitud puede variar entre varias kilobases y unos cientos de bases (Flores, 2007). La mayoría presenta una caperuza ("cap") en la región 5' y una cola de adeninas, única para los transcritos de Pol II (Kim *et al.*, 2009) en la región 3' (Cai *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009), similar a la de los mRNA. Un pri-microRNA estándar contiene una región central o troncal ("stem") de RNA de doble cadena (dsRNA), de unos 30-40 nucleótidos (nt), un lazo u horquilla terminal ("loop") y dos regiones de RNA de cadena sencilla (ssRNA) a cada extremo opuesto de la región central (García, 2011; Flores *et al.*, 2007).

Dentro del pri-miRNA se encuentra una estructura de tallo-asa de entre 60-70 nt conocida como pre-miRNA, la cual resulta de su procesamiento en el núcleo de las

células animales por un complejo proteínico llamado microprocesador, el cual está formado por Drosha (una RNAsa tipo III). En el primer paso de la maduración de los pri-microRNA, Drosha separa el tallo de la estructura larga de RNA en forma de una horquilla pequeña y permite su liberación. Para ello, Drosha necesita un cofactor, DGCR8; juntos Drosha y DGCR8 forman el complejo microprocesador. La proteína DGCR8 juega un papel importante en el reconocimiento de los sitios de corte de Drosha en el tallo de la estructura del pri-miRNA, dando origen al pre-miRNA (Flores *et al.*, 2007; Lugo, 2011).

Después de la etapa de procesamiento en el núcleo, los pre-miRNA son reconocidos por factores nucleares de exportación (Lugo, 2011). El pre-miRNA es trasladado al citoplasma mediante la exportina 5 (EXP5) en un proceso dependiente de GTP, a través de los poros del núcleo al citoplasma (Pabón, 2011; Flores *et al.*, 2007). La EXP5 unida al pre-miRNA se exporta fuera del núcleo, donde la hidrólisis del GTP da como resultado la liberación del pre-miRNA (Whaid *et al.*, 2010; Ha *et al.*, 2014).

Una vez en el citoplasma, sufre otro procesamiento en el que se remueve el asa terminal, quedando solamente la cadena doble de miRNA maduro y una cadena de miRNA complementaria (miRNA/miRNA\*) (Lugo, 2009; Pabón, 2011) de ~21 pares de bases. La remoción del asa es llevada a cabo por otra RNAsa del tipo III llamada Dicer. La proteína Dicer se caracteriza por poseer un dominio PAZ ("Piwi/Argonaute/Zwille"), un dominio de unión a dsRNA y dos dominios RNAsa III. Gracias al dominio PAZ es capaz de unirse a la región 3'UTR de los pre-microRNA, y mediante la actividad de sus dominios RNAsa III corta en cada una de las cadenas que conforman el pre-microRNA (García, 2011; Flores *et al.*, 2007).

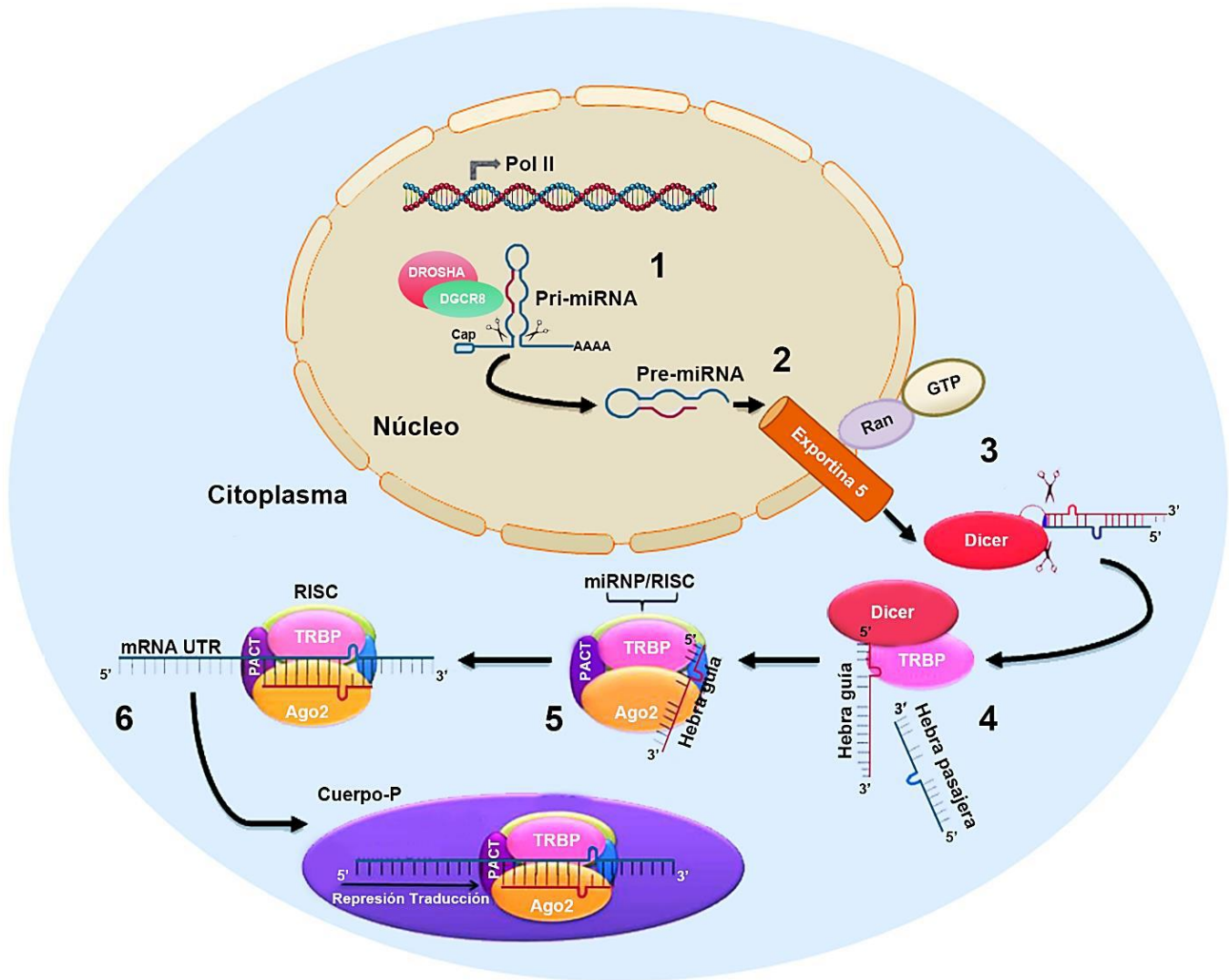
Es entonces cuando el RNA pequeño de doble cadena se ensambla con la proteína Argonata 2 formando un complejo silenciador conocido como RISC (del inglés "RNA Induced Silencing Complex") que es el efector del silenciamiento de los RNAm. En este proceso el RNA de doble cadena es separado, una cadena (miRNA\*, sentido) es degradada, mientras que la otra cadena (miRNA, antisentido o guía) es satisfactoriamente incorporada al RISC; esta última funciona como "guía"



para identificar a los RNAm blanco, con el fin de que RISC actúe sobre ellos, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del RNAm y represión traduccional (Lugo, 2009). Diversos estudios sugieren que la elección de una u otra cadena se debe a motivos termodinámicos relacionados con la inestabilidad del apareamiento de bases en la región 5' de cada cadena que conforma el dúplex (García, 2011).

La complementariedad perfecta de bases entre la secuencia del miRNA (del segundo al octavo nucleótido del extremo 5') y la secuencia complementaria del extremo 3' UTR es lo que permite que los miRNAs modulen la expresión génica (Pabón, 2011).

El complejo RISC/Argonata (Ago) cumple funciones como: 1) degradar una de las dos hebras del RNA pequeño, producto de Dicer, para dar como resultado final al miRNA funcional y 2) posteriormente detener la traducción cuando la homología y por lo tanto su hibridación es parcial; o por el contrario para degradar al RNAm blanco cuando su hibridación con el miRNA es total. En animales, la secuencia o secuencias blanco-reconocidas por los miRNA se localizan generalmente en las regiones 3' no traducida de los RNA mensajeros (Pabón 2011; Flores *et al.*, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** El procesamiento de los miRNAs clásico se inicia con la (1) transcripción del pri-miRNA mediante la RNA polimerasa II. (2) A continuación el transcrito primario es escindido en un pre-miRNA mediante el complejo formado por Drosha y DCGR8 (Microprocesador). (3) La siguiente etapa implica la exportación nuclear dependiente de RAN-GTP, mediante la Exportina-5. (4) Esta nueva localización permite a la RNasa Dicer y TRBP escindir el pre-miRNA, dando lugar a un duplex imperfecto de aproximadamente 19-24 nucleótidos de longitud, que se disociará en una hebra guía y otra pasajera. (5) Finalmente, la proteína argonauta-2 (Ago2), basándose en reglas termodinámicas seleccionará la hebra guía del miRNA, (6) constituyéndose el miRISC que se encarga de la regulación del mRNA diana. Tomado de: Beas, 2017.

## **Relación Hospedador/ microbiota.**

Denominamos microbiota a la comunidad de microorganismos vivos (procariotas y eucariotas) que residen en un nicho ecológico determinado estableciendo relaciones que conducen a un equilibrio dinámico entre ellos. Microbioma hace referencia al conjunto de genes que residen en un hábitat concreto (Pejenaute *et al.*, 2018; Sentandreu, 2017; Gómez *et al.*, 2019).

Se calcula que el número total de microorganismos que componen la microbiota ruminal es de  $1 \times 10^{15}$ , se encuentran más de 1,000 especies distintas de bacterias y que aproximadamente mil millones de microorganismos que codifican para aproximadamente 3 millones de genes, el genoma humano por otra parte contiene unos 23,000 genes (Gómez *et al.*, 2017; Sentandreu, 2017; Gómez *et al.*, 2019).

La composición de la microbiota no es estática y debe adaptarse al lugar donde reside y a las funciones que desarrolla. Además, esta composición se verá afectada por la dieta, los estilos de vida o el consumo de antibióticos, entre otros factores. Los efectos benéficos de la microbiota en el hospedador se pueden dar en varios niveles:

- **Metabólico:** La microbiota ha pasado de considerarse un mero comensal a un “órgano metabólico”. Realiza funciones como suministrar nutrientes esenciales para el hospedero que no son capaces de sintetizar como los ácidos grasos volátiles, además pueden degradar compuestos que no son digeribles por el hospedero, por ejemplo, la celulosa de los forrajes.
- **Protección frente a microorganismos patógenos:** La microbiota impide la colonización del hábitat por microorganismos patógenos mediante dos mecanismos de acción: 1) Interferencia con la colonización, la microbiota autóctona está adaptada a vivir en el hospedador impidiendo que otros microorganismos ocupen dicho lugar. Solo si esta microbiota se altera o se produce una invasión por gérmenes foráneos es posible la colonización por estos patógenos. 2) Producción de compuestos antimicrobianos, como los ácidos orgánicos o mediante el desarrollo de bacteriocinas, que son bactericidas o bacteriostáticos.

- Estimulación del sistema inmune innato y adquirido, contribuyendo a mantener un equilibrio entre procesos proinflamatorios y antiinflamatorios (Gómez *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha estudiado el eje microbioma - intestino - cerebro, este eje está formado por la microbiota, el sistema nervioso entérico, el sistema nervioso autónomo, el sistema neuroendocrino, el sistema neuro-inmune y el sistema nervioso central. El sistema nervioso entérico se encarga del funcionamiento básico gastrointestinal (motilidad, secreción mucosa, flujo sanguíneo), y el control central de las funciones del intestino se lleva a cabo gracias al nervio vago (Gómez *et al.*, 2019). La capacidad de la microbiota para influir en el comportamiento de los mamíferos se relaciona por su capacidad para sintetizar y/o reconocer sustancias iguales o análogas a las producidas por el sistema nervioso del huésped (Sentandreu, 2017).

La comunicación bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el cerebro, está presente en condiciones de salud y en enfermedades (Gómez *et al.*, 2017). Así, existe una correlación entre las alteraciones de la microbiota y la encefalopatía hepática, la ansiedad, el autismo o el colon irritable. En estas enfermedades existe una disbiosis (cambios en la composición normal de la microbiota) que genera cambios en la motilidad gastrointestinal, afecta a las secreciones y produce una hipersensibilidad visceral (Gómez *et al.*, 2019).

En estas circunstancias se ven alteradas las células neuroendocrinas y las del sistema inmune, modificando la liberación de neurotransmisores, lo que se podría traducir en las diferentes manifestaciones psiquiátricas. A su vez, estudios en modelos animales expuestos a diferentes situaciones de estrés han evidenciado variaciones en la composición de la microbiota, de esta manera se puede postular la comunicación bidireccional en este eje; la microbiota afecta la salud del hospedero y este a su vez, puede generar cambios en la microbiota (Gómez, 2019).

### **MicroRNA e inmunidad en becerros.**

Una importante fuerza impulsora en la evolución del sistema inmune de los mamíferos ha sido la necesidad de mantener relaciones homeostáticas con la

microbiota. Esto abarca el control de las interacciones microbianas con los tejidos del huésped, así como la composición de los consorcios microbianos (Hooper *et al.*, 2012).

El tracto gastrointestinal de los mamíferos sufre colonización microbiana inmediatamente después del nacimiento y posteriormente está continuamente expuesto a microbiota comensal, patógenos y antígenos (Liang *et al.*, 2016; Malmuthuge, 2016; Klein *et al.*, 2018).

Cada vez hay más pruebas de que la microbiota intestinal desempeña un papel vital en la regulación de las funciones inmunes del huésped. El sistema inmunitario de la mucosa del huésped previene la invasión bacteriana y da forma a la microbiota intestinal, mientras que la microbiota intestinal influye desarrollo del sistema inmune (Liang *et al.*, 2016), controlando la exposición de las bacterias a los tejidos del huésped, disminuyendo así el potencial de resultados patológicos (Liang *et al.*, 2014). Esto ocurre en dos niveles distintos: primero, minimizando el contacto directo entre las bacterias intestinales y la superficie de las células epiteliales (estratificación) y segundo, confinando las bacterias en los sitios intestinales y limitando su exposición al compartimento inmunitario sistémico (compartimentación; Hooper *et al.*, 2012).

Los becerros recién nacidos son susceptibles a una variedad de infecciones entéricas bacterianas y virales, debido a un sistema inmune inmaduro y una posible falla en la transferencia pasiva de anticuerpos maternos provenientes del calostro y como ya se mencionó el sistema inmunitario de la mucosa es la primera línea de defensa, activando respuestas inmunes innatas y adaptativas (Liang *et al.*, 2016).

El sistema inmune de la mucosa intestinal neonatal sufre un cambio rápido en respuesta a la colonización por microbios, exposición a posibles agentes patógenos y ambientales; factores que incluyen toxinas y componentes dietéticos, como el calostro (Liang *et al.*, 2016). Se ha reportado la presencia de una comunidad bacteriana menos diversa al nacer que aumenta en complejidad y diversidad con el crecimiento, como resultado de edad y cambios en la dieta (Malmuthuge *et al.*, 2017).

Los primeros colonizadores identificados a partir de meconio son *Citrobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*; la composición microbiana de meconio es muy similar a la microbiota fecal a las 6 y 12 h después del nacimiento. Transcurridas 24 h de nacidos la composición microbiana en las heces cambia drásticamente, presentando una mayor diversidad microbiana (Mayer *et al.*, 2012), lo que indica el establecimiento de un microbioma complejo muy temprano en la vida. Las variaciones individuales observadas entre becerros disminuyen con la edad, lo que sugiere el establecimiento de una microbiota con una mayor similitud a la de becerros mayores. Grupos bacterianos detectados en las muestras fecales de becerros destetados revelaron un decremento en la abundancia de bacterias géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Fecalibacterium* y *Enterococcus* con el crecimiento (Malmuthuge *et al.*, 2017).

El sistema inmune de la mucosa en desarrollo debe ser capaz de discriminar entre microbios comensales y microbios patógenos para garantizar la protección del hospedero sin interrumpir funciones intestinales vitales requeridas para mantener la salud (Alarcón *et al.*, 2016).

Los microorganismos patógenos y comensales tienen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés); que pueden ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en tanto en la membrana de las células como en el citosol, actuando como la primera barrera del huésped ante infecciones patógenas además de tener una función vital evitando respuestas inmunes aberrantes hacia simbiosis y microorganismos comensales. Los PAMP son reconocidos por los PRR presentes en las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, una de las células más importantes del sistema inmunitario ya que se consideran el vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Los TLR son PRR, detectan microorganismos, así como el inicio de respuestas inmunes innatas, las diferentes respuestas proporcionadas por TLR residen en los mecanismos moleculares como la regulación postranscripcional de ciertas

moléculas que interactúan en el sistema: citocinas secretadas, receptores de membrana, proteínas de señalización intracelular (González *et al.*, 2015).

Los TLR también se encargan de mantener la homeostasis Hospedero/microbio al modular la proliferación de células epiteliales y/o la secreción de proteínas antimicrobianas. Además, la colonización microbiana intestinal también tiene profundos efectos en la diferenciación de las células T (Liang *et al.*, 2014; Malmuthuge, 2016). Por ejemplo, la colonización bacteriana en ratones libres de gérmenes mejoró la diferenciación de las células T helper 17 y las células T reguladoras. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estas interacciones permanecen en gran medida indefinidos (Liang *et al.*, 2014).

La mucosa en el intestino delgado bovino consta de tejidos linfoides, como placas de Peyer (PP) y tejido linfoide difuso, que se distribuye por toda la lámina propia y compartimientos intraepiteliales (Liang *et al.*, 2016).

Además, el desarrollo de PP comienza en el útero, en ausencia del microbioma comensal, con folículos linfoides presentes al momento del nacimiento. Las PP continuas, ubicadas en el íleon, funcionan principalmente como un sitio para la generación de Células B pre-inmune, mientras que las PP discretas, distribuidas en todo el yeyuno, funcionan como sitios de inducción para la generación de células plasmáticas productoras de IgA (Beltrán, 2011; Lawless *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016).

Se ha visto que hay una baja regulación dependiente de la edad en la expresión de RNAm para varios TLR y péptidos antimicrobianos al comparar tejidos intestinales recogidos de becerros de 3 semanas de edad versus 6 meses de edad. Se han descrito cambios significativos en la expresión de miRNA intestinal bovino en el periodo de posparto (0 a 6 semanas) sugiriendo una posible participación de miRNA en la regulación del desarrollo del sistema inmune (Liang *et al.*, 2016; Do *et al.*, 2018).

Los primeros estudios que demuestran la expresión de miRNA en tejidos bovinos se realizaron en 2007. Desde entonces, se han identificado 793 miRNA maduros, codificados en los 30 cromosomas, del genoma de *Bos Taurus* (Lawless et al., 2014). Muchos miRNA humanos, incluidos algunos de los miRNA relacionados con el sistema inmunológico, comparten importantes similitudes funcionales y de secuencia con sus homólogos bovinos, lo que indica conservación evolutiva y, supuestamente, conservación de la función. Si bien existe una conservación significativa de los miRNA entre especies, también hay diferencias notables que muy probablemente tengan consecuencias funcionales (Lawless et al., 2014). El miRNA humano, hsa-miR-155, por ejemplo, es un homólogo perfecto para su contraparte bovina bta-miR-155. Por su parte el miRNA humano, hsa-miR-198, tiene un papel en la inmunidad humana y no tiene un homólogo aparente en el genoma bovino (Liang et al., 2014; González et al., 2015; Do et al., 2018).

Las familias bta-miR-2284 y bta-miR-2285, por ejemplo, codifican más de 100 miRNA maduros en el genoma bovino, pero no parecen tener homólogos en humanos ni en ratones. Se ha demostrado que estas familias de miRNA se expresan en varios tejidos inmuno-relevantes en bovinos, incluidos los monocitos CD14<sup>+</sup>, las células epiteliales mamarias y los macrófagos alveolares (Lawless et al., 2014).

Además de su papel como moduladores transcripcionales intracelulares de la expresión génica, los miRNA también se expresan de manera estable en una gran cantidad de fluidos corporales extracelulares, como leche, saliva, semen y plasma. Los miRNA extracelulares se pueden transferir a células receptoras distantes mediante transferencia mediada por exosomas y se ha visto su papel, en células dendríticas de ratón, que modulan la transcripción de células receptoras. Se ha demostrado que los miRNA empaquetados en el exosoma son altamente estables y resistentes a la degradación por RNAsas, congelación-descongelación y pH bajo. Se han encontrado que miRNA de exosoma, incluidos varios inmuno-relevantes, como bta-miR-223 y bta-miR-125b, tanto en la leche humana como en la bovina que contribuyeron significativamente en el sistema inmune neonatal, sobre la función de



las células T y la diferenciación de las células B (Chokeshaiusaha *et al.*, 2018). También se ha observado que los niveles de expresión de miRNA en la leche varían durante los diferentes períodos de lactancia y están presentes tanto en la leche cruda, así como, en los productos lácteos. Curiosamente, son particularmente abundantes en calostro (Lawless *et al.*, 2014), estas pruebas sugirieron que los genes inmuno-asociados dirigidos por los miRNA de leche de vaca y humana manifiestan los efectos inmunomoduladores conservados de los miRNA de leche entre las dos especies (Chokeshaiusaha *et al.*, 2018). Al implicar tal conocimiento a otras especies que amamantan, la identificación de estos genes diana podría proporcionarnos pistas valiosas sobre las características fundamentales de las interacciones miRNA-RNA a través de la evolución de los mamíferos.

## JUSTIFICACIÓN

Después del nacimiento, el sistema digestivo de los rumiantes recién nacidos se somete a adaptaciones morfológicas y funcionales, que comienzan con la ingestión de calostro que afecta la motilidad gastrointestinal, así como con la adquisición de la inmunidad pasiva y de una microbiota comensal que proviene del medio ambiente (alimento, agua, otros animales). Existe evidencia de que la microbiota desempeña un papel importante interactuando con el hospedero en varios procesos, entre los cuales destacan la producción de sustratos metabólicos beneficiosos (tales como vitaminas y ácidos grasos de cadena corta), la modulación de la respuesta inmune y protección contra microorganismos patógenos (Hooper *et al.*, 2012; Nava *et al.*, 2011).

Se ha reportado que los miRNA son coordinadores del desarrollo inmune del huésped. Sin embargo, es necesario profundizar en aspectos como su función en respuesta a la colonización temporal y regional microbiana en el tubo digestivo durante la vida temprana de los becerros. Además es necesario explorar los papeles potenciales de los miRNA en el sistema inmunitario de la mucosa mediante la identificación de genes objetivo-predichos, así como investigar si los patrones de expresión de miRNA temporales y regionales están asociados con cambios en el microbioma (Liang *et al.*, 2014).

Es por esto que un mayor conocimiento en la funcionalidad de los miRNA en rumiantes permitiría sentar las bases para la investigación de nuevas herramientas que favorezcan el desarrollo e inmunidad adecuados; lo que reduciría la incidencia de enfermedades causadas por patógenos o poblaciones bacterianas oportunistas, reflejándose de forma positiva en los parámetros económicos de las unidades de producción.

## **HIPÓTESIS**

La relación entre los microRNA, sus mRNA, los Receptores Tipo Toll y la microbiota del hospedero establecen los patrones del desarrollo del sistema inmunológico de becerros neonatos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la relación entre los niveles de expresión de miRNA endógenos y sus correspondientes mRNA blanco en diferentes segmentos del tubo digestivo de animales pre-rumiantes durante su transición a rumiantes y su efecto sobre el desarrollo e inmunidad en dichos órganos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el microbioma que coloniza el tubo digestivo de los 0 a los 42 días de edad de becerros criados en el trópico mexicano.
- Evaluar los niveles de expresión de los mRNA y los miRNA en el rumen y yeyuno de becerros al nacimiento y a los 7, 28 y 42 días de edad.
- Establecer la relación entre el microbioma y la expresión de los miRNAs y sus RNAm blanco, en el rumen y yeyuno de becerros desde el nacimiento hasta los 42 días de edad.
- Evaluar la expresión de los genes TLR2, TLR5, TLR8, TLR10 y PGLYRP1 en rumen y yeyuno en becerros al nacimiento y a los 7, 28 y 42 días de edad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y toma de muestras**

Se utilizaron un total 12 becerros ( $n = 3$ ) de las edades, 0, 7, 28 y 42 días. Los animales provenían del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT-UNAM), Tlapacoyan, Veracruz.

Los animales recién nacidos se sacrificaron inmediatamente después del nacimiento, sin haber ingerido calostro (Zhong *et al.*, 2017). Los becerros de edades 7, 28 y 42 días fueron sometidos al mismo manejo de la unidad de producción, el cual consta de toma de calostro y permanencia con la madre durante 4 días en el potrero destinado a maternidades. Posterior a este periodo el becerro es separado de su madre y es llevado al área de crianza con el resto de los becerros donde son alimentados con sustituto de leche (22% de proteína y 12% de grasa), administrado en dos porciones a las 7:00 y a las 17:00h

Se les permitio consumir forraje a libertad y 4.1 Kg de concentrado para becerros por animal, a partir de la segunda semana.

### **Toma de muestras**

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional Autónoma de México (CICUAE.DC- 2019/4-2, CICUAE, UNAM) siguiendo la NOM-033-ZOO-2014 (Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres).

Se tomaron 2 tipos de muestras:

- a) Se recolectó contenido ruminal e intestinal (yeyuno), de todos los animales, se colectaron de 5 a 30 mL de contenido en dos tubos separados. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior análisis (Liang *et al.*, 2014 y 2016). Del contenido se extrajo el DNA, este se envió a secuenciar para determinar el microbioma presente según la edad de los animales y determinar las variaciones en el tiempo.
- b) Se tomaron muestras de tejido de rumen del saco ventral y en el caso del yeyuno aproximadamente a 60 cm de la flexura duodenal. Estas fueron congeladas en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Del tejido se

realizó extracción de RNA, el cual se secuenció para determinar la expresión de los miRNA y para RNAm del epitelio intestinal y sus cambios en el tiempo, así como para medir la expresión de los mRNA de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10 y PGLYRP1, por qPCR.

### **Extracción de DNA**

Para conocer la diversidad bacteriana, se realizó la extracción de DNA genómico de las muestras del contenido del rumen e intestino delgado de becerros de 0, 7, 28 y 42 días de edad.

La extracción de DNA se realizó con el Kit de extracción de DNA QIAGEN, siguiendo la metodología de Zhongtang *et al.* (2004), donde se utilizaron perlas de zirconio y buffer de lisis para el rompimiento celular. Para la precipitación de ácidos nucleicos se utilizó acetato de amonio 10M, isopropanol y etanol 70%. Finalmente, para la remoción de proteínas y purificación del DNA se utilizaron las columnas del QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Para cuantificar la cantidad de DNA obtenido de la extracción la muestra se leyó en un espectrofotómetro de microgota nanodrop (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). La integridad del producto se observó en gel de agarosa 1%.

El análisis de las especies bacterianas estuvo a cargo de la empresa RTL genomics (TX, EEUU), para ello se enviaron muestras que contenían como mínimo 20ng/ $\mu$ l de DNA.

Para el análisis del microbioma, las muestras se analizaron usando el método Illumina MiSeq Double PCR (RTL genomics, 2019).

Con el DNA se llevó a cabo la amplificación de la región 16s del rRNA mediante PCR con unos cebadores universales (Sentido: 3'-CCTACGGGNGGCWGCAG-5'; antisentido: 3'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-5'), para consecutivamente secuenciar todos los productos de PCR obtenidos, y mediante una base de datos comparar las secuencias y elaborar un árbol filogenético (Chae, 2008; Liang *et al.*, 2016). Se utilizó la plataforma Illumina MiSeq con lecturas emparejadas (2 x 250).

## **Extracción de RNA**

Las muestras de tejido de rumen y yeyuno de los becerros de 0, 7, 28 y 42 días de edad, se extrajo el RNA total usando para ello TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo el protocolo para extracción de RNA de muestras de tejido (Chomczynski, 1995; Invitrogen).

La pureza, concentración y calidad del RNA se determinó por fluorometría (Qubit 3.0, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La integridad del producto se observó en gel de agarosa 1%.

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

Se utilizaron técnicas de biología molecular para identificar la expresión relativa de los genes de interés entre los diferentes tejidos y las diferentes edades, extrayendo el RNA total como se describió anteriormente. Se sintetizó DNA complementario (cDNA) con el kit M-MLV reverse transcriptase, M-MLV (Promega), el programa utilizado en el termociclador (Termociclador T100 de Bio-Rad) es el siguiente: 42°C durante 60 minutos, 72°C durante 15 minutos y 4°C durante 3 minutos.

El análisis qRT-PCR se realizó para evaluar la expresión de genes que codifican para TLR bovinos, y proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1 (PGLYRP1); los cebadores son enlistados en la Cuadro1. Se eligió la  $\beta$ -actina y 18S como gen de mantenimiento en el rumen, así como PPIA y RPL13 para el caso de yeyuno, estos genes fueron probados con el software Normfinder (Aarhus University, Dinamarca) todas las muestras de tejido obteniendo estabilidad entre las edades.

La expresión relativa de genes se realizó a partir de RNA utilizando Sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). El qRT-PCR se realizó utilizando el siguiente programa: Rumen: desnaturalización inicial de 95 ° C durante 15 s, seguido de la fase de amplificación 40 ciclos de 95 ° C durante 3 s y 60 ° C durante 30 s. Finalmente, una curva de melting a 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 min y 95 ° C durante 15 s. Yeyuno: desnaturalización inicial de 95 ° C durante 15 s, seguido de la fase de amplificación de 45 ciclos de 95 ° C durante 3 s y 55 ° C durante 30 s. Finalmente, una curva de meting a 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 min y 95 ° C durante 15 s.

Se calculó la expresión génica con el delta delta Ct ( $\Delta\text{CT}$ ) basado en el ciclo de cuantificación del gen endógeno y el gen diana; el resultado final de este método se presenta como el cambio de veces de la expresión del gen diana en una muestra, normalizada a un gen endógeno.

$$\Delta\text{CT} = \text{CT (un gen diana)} - \text{CT (gen endógeno)}.$$

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos utilizados para la identificación de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10 y PGLYRP1 por qPCR en rumen y yeyuno de becerros.

Oligos	Sentido	Antisentido	Numero de acceso
TLR2	CATCTGCTACGACGCCTT	TACTTGCACCACTCGCTCT	NM_174197.2
TLR5	AAAACCACATTGCCAACATC	CATCAGATGGAAGTGGGACA	NM_001040501.1
TLR8	TCCACATCCCAGACTTTCTATGA	GGTCCCAATCCCTTTCCTCTA	NM_001033937.1
TLR10	AGCATTTCAGATTTCCGTTT	TGTTGCCAGTTTCTACGC	NM_001076918.2
PGLYRP1	ATGTCTCGCCGCTACACAC	ACCACCACGTAGCGCACA	NM_174573.3
TLR10 (yeyuno)	CAGCATTTCAGATTTCCGTTT	GTYTCTACGCTSATAGGCA	NM_001076918.2
TLR8 (yeyuno)	ATTCCGTTCCATTTAACACCT	TTTTATCATAACACCCGTCCT	NM_001033937.1
$\beta$ -actina	CCATCATGAAGTGTGACGTTG	ACAGAGTACTTGCCTCAGGA	NM_031144.3
PPIA	AGCACTGGGAGAAAGGATT	AGCCACTCAGTCTTGGCAGT	NA_017101.1
RPL13	CTGCCCCACAAGACCAAGG	TGGTACTTCCAGCCAACCTCA	NM_012423.3
18s	GGAGCGATTTGTCTGGGTTA	GTAGGGTAGGCACACGCTGA	NR_036642.1

### **Análisis de abundancia relativa de las bacterias que habitan el rumen y el yeyuno**

Los datos sin procesar de las muestras de DNA de contenido de rumen y yeyuno, se analizaron con la herramienta USEARCH, que es una herramienta de análisis de secuencia única de algoritmos de búsqueda y agrupamiento y que puede llegar a

ser más rápidos que BLAST. Los archivos fastq forward y reverse fueron emparejados para formar un solo archivo fastq por muestra con -mergepairs, una vez obtenido este archivo se sometió a los parámetros de control de calidad, los cuales incluyeron la remoción de adaptadores y cortar las secuencias a un largo de 400 pb. Posterior a esto se realizó la eliminación de duplicados con el comando -derep\_fulllength, seguido de la asignación de OTUs. Las OTU se refieren a "unidades taxonómicas operativas" que se hacen agrupando secuencias en grupos basados en similitudes. Luego, para cada grupo, se selecciona una secuencia de ese grupo para que sea la secuencia representativa de ese grupo (típicamente una del "centro" de ese grupo en "espacio de secuencia", o la más abundante del grupo). En usearch y vsearch, si especifica un 97% de OTU, por ejemplo, el programa intenta de forma predeterminada crear OTU (agrupaciones) de modo que ninguna de las secuencias representativas de las OTU sea más similar al 97% de la secuencia representativa de cualquier otro clúster.

Primeramente, se utilizó el comando -unoise3 que filtra aquellas secuencias con una abundancia menor al 0.05 y las secuencias quiméricas. Una vez limpio de quimeras podemos realizar la tabla de OTUs o una tabla contable. La tabla de conteo es lo que nos dice cuántas veces aparece cada secuencia en cada muestra, para esto utilizamos el comando -usearch\_global la cual nos generara la tabla de OTUs a un 97% de identidad.

La asignación taxonómica se realizó usando la base de datos de RDP V.16 con un 97% de identidad. Los datos fueron analizados en la plataforma R con ayuda de la librería pyloseq (Edgar, 2010a; Edgar, 2010b).

Valores de diversidad alfa para comunidades bacterianas de contenido ruminal y de yeyuno, se obtuvieron utilizando diversos índices de diversidad (especies observadas, estimación de Chao, índices de diversidad de Shannon).

### **Análisis miRNA**

Los datos sin procesar de las muestras de RNA de tejido de rumen y yeyuno, se analizaron con mirDeep2. Para ello primero se realizó el análisis de control de



calidad y la remoción de adaptadores para esto se usó cutadap que permite resolver de una mejor manera la eliminación de adaptadores de los miRNA.

Se descargaron los genomas de referencia de mirBase se trabajó con el genoma de *Bos taurus* (ARS-UCD1.2), de igual forma se descargaron las secuencias maduras de los miRNA como sus precursores y se descargaron archivos auxiliares correspondientes a las especies *Ovis aries*, *Sus scrofa* y *Homo sapiens* todos en formato fasta.

Se editaron los genomas y se les removieron los caracteres y espacios no canónicos y se construyó el índice con Bowtie2. Posteriormente se realizó el procesamiento de las lecturas y el mapeo de muestras con la función mapper.pl de mirDeep2, después se realizó la cuantificación y el perfilado de las lecturas mapeadas con respecto al precursor con quantifier.pl. El módulo asigna las lecturas de secuenciación profunda a precursores de miRNA predefinidos y determina la expresión de los miRNA correspondientes. En primer lugar, las secuencias de miRNA maduras predefinidas se asignan a los precursores predefinidos. Por último, se realizó la identificación de miRNA con mirdeep2.pl donde se realiza un análisis de datos de secuenciación profunda de detección de microRNA. Se detectaron un total de 920 miRNA para las muestras analizadas.

El análisis de expresión diferencial se realizó con edgeR. Los genes diana para los miRNA seleccionados se predijeron mediante el uso de TargetScan (TargetScanHuman, release 7.1) y mirnet.

El enriquecimiento de ontologías se realizó con TopGO (Alexa *et al.*, 2022) y el enriquecimiento de la vía de la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) se realizó con el uso de Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

### **Analisis de mRNA**

El RNA total (2 µg) de cada muestra se envió a RTL genomics para su secuenciación. Este se usó para construir bibliotecas de RNA-Seq que se secuenciaron con el sistema Illumina MiSeq (Illumina). La secuenciación se realizó como lecturas de extremos emparejados de 250 pb.

El mapeo y anotación de lecturas de RNA-Seq se alinearon con el genoma bovino (ARS-UCD1.2) utilizando STAR 2.6 con parámetros predeterminados. Con FeatureCount se contó el número de lecturas asignadas a cada gen en función de la anotación de ENSEMBL (<http://uswest.ensembl.org/>) de genes bovinos. El nivel de expresión de los mRNA en cada muestra se calculó mediante la normalización del número de lecturas.

### **Identificación de genes expresados diferencialmente (DE)**

La identificación de los genes DE fue realizada por edgeR. Los genes DE se identificaron comparando la expresión de mRNA de los becerros del día 7 vs los becerros nacidos en el día 42 en yeyuno. Los mRNA significativamente DE se declararon con una tasa de cambio de  $\geq 2$  y una tasa de descubrimiento falso (FDR)  $< 0.05$ .

### **Análisis estadístico**

Las variables de respuesta tanto de filo como la expresión de los receptores tipo toll se analizaron empleando un modelo completamente al azar (SAS 9.3):

$$Y_{ik} = \mu + D_i + \varepsilon_{(i)k}$$

Donde:

$Y_{ik}$  = Variable de respuesta

$\mu$  = Media general.

$D_i$  = Efecto del i-ésimo día (0, 7, 28 y 42).

$\varepsilon_{(i)k}$  = Error experimental asociado al i-ésimo tratamiento.

## **Resultados y Discusión**

### **Diversidad microbiana**

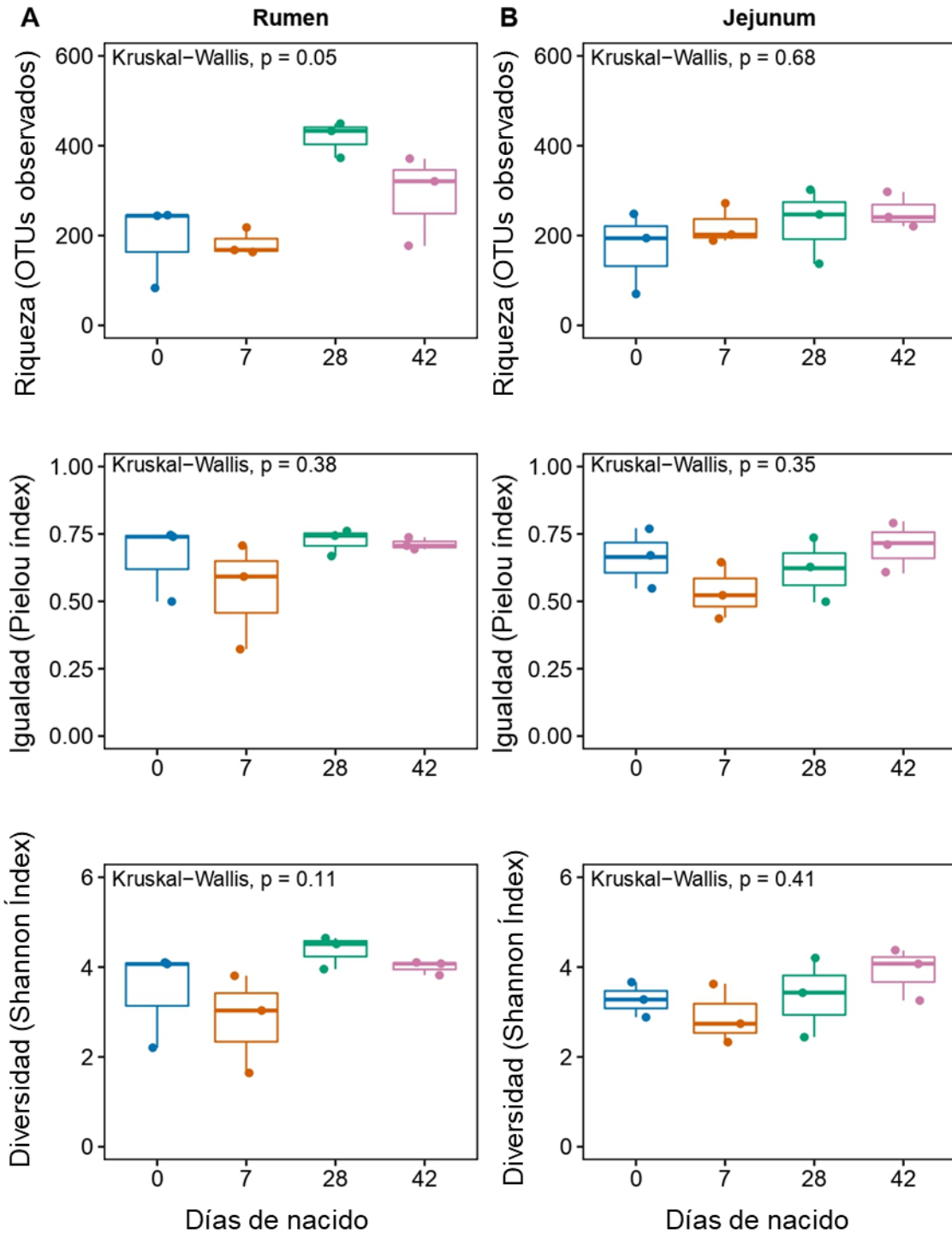
El nacimiento expone al recién nacido a la microbiota vaginal de la madre y del medio ambiente, lo que inicia la colonización bacteriana del tubo digestivo del animal.

En el análisis de las distintas especies microbianas que se realizó en este trabajo podemos observar cómo las poblaciones se van modificando según la edad y desarrollo del animal, lo que nos permite también observar como se va colonizando el tubo digestivo en las regiones de rumen y yeyuno.

### **Diversidad alfa**

Las métricas de diversidad alfa resumen la estructura de una comunidad ecológica con respecto a su riqueza (número de grupos taxonómicos), uniformidad (distribución de las abundancias de los grupos), o ambos.

Al analizar la diversidad alfa de las distintas edades en las distintas regiones anatómicas, no se encuentran diferencias estadísticas para ninguno de los dos índices de diversidad analizados en yeyuno ( $p \geq 0.05$ , figura, 2B). Para el caso de rumen se encontraron diferencias en el parámetro Chao 1 en el día 28 ( $p \leq 0.05$ , figura. 2B).



**Figura 2.** Diversidad alfa de las especies que se encuentran en rumen y yeyuno de becerros a los 0, 7, 28 y 42 días de edad en trópico mexicano.

Sbardellati *et al.* (2020), realizaron un estudio donde analizaron la microbiota del epitelio ruminal en sus distintos segmentos (saco craneal, saco ventral y los sacos ciegos), sin embargo no encontraron variaciones entre las muestras en cuanto a riqueza y diversidad.

Jiao *et al.* (2015), en su estudio de identificación taxonómica de la diversidad bacteriana epitelial ruminal durante el desarrollo del rumen en cabras, analizaron los datos de animales de edades similares a las de este estudio (0, 7, 28, 42 y 70 días de nacidos), reportaron en su análisis de diversidad alfa que la edad no tuvo efecto ( $p \geq 0.05$ ).

Estos dos estudios apoyan nuestras observaciones la falta de variación en los resultados obtenidos en este trabajo donde no se observa una diferencia en la riqueza o la diversidad para el caso de yeyuno y de la diversidad para el caso de rumen, esto puede deberse al rápido cambio y colonización del tubo digestivo por los microorganismos donde a pesar de que cambian las proporciones de los filos no hay una variación significativa en las poblaciones que pueda verse reflejado como una diferencia estadística.

Oikonomou *et al.* (2014) y Klein *et al.* (2014) han descrito en sus estudios un aumento en la riqueza y diversidad de especies con la edad. Los datos de este estudio coinciden con los de Austin *et al.* (2018) en el sentido de que las muestras de 28 días tienen una mayor riqueza en comparación con las muestras al destete, lo que sugiere una estabilización del microbioma en animales bovinos en edad madura, ya que aunque el rumen no es verdaderamente funcional hasta aproximadamente las 4 semanas de edad la fermentación microbiana de las poblaciones incipientes con sus productos finales de fermentación son críticos para el desarrollo del rumen y del sistema inmunológico.

Por otro lado, Klein *et al.* (2019), estudiaron la microbiota de becerros recién nacidos y sus madres para ver las posibles rutas de transferencia y colonización de la microbiota gastrointestinal de los recién nacidos durante las primeras 48 horas de vida, en su estudio observó que la riqueza de especies, la diversidad y el número de OTU observadas disminuyó significativamente entre 6 y 24 horas después del

nacimiento y de la misma manera Alipour *et al.* (2018) y Yeoman *et al.* (2018) observaron una disminución en la media de Chao1, Shannon y las OTU observadas, durante el primer a dos días después del nacimiento de los becerros. Se ha registrado un cambio en los perfiles microbianos en las primeras horas después del nacimiento del animal, posterior a esto la microbiota parece estabilizar sus poblaciones (Malmuthuge *et al.*, 2014). Las posibles explicaciones dadas por estos autores son los efectos selectivos del medio ambiente, especialmente la dieta que se da a los animales, aunado a una mayor diversidad provocada por la colonización postnatal.

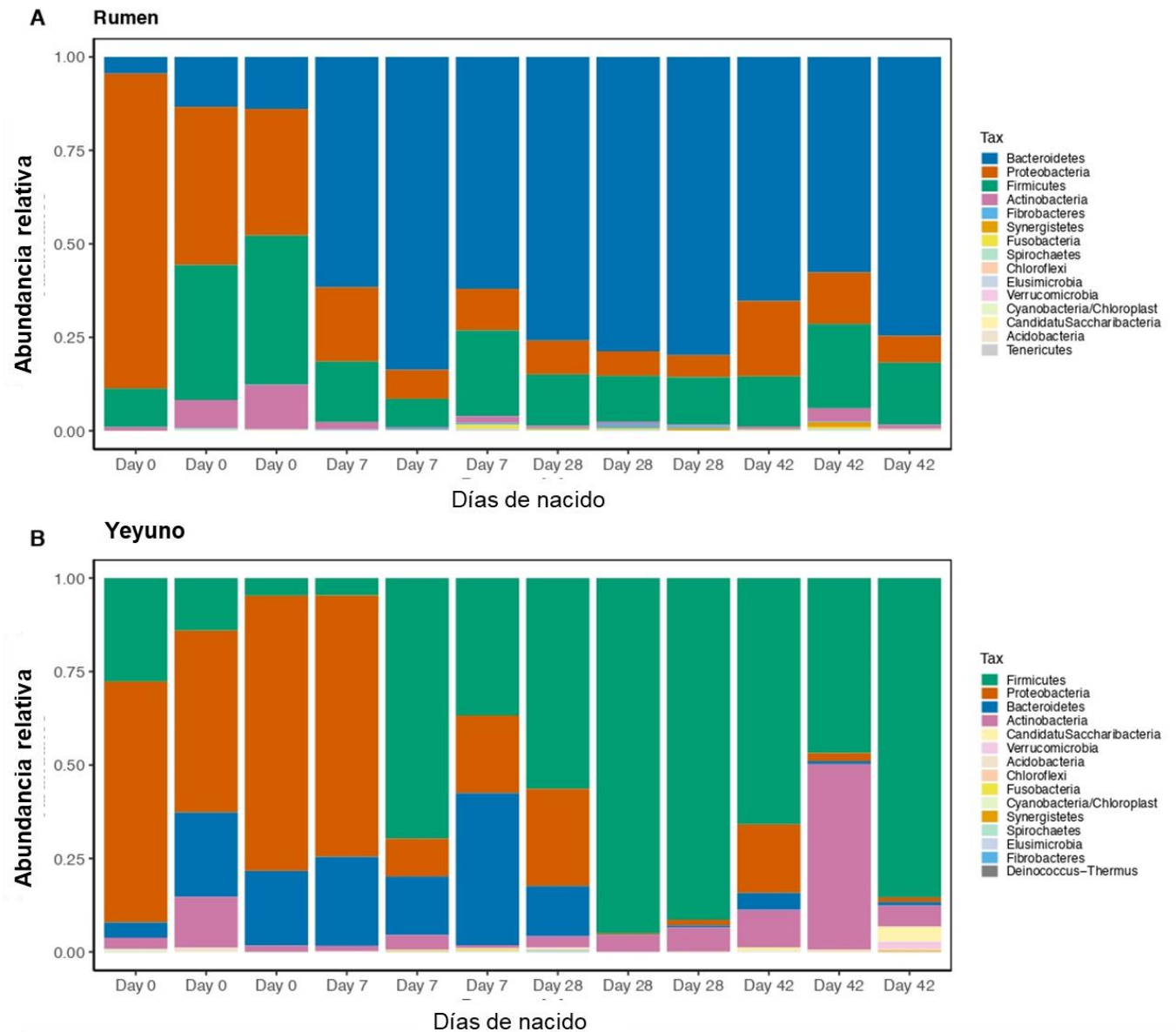
### **Abundancia de especies bacterianas encontradas en rumen y yeyuno**

Al analizar la abundancia de las regiones vemos una predominancia por los filos Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacterias, tanto para rumen como para yeyuno, representando casi el 90% de la totalidad de los filos encontrados.

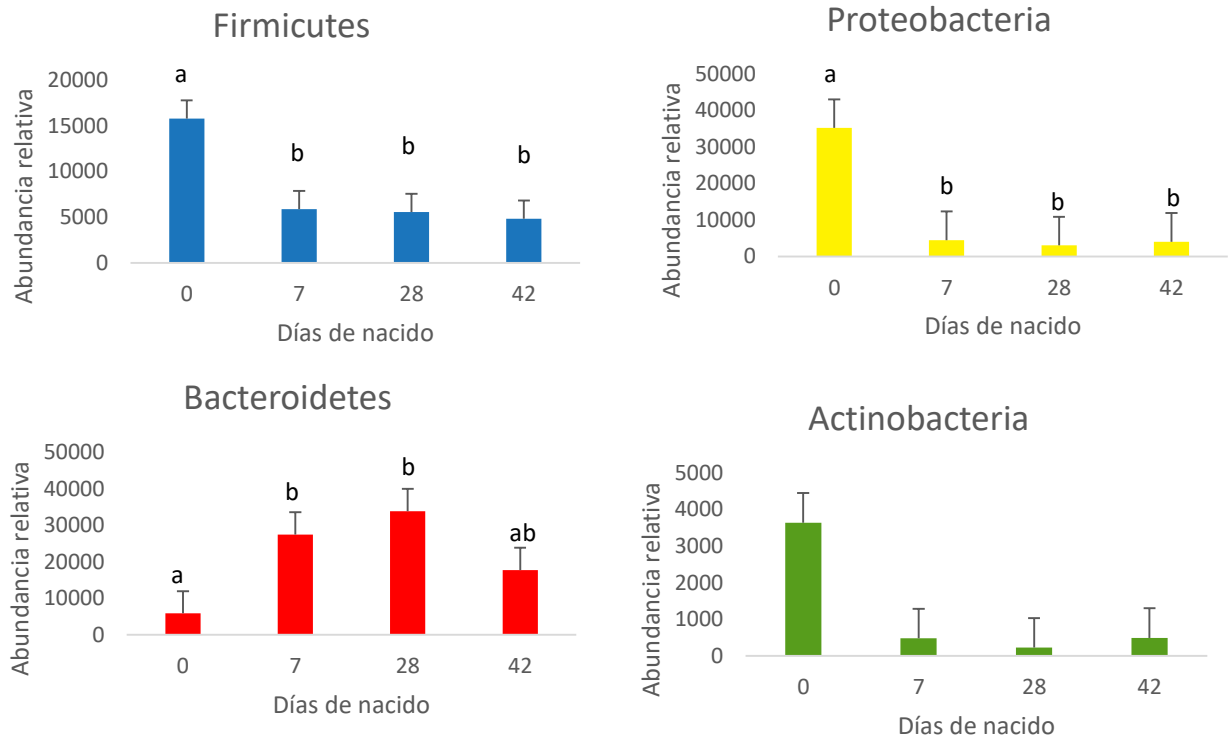
Para el caso de rumen (figura 3A) vemos que hay una mayor proporción del filo Proteobacteria en el día 0, el cual va siendo sustituido por una creciente proporción del filo Bacteroidetes ( $p \leq 0.05$ , figura 4B y 4C) y que permanece como el filo más abundante a lo largo de los días. Esto es consistente con lo reportado por Malmuthuge *et al.*, (2015), donde utilizando 16S rRNA, obtuvieron como resultado que las Proteobacterias predominan durante la primera semana de vida del animal y posteriormente son reemplazados por Firmicutes y Bacteroidetes.

Li *et al.* (2012), reportan en su trabajo que becerros alimentados con sustituto de leche y posteriormente alimento iniciador, muestran una predominancia del filo Bacteroidetes durante las 6 primeras semanas de vida; esto lo podemos ver reflejado en los resultados obtenidos en el presente estudio, puesto que la alimentación ofrecida a los becerros es similar a los de Li, donde los becerros son alimentados con sustituto de leche y posteriormente se inicia su dieta con iniciador, por lo que podemos ver un patrón similar en el comportamiento de las poblaciones bacterianas ( $p \leq 0.05$ , figura 4C).

En el día 0 los filos Firmicutes y Actinobacteria representaron el 27% y el 12% respectivamente de la abundancia en rumen ( $p \leq 0.05$ ), respectivamente; esta se ve disminuida para los días 7 y 28, hacia el día 42 llega a representar el 18% para Firmicutes y el 7% para Actinobacteria (Figura 3A, figura 4A y 4D).



**Figura 3.** Abundancia relativa de los filos en A) rumen y B) yeyuno en becerros de 0, 7, 28, 42 días de edad del trópico mexicano.



**Figura 4.** Cambios en el tiempo de la abundancia relativa de los filos más representativos que habitan el rumen, en becerros de 0, 7, 28, 42 días de nacidos en el trópico mexicano. Los diferentes filos se muestran en los paneles A) Firmicutes, B) Proteobacteria, C) Bacteroidetes, D) Actinobacteria. Distintas literales entre columnas indican diferencia estadística (n=3, p≤0.05)

El ecosistema ruminal es un consorcio complejo de distintas especies bacterianas viviendo en una relación simbiótica con el hospedero. Zhou *et al.*, (2015) en su artículo de revisión sobre las bacterias del rumen encontró que en las poblaciones ruminales los filos más abundantes siempre recaen sobre los Firmicutes y los Bacteroidetes.

De igual forma Tapio *et al.* (2017), reportan en su análisis de abundancia que el filo principal está representado por Firmicutes (55.9- 86.8%) seguido por Bacteroidetes (8-24.4%) y Proteobacteria (0.9-13.4%), los otros filos como Actinobacteria y Cyanobacteria representaron menos del 0.5%. Estos mismos resultados se mantienen para el estudio de metanálisis realizado por Kim *et al.* (2011), donde tomaron 13478 secuencias curadas de bacterias de origen ruminal buscadas bajo los términos “rumen” o “ruminal” de la base de datos de RDP (por sus siglas en

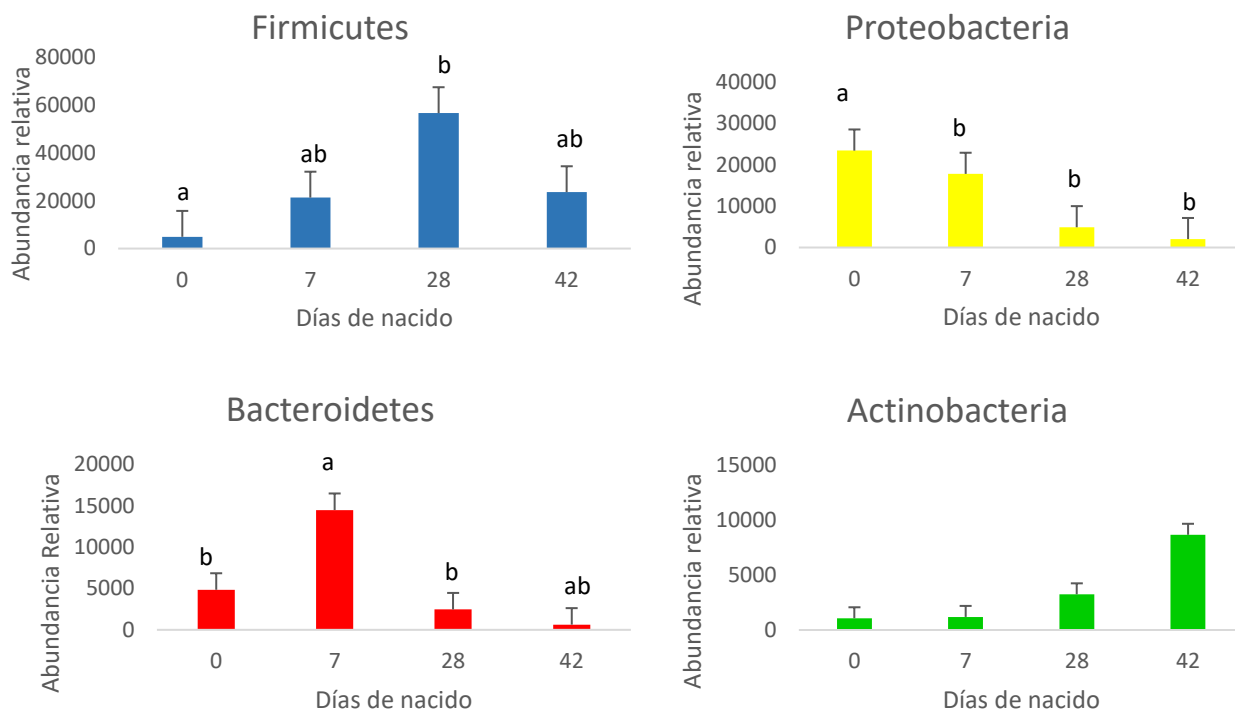


ingles Ribosomal Database Project), este estudio encontró 19 filos en el rumen, siendo Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria los más predominantes, que representaban el 57.8%, 26.7% y 6.9% de las secuencias bacterianas totales, respectivamente.

Sbardellati *et al.* (2020), al igual que el caso anterior reportan que el microbioma del rumen lo componen en su mayoría el filo Firmicutes, seguido por Bacteroidetes y Proteobacteria manteniendo estas proporciones a lo largo del estudio de los 0 a los 70 días de edad. En un estudio similar a este realizado por Jiao *et al.* (2015), las proporciones reportadas de los filos en animales de 0-70 días de edad están mayormente representados por el filo Proteobacteria con un 90%, el cual desciende drásticamente con la edad, para el día 42 el filo más abundante vuelven a ser los Firmicutes con un 55%, concordante con los estudios mencionados anteriormente. De igual manera vemos concordancia con los datos obtenidos en este trabajo donde al día 0 la predominancia es por parte del filo Proteobacteria y posteriormente las proporciones cambian conforme el animal se desarrolla.

En un caso distinto tenemos el estudio realizado por Indugu *et al.* (2016) donde su análisis de bacterias ruminales dio como resultado una mayor proporción en el filo Bacteroidetes, seguido por Firmicutes, este cambio es atribuido a la dieta ofrecida a los animales basada en sustituto de leche y concentrado. Esto es consistente con los datos reportados en este trabajo donde la dieta de los animales basada en concentrado y fórmula láctea permitió un mayor desarrollo del filo Bacteroidete como se mencionó anteriormente.

Para el caso de yeyuno (Figura 3B) estuvieron dominadas por el filo Firmicutes siendo el filo más abundante en las muestras de 7, 28, 42 días, representando el 27,5%; 43,4%; 33,7% respectivamente. Por otro lado, hay una disminución con la edad del filo Proteobacteria (disminuyendo del 37% en el día 0 al 16,3% en el día 42), un patrón similar que ocurre en el rumen. El filo Bacteroidetes tiene un aumento en el día 7 que representa el 24% de la abundancia y una disminución en el día 42 que representa menos del 10%.



**Figura 5.** Cambios en el tiempo de la abundancia relativa de los filos más representativos que habitan yeyuno en becerros de 0, 7, 28, 42 días de nacidos en el trópico mexicano. Los diferentes filos se muestran en los panes A) Firmicutes, B) Proteobacteria, C) Bacteroidetes, D) Actinobacteria. Distintas literales entre columnas indican diferencia estadística (n=3, p≤0.05).

El filo Actinobacteria pareciera aumentar con la edad sin embargo no vemos una diferencia en la estadística ( $p > 0.05$ ). La mayoría de miembros de este filo se encuentran en el suelo, e incluyen algunas de las más típicas formas de vida terrestre, jugando un importante rol en la descomposición de materia orgánica, como la celulosa y quitina, este pertenecen generos como *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* de gran importancia en rumen, *Streptomyces* del cual se han encontrado muchos antibióticos de origen natural, lo que puede ayudar a mantener las poblaciones benéficas e impidiendo la colonización de patógenos (Fatahi, 2019).

Taschuk *et al.* (2012) mencionan que en el yeyuno el establecimiento del microbioma en el recién nacido el primer encuentro bacteriano ocurre durante el

proceso de parto donde están Firmicutes y Bacteroidetes como el filo predominante en la cavidad vaginal, esto es consistente con los datos de Klein *et al.*, (2019), donde su análisis de sucesión de microbioma de madres a hijos reporta que en las madres, en canal vaginal, el filo más significativo fue Firmicutes y en calostro fue Proteobacteria, por lo que la microbiota fecal e intestinal de los becerros, resultó similar a lo encontrado en canal vaginal de la madre, lo que sugiere que parte de la microbiota fecal de becerro puede derivarse de la inoculación del canal de parto durante el nacimiento. Lo cual es consistente con lo encontrado en yeyuno en el presente estudio estudio donde la mayor proporción encontrada corresponde a filo Firmicutes, población adquirida al momento del nacimiento.

En muchos estudios la colonización microbiana intestinal durante el período previo al destete se ha estudiado principalmente con muestras fecales, ya que es una forma no invasiva de recolectar muestras del mismo individuo a lo largo del tiempo, sin embargo, Malmuthuge *et al.*, (2014 y 2017); informaron que la composición bacteriana podría variar según la región del tracto gastrointestinal y el tipo de muestra utilizada (contenido versus tejido mucoso). Firmicutes y Bacteroidetes dominaron las comunidades bacterianas a lo largo del tracto gastrointestinal, variando la abundancia relativa de estos 2 filos entre las regiones intestinales (duodeno, yeyuno, ileón).

Las comunidades microbianas intestinales en becerros alimentados con ensilaje o dietas mixtas se volvieron más parecidas a las de los animales adultos. Por lo tanto, el cambio de las dietas según la etapa productiva junto con el crecimiento y la edad son una de las principales fuerzas impulsoras en el establecimiento de comunidades microbianas en los animales en desarrollo (Dill-McFarland *et al.*, 2017, 2019; Jami *et al.*, 2013). Ma *et al.* (2020) detectaron cambios en la diversidad microbiana intestinal en becerros sanos que fueron alimentados solo con sustituto de leche y, por lo tanto, especulan que edad y crecimiento del animal fue el factor principal que impulsó el desarrollo de la diversidad microbiana en los primeros años de vida.

La mayoría de los estudios se centraron en la composición de las bacterias intestinales, pero algunos informaron la composición de arqueas en el intestino

como en los trabajos de Zhou *et al.*, (2014) y Malmuthuge *et al.* (2017), lo que es consistente con los filos de metanobacterias encontrados en yeyuno de los becerros; en el presente estudio podemos encontrar filos como *Nanohaloarcheoata*, *Nanoarqueoata* estas dos en general son un simbiote de otras bacterias y arqueas y se ha descrito su papel como fermentador (Casanueva *et al.*, 2011; Jarett *et al.*, 2018; Roh *et al.*, 2020), respecto a Microgenomates, que es un filo de reciente descubrimiento han sido propuestos como arqueas pioneras en la colonización de hábitats. El desarrollo de técnicas moleculares permitió la detección de arqueas metanogénicas en etapas más tempranas ya que probablemente no podrían ser detectadas por el conteo microbiano clásico se ha informado recientemente que en el día 0 de vida *M. mobile*, *M. votae* y *Methanobrevibacter sp*, se detectaron en el rumen de terneros lecheros neonatales (Yañez *et al.*, 2015). Aunque las bacterias intestinales se han estudiado principalmente para comprender su papel modulador en el sistema inmunitario de la mucosa y en la salud, los estudios sobre la comunidad de arqueas intestinales son útiles para controlar las emisiones entéricas de metano.

Como podemos ver a lo largo de muchos estudios las poblaciones microbianas presentes mantienen cierta estabilidad, por lo que muchos autores hablan de un núcleo bacteriano. Un núcleo microbiano, se define como un conjunto de especies microbianas presente en individuos dentro de una especie dada (Taschuk *et al.*, 2012).

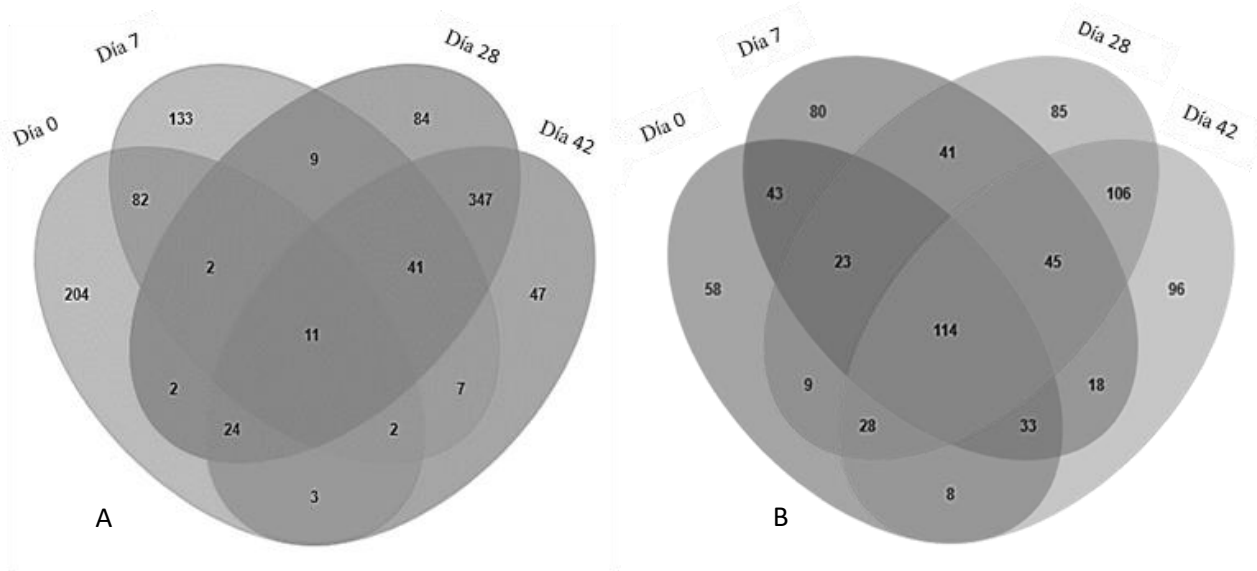
Henderson *et al.* (2015) realizaron un estudio de la composición de la comunidad microbiana del rumen de distintas especies entre los que se encontraban vacas, cabras, camellos, búfalos y ovejas y cómo éste microbioma puede variar con la dieta y el huésped, sin embargo, gracias a que se encuentra un microbioma central (un núcleo) hace que las variaciones aún en un amplio rango geográfico se vean disminuidas pues se colectaron muestras en 35 países distintos, donde los filos de bacterias dominantes se mantuvieron a lo largo del estudio en un 90%, siendo representados por los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias y Fibrobacter. Los siete grupos bacterianos más abundantes comprendieron el 67.1% de todos los

datos de la secuencia bacteriana, se detectaron en todas las muestras y pueden considerarse las bacterias ruminales "dominantes". Estas fueron *Prevotella*, *Butyrivibrio* y *Ruminococcus*, así como *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* y *Clostridiales*.

Por su parte Xue *et al.*, (2018), analizó el microbioma de 334 vacas lecheras, encontrando que había un núcleo bacteriano que se mantenía y representaba el 46% de todas las bacterias encontradas, entre los cuales figuran Firmicutes (21.67%), Bacteroidetes (20.68%), Proteobacteria (0.52%).

De igual forma se habla de un núcleo a nivel de intestino donde un estudio reciente definió una estable relación endosimbiótica relativamente constante con la microbiota en el transcurso de tres décadas (Fraune *et al.*, 2007). Taschuk *et al.* (2012) mencionan que el microbioma central (núcleo) debe redefinirse a un nivel funcional, colocando mayor énfasis en los procesos llevados a cabo por la biota residente, y menos énfasis en la abundancia absoluta o relativa de organismos individuales.

Por lo que mantener la tolerancia y estabilidad de las poblaciones, puede requerir la presencia e interacción de una microbiota relativamente consistente y específica, ya que por ejemplo muchas enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal o la acidosis ruminal se han asociado con cambios en la población microbiana, por lo que no es raro encontrar un núcleo bacteriano en las especies, que ayuden a mantener la homeostasis.



**Figura 6.** OTU compartidas entre diferentes grupos. Gráfico de Venn que muestra las OTU compartidas y únicas que se encuentran en cada grupo trazado. A) OTU compartidas en la muestra de rumen. B) OTU compartidas en la muestra de yeyuno.

La investigación continúa demostrando que pequeños cambios en los taxones microbianos ruminales o la abundancia de microbios específicos impacta la productividad del ganado. Factores como la edad, la dieta, sistema de alimentación, especies hospedadoras e incluso geografía, pueden llegar a alterar las proporciones de los microorganismos ruminales. Por ejemplo, Wang *et al.* (2016) investigaron la dinámica temporal del microbioma ruminal en cabras y observaron que la abundancia relativa de Firmicutes no variaba con la edad.

Sin embargo y como se ha revisado anteriormente el factor que afecta en mayor medida la manera en que se mueven las poblaciones de la microbiota del tubo digestivo es la dieta. Esto lo podemos observar en los trabajos como los de Petri *et al.* (2013), Iqbal *et al.* (2018), Malmuthuge *et al.* (2011), Clemmons *et al.* (2019), Guo *et al.* (2020), y muchos otros autores donde lo que buscan es ver la influencia que tiene el tipo de alimentación o los cambios de dieta a los que son expuestos los animales sobre la microbiota y el microbioma y como este impacta sobre la producción.

La microbiota juega un papel fundamental en el desarrollo de la inmunidad y el metabolismo gastrointestinal, por lo que conocer estas poblaciones permite no solo prevenir enfermedades, sino también mejorar los parámetros productivos.

### **Expresión de los Receptores Tipo Toll**

Se pueden observar diferencias en los cambios en la expresión de genes relacionados con la inmunidad tanto en el yeyuno como en el rumen durante la primera semana posparto.

En el rumen se muestra una alta expresión de TLRs para el día 0, desciende para los días 7 y 28, aumentando de nuevo para los días 42. El *TLR10* de rumen se observa un cambio al día 28, donde la expresión desciende.

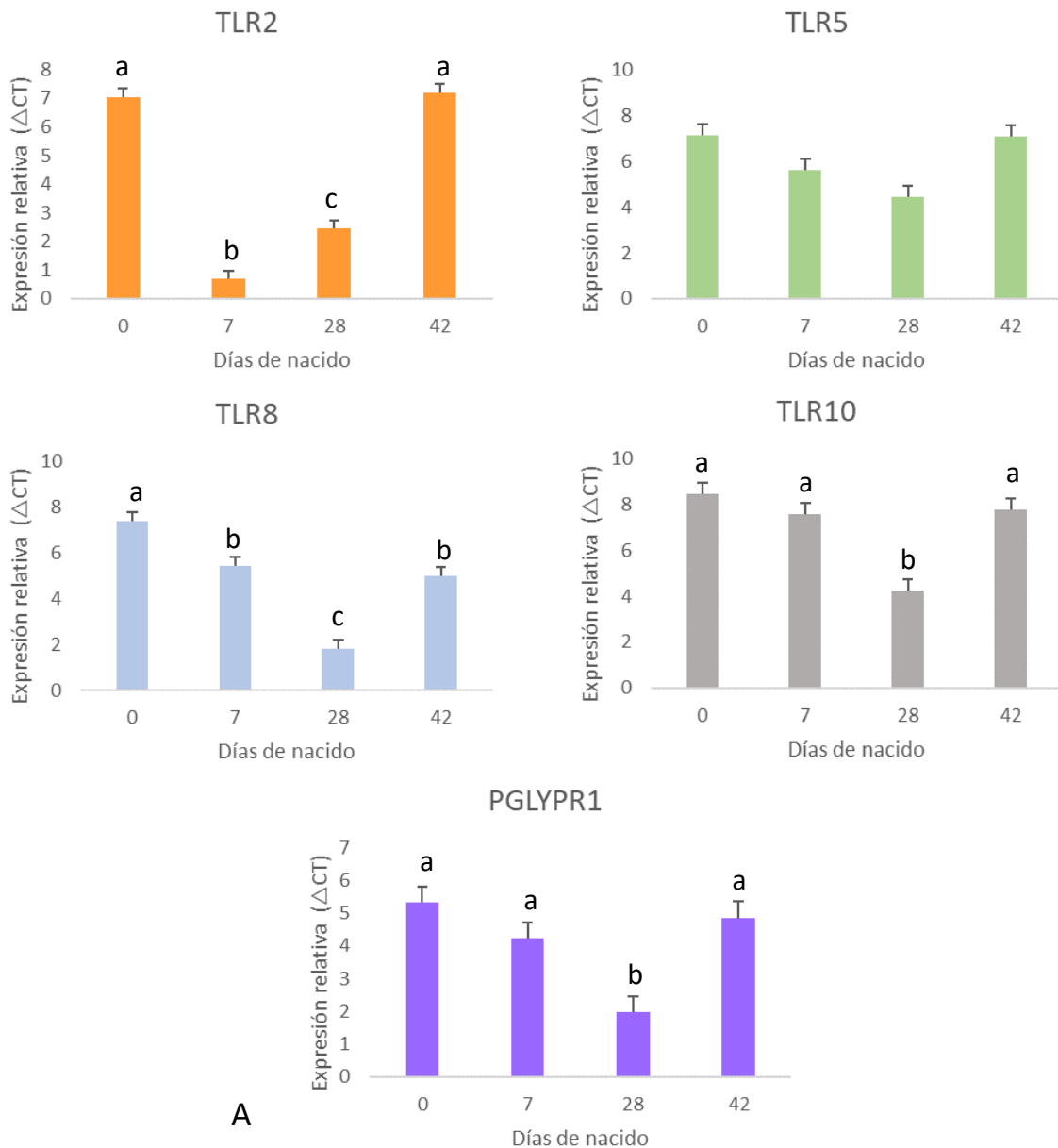
En yeyuno, vemos una menor expresión general de los TLRs que la obtenida en rumen. La expresión de *TLR2* se comporta de manera similar a lo expresado en rumen donde hay una alta expresión para el día 0 y día 42; para el caso de *TLR5* vemos que la mayor expresión está presente en el día 7. Mientras que para *PGLYRP1* en yeyuno no se encontraron diferencias en la expresión entre los días analizados.

Este cambio rápido durante la primera semana después del nacimiento puede estar regulado por varios factores, incluida la colonización microbiana, la ingestión de calostro o el desarrollo ontogenético programado (Liang *et al.*, 2016).

Los receptores tipo Toll (TLR) son un grupo de proteínas altamente conservados identificados en organismos tan diversos como insectos y mamíferos (Menzies *et al.*, 2006). Dentro de los mamíferos, se ha propuesto que la familia TLR está conformada por al menos 10 miembros, como en el caso de los rumiantes (Menzies *et al.*, 2006; Werling *et al.*, 2006; Brownlie *et al.*, 2011).

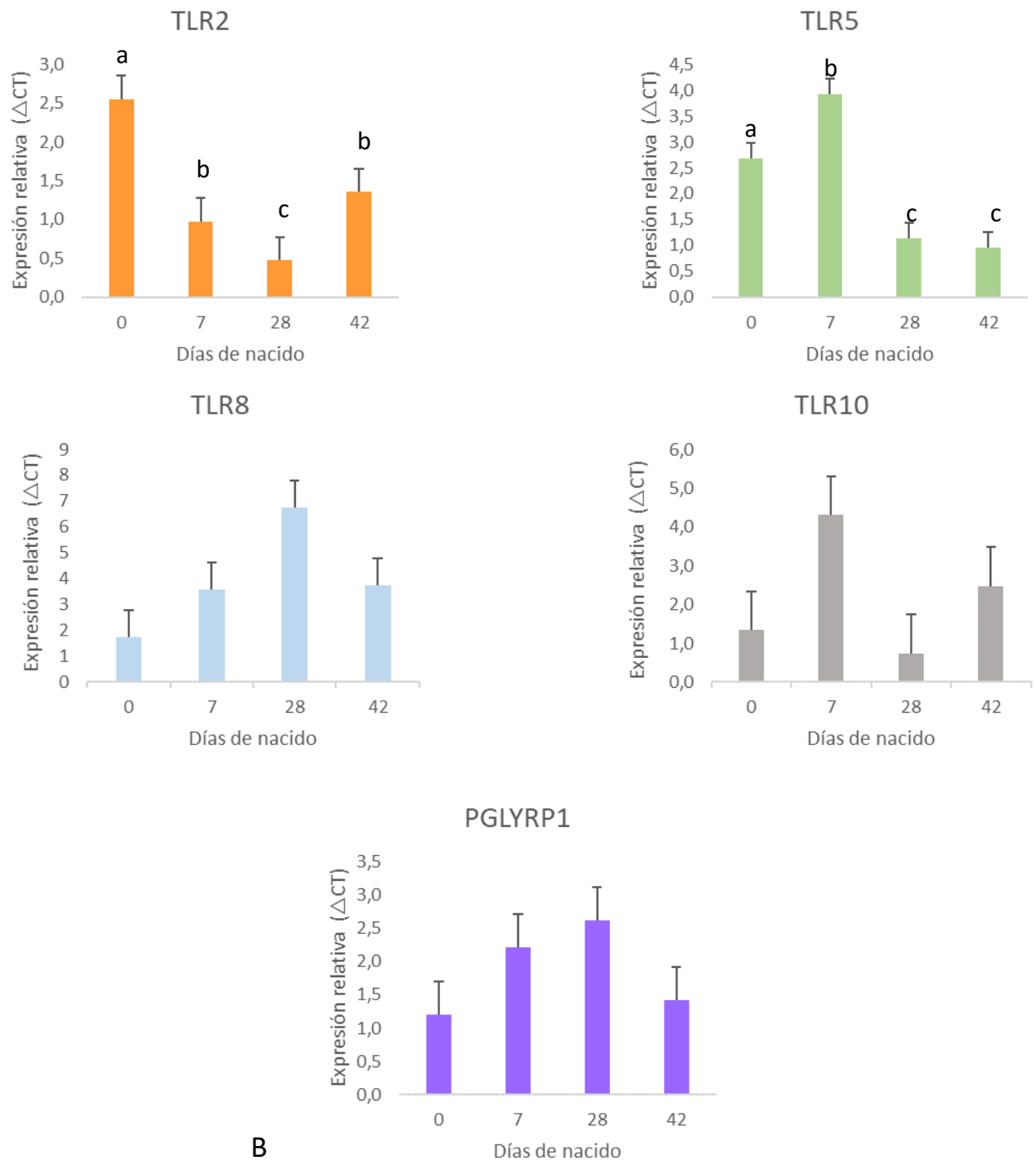
Los TLR proporcionan al huésped un medio para diferenciar lo extraño de lo propio y, como tales, funcionan en las primeras etapas del desarrollo inmunológico (MamImuthuge *et al.*, 2013). Los TLR representan un puente entre el sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico adaptativo, ya que la activación del sistema inmunológico innato induce la fagocitosis, la opsonización y la producción

de mediadores de la inflamación, bloqueando la diseminación de los patógenos (Sánchez-Zauco *et al.*, 2010). El reconocimiento de moléculas extrañas se basa en la detección de patrones moleculares que son indicativos de entidades que pueden causar daño al huésped. Estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) comprenden moléculas tales como lipopolisacaridos (LPS), flagelina, dsRNA y DNA CpG (dinucleótidos no metilados), entre otras (Garfias *et al.*, 2005; McGuire *et al.*, 2006; Menzies *et al.*, 2006; Gonzales-Rascon *et al.*, 2015).



A





**Figura 7.** Expresión de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10, PGLYRP1 en rumen y yeyuno en becerros de 0, 7, 28, 42 días de edad del trópico mexicano. A) Expresión relativa de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10, PGLYRP1 en rumen. B) Expresión relativa de TLR2, TLR5, TLR8, TLR10, PGLYRP1 en yeyuno.

La presencia de TLR en el epitelio ruminal bovino ha sido reportado por Chen *et al.*, 2012; Malmuthuge *et al.*, 2012; Trevisi *et al.*, 2014; Kent-Dennis *et al.* 2020. La disminución en la expresión de TLR, IRAK1 y CD45 después del parto indica que el epitelio ruminal puede ser un componente importante del sistema inmunológico, debido a que la disminución en la expresión de CD45 después del parto sugiere una menor abundancia relativa de células inmunológicas en el tejido epitelial.

Chen *et al.*, (2012) en su estudio realizó una comparación de la expresión de TLR en becerros resistentes y susceptibles a la acidosis ruminal, encontrando que la disminución en la expresión de estos receptores puede hacer que los animales sean más susceptibles a los estímulos inflamatorios originados en el entorno ruminal. Por su parte Kent-Dennis *et al.*, (2020), observó en su trabajo un aumento rápido en la expresión de TLR2 cuando expuso cultivos de células epiteliales de rumen a LPS; la respuesta a LPS fue mayor cuando se midió después de 6 horas en comparación con 24 horas.

Abecia *et al.*, (2017), en su trabajo analizaron los niveles de expresión de los TLR en ovinos de entre 1-28 días de edad, observaron que los niveles de expresión más bajos correspondieron a TLR2 y TLR5, además detectaron una menor abundancia de mRNA en TLR2, TLR8 y TLR10 en los animales de 3 y 5 días de edad en comparación con los animales de mayor edad (7, 14, 21 y 28), además describen que solo TLR5 mostró un nivel de expresión significativamente diferente según el sistema de alimentación, TLR1, TLR2, TLR5, TLR8 y TLR10 mostraron una expresión dependiente de la edad. Esto podría explicar los resultados obtenidos en el presente estudio para TLR5 en el día 7 donde a los animales se les empieza a ofrecer dieta sólida basada en alimento concentrado.

La proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1 elimina principalmente a las bacterias Grampositivas; sin embargo, la PGLYRP1 bovina tiene afinidad para eliminar hongos, así como para neutralizar el ácido lipoteicoico y los lipopolisacáridos. La proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1 se expresa exclusivamente en leucocitos polimorfonucleares, esto sugiere que los productos

microbianos deban llegar al tejido epitelial para activar PGLYRP1 (Malmuthuge *et al.*, 2012; Abecia *et al.*, 20017)

Malmuthuge *et al.*, (2012), realizó un estudio con becerros de 3 semanas y 6 meses de edad, sus resultados muestran que hay una menor expresión de TLR en los animales de mayor edad en comparación con los jóvenes, además la expresión de la mayoría de los TLR fue más baja en el rumen en comparación con las otras regiones del tracto gastrointestinal. Liang *et al.*, (2016) analizó la expresión de TLR2, TLR4, TLR6 y TLR10 en íleon y yeyuno de becerros de 0, 7, 21 y 42 días de edad, reportando que hay una mayor expresión de TLR2 en íleon que en el yeyuno, se señala que esto puede deberse a que el sistema inmunológico de las mucosas de los tejidos puede tener un desarrollo diferente en el útero, lo cual causa que cada región del tracto gastrointestinal posea distintas respuestas inmunológicas. De igual forma se ha visto que tales cambios en la respuesta inmunológica en los distintos segmentos del tracto gastrointestinal pueden estar asociado con la variación en la colonización microbiana después del parto. Además bacterias específicas de la mucosa del intestino delgado que no se identificaron en otras regiones del tubo gastrointestinal, indican que dichas bacterias específicas de la mucosa pueden sobrevivir a los mecanismos de defensa inmunitaria de la mucosa y pueden ser cruciales para preparar el sistema inmunológico de la mucosa del huésped (Malmuthuge *et al.*, 2014).

Villena *et al.*, (2014), analizó la expresión de RNAm de TLR en células de epitelio intestinal bovino y demostró que todos los genes de TLR se expresaban en las células, TLR1, TLR3, TLR4 y TLR6 tuvieron alta expresión, seguidos de TLR5, TLR8, TLR9, TLR10, TLR2 y TLR7 en ese orden.

En varios estudios donde se realizaron análisis de correlación entre la población bacteriana total y la expresión de los TLR, se observó una disminución dependiente de la edad en la expresión del gen TLR y un aumento de linfocitos T como las células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la mucosa del yeyuno. Aunque existen variaciones regionales en la distribución de las células inmunes en todo el intestino, se ha reportado la colonización bacteriana y sus distintas distribuciones regionales,

pueden contribuir al patrón de expresión de TLR observado. Tales cambios pueden causar una disminución de la inmunidad innata y un aumento de la inmunidad adaptativa con la edad. Esta regulación a la baja dependiente de la edad de la inmunidad innata protege al huésped de respuestas inflamatorias dañinas a las bacterias comensales (Malmuthuge *et al.*, 2014; Abecia *et al.*, 2015; Amin *et al.*, 2021). Lo cual es consistente con los datos obtenidos en este trabajo y en el de Liang *et al.*, (2016), donde la expresión de los TLRs disminuye para los días 7 y 28 pero vuelve a aumentar para el día 42 mostrando una estabilización conforme se van estableciendo las poblaciones bacterianas.

Se ha visto que hay una correlación negativa para TLR2 y TLR9 en yeyuno y rumen; para el caso TLR5 y TLR6 mostraron una correlación negativa con densidad bacteriana asociada a la mucosa del rumen (Menzies *et al.*, 2006; Malmuthuge *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2016). De igual forma Malmuthuge *et al.*, 2014, reporta que hay una correlación negativa entre la densidad de bacterias ácido-lácticas (LAB) con la expresión de TLR2 en el yeyuno. Esta hiporrespuesta de los TLR de las mucosas a la población de bacterias Grampositivas predominantes (como los del filo *Firmicutes*) presentes en intestino delgado puede ser un mecanismo del huésped para evitar las respuestas inmunes a las bacterias comensales (Malmuthuge *et al.*, 2014).

La baja expresión relativa de TLR 1, 2 y 4 determinada en el yeyuno coincide con informes anteriores de que los TLR 2 y 4 son apenas detectables en el intestino (Cario y Podolsky, 2000). Los TLR 2, 6, 7 y 10 son más abundantes en las placas de Peyer y en los linfonodos mesentéricos de yeyuno, en los cuales se ha demostrado anteriormente que expresan estos TLR, y que poseen células inmunitarias que los expresan incluidos monocitos, células B y células T (Menzies *et al.*, 2006).

Abecia *et al.*, (2015), señala que los filos que colonizan inicialmente el rumen como *Proteobacteria* son principalmente Gramnegativos. Sin embargo, con la edad, las proporciones de los grupos colonizadores cambian disminuyendo las *Proteobacterias* y filos como *Bacteroidetes* o los *Firmicutes* aumentan en

dependencia de la dieta. Estos resultados junto con los obtenidos en este trabajo sugieren que las variaciones en la población bacteriana con el tiempo pueden representar variaciones en los ligandos bacterianos que podrían desempeñar un papel importante en la modulación de la expresión de TLR y las respuestas inmunitarias innatas de la mucosa.

### **Expresión de miRNA**

Para realizar los análisis de expresión diferencial (DE), Enriquecimiento de ontologías (GO) y vías metabólicas, de los miRNA estos se analizaron por tiempos, donde la DE temporal se realizó analizando el día 0 vs día 7; el día 7 vs día 28 y el día 28 vs día 42.

Para la DE 0vs7 en rumen, se encontraron 16 miRNA expresados diferencialmente (cuadro 2) de un total de 919 miRNA secuenciados, de los cuales mir-375 y mir-656 están regulados a la baja, mientras los otros 14 se encuentran regulados al alza (Figura 8A). Mir-21-3p, mir-378 fueron los miRNA con más genes diana con 54 y 87 genes, respectivamente. En el caso de yeyuno (cuadro 8) se encontraron 21 miRNA expresados diferencialmente, de los cuales, caso contrario a lo observado en rumen solo tres miRNA se encuentran regulados al alza: miR-503-5p, miR-146a, miR-147 (Figura 9A).

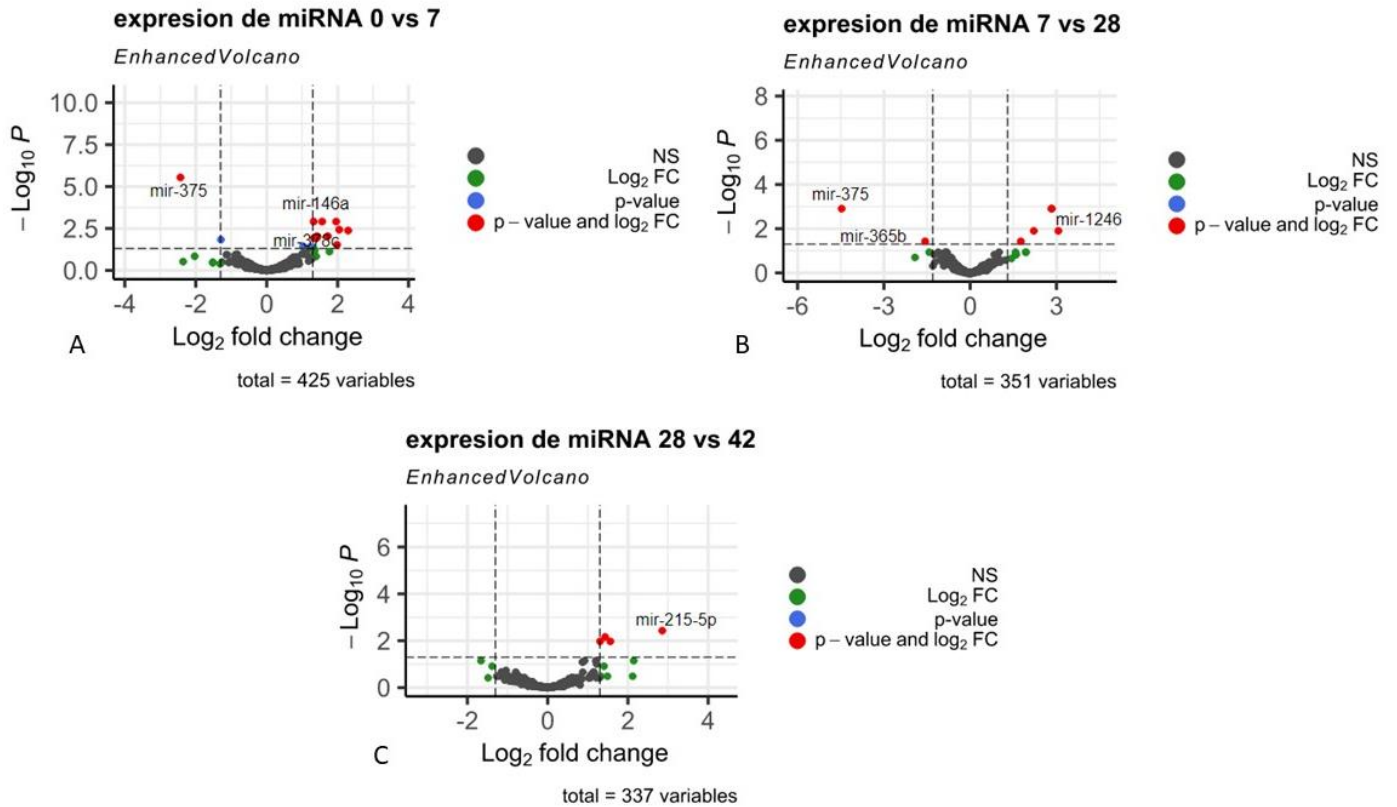
Al análisis del GO, para rumen se detectaron 30 procesos biológicos mayormente enriquecidos ( $p.FDR < 0.05$ ), destacando para este trabajo aquellos relacionados con respuestas inmunes donde podemos encontrar procesos como la vía de señalización de los TLR, con genes como TRAF6, MAPK10, IRAK1 involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune, también regula procesos de apoptosis celular, así como de células T mediadas por citosinas; ATP2B1 involucrados en la regulación negativa de la producción de citocinas, regulación de la contracción del músculo liso vascular, homeostasis de iones de calcio celular (Rafferty *et al.*, 2010). Además, 26 vías KEGG también se enriquecieron significativamente en el periodo de los 0 a los 7 días, donde también se destacan procesos de relacionados con respuesta inmune, y la vía de señalización de MAPK, estas vías transmiten, amplifican e integran señales de una amplia gama de estímulos y provocan una

respuesta fisiológica apropiada que incluye proliferación celular, diferenciación, desarrollo, respuestas inflamatorias y apoptosis en células de mamíferos, lo cual es consistente con un desarrollo primario de los animales (cuadro 3).

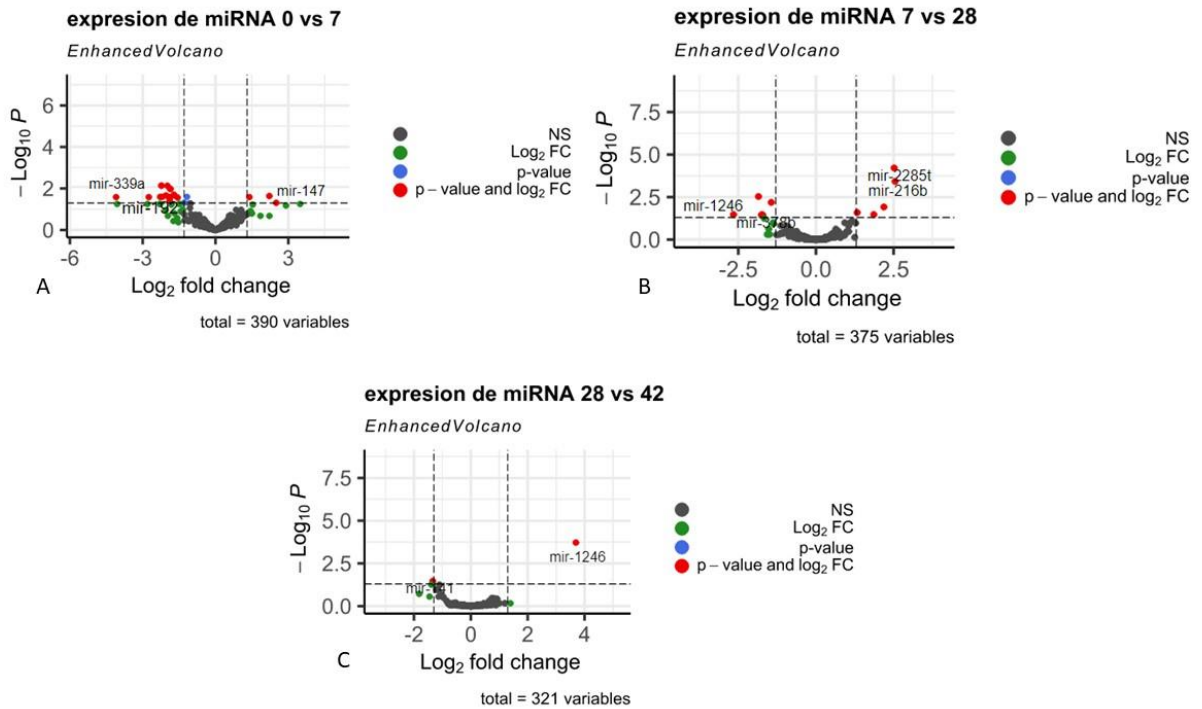
Para el caso de yeyuno, en el análisis GO se detectaron 50 procesos biológicos (p.FDR < 0.05), donde se destaca principalmente la traducción de señales esto se define como el proceso celular en el que se transmite una señal para desencadenar un cambio en la actividad o el estado de una célula esta ontología cubre la señalización de los receptores ubicados en la superficie de la célula y la señalización a través de moléculas ubicadas dentro de la célula. Entre estos se puede mencionar aquellas vías de la regulación de la respuesta inmune innata via TLR.

Para las vías KEGG se encontraron 26 vías enriquecidas significativamente, siendo la ruta de cáncer la expresada principalmente; estos miRNA que activan estas vías metabólicas también están implicados en la activación de la respuesta inmune.

Al analizar la DE 7vs28 en el rumen la cantidad de miRNA disminuyó en comparación a 0 vs 7, encontrando 7 miRNA diferencialmente expresados con mir-375 y mir-183-5p regulados a la baja (Figura 8B). Para yeyuno vemos un comportamiento similar con 11 miRNA diferencialmente expresados, con miR-2285n y miR-503-5p regulados a la baja, este último cambia su regulación de alza en el día 0vs7 a baja en el día 7vs28 (Figura 9B).



**Figura 8.** Gráfico de volcán de resultados de expresión diferencial de miRNA en el rumen. A) expresión diferencial entre los animales de nacidos en el día 0 y el día 7. B) expresión diferencial entre los animales de nacidos en el día 7 y el día 28. C) expresión diferencial entre los animales de nacidos en el día 28 y el día 42.



**Figura 9.** Gráfico de volcán de resultados de expresión diferencial de miRNA en el yeyuno. A) expresión diferencial entre los animales en el día 0 y el día 7. B) expresión diferencial entre los animales en el día 7 y el día 28. C) expresión diferencial entre los animales de nacidos en el día 28 y el día 42.

El GO para el día 7vs28 reveló un total de 13 procesos biológicos enriquecidos ( $p.FDR < 0.05$ ) una elevada proporción de funciones relacionadas con la transcripción y traducción de los ácidos nucleicos, además de ser funciones encargadas de la génesis de miRNAs. Al análisis de las vías KEGG se detectaron 10 vías enriquecidas, donde podemos mencionar la vía JAK-STAT, es una cadena de interacciones entre proteínas en una célula y está involucrada en procesos como la inmunidad, la división celular, la muerte celular y la formación de tumores (cuadro 6).

En el caso de yeyuno se encontraron 26 procesos con un enriquecimiento de ontologías significativo ( $p.FDR < 0.05$ ), vemos que una de las principales funciones enriquecidas es el desarrollo de estructuras anatómicas, desde una condición inicial hasta su estado maduro, lo cual nos podría indicar su papel en la maduración del tubo digestivo. Las vías KEGG tuvieron un enriquecimiento significativo, siendo este



la vía de señalización de FOXO, que regula muchos procesos fisiológicos celulares como el ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo y el estrés oxidativo, la regulación inmunitaria. Esta vía también se comunica con otras de importancia como lo son la vía JAK-STAT, vía PI3K-AKT y la diferenciación de células T (cuadro 15, cuadro 16).

Para la DE 28vs42 en rumen vemos el mismo comportamiento de disminución de los miRNA, encontrando para este periodo de tiempo un total de 4 miRNA diferencialmente expresados todos regulados al alza (Figura 8C). En el caso de yeyuno los miRNA expresados también disminuyen con 1 miRNA altamente expresado (Figura 9C).

Para el tiempo 28vs42 se detectaron 4 procesos biológicos enriquecidos ( $p.FDR < 0.05$ ), la mayoría de estos relacionados con procesos de desarrollo y replicación celular y con la transcripción de la polimerasa II, encargada de la biogénesis de los miRNA (cuadro 8). Para las vías KEGG se encontraron 3 vías enriquecidas, principalmente las vías de miRNA en cáncer, que como ya se mencionó están relacionadas con la actividad de la respuesta inmune y su comunicación con vías como la JAK-STAT, de igual forma se encontró una expresión de la vía de las pentosas fosfato que se relaciona con el metabolismo de los carbohidratos y junto con esta la tercer vía expresada la proteólisis con lo cual vemos que en este periodo hay un alza en la actividad digestiva del rumen (cuadro 9).

Se encontraron en yeyuno 6 procesos biológicos altamente expresados, con funciones como proteólisis y desarrollo de estructuras anatómicas con lo que de igual manera vemos un mayor desarrollo y maduración del tubo digestivo así como un aumento en la funcionalidad de este (cuadro 17). Para las vías KEGG no se encontró un enriquecimiento significativo, sin embargo, se encontraron genes involucrados en vías KEGG de interés como CHAC1 en el metabolismo del glutatión, GABARAPL2 involucrado en las vías FOXO, así como en los receptores tipo NOD (cuadro 18).

Al analizar los genes diana de los miRNA diferencialmente expresados es posible evaluar su función en el organismo gracias al enriquecimiento de los términos GO,

así como las vías metabólicas en las que estos pueden participar, y su función en el desarrollo del tubo digestivo.

Además de las funciones en el desarrollo del rumen y yeyuno, los genes diana de los miRNA DE también se enriquecieron para importantes funciones de inmunidad, estos términos GO enriquecidos sugieren la participación en funciones moleculares esenciales para el desarrollo de tejidos. Otros de los genes objetivo de los miRNA DE son aquellos necesarios para las actividades de los factores de transcripción, así como los implicados en la regulación de la expresión génica, por lo que los miRNA DE implicados podrían interactuar con los factores de transcripción para regular los procesos de desarrollo del TGI.

Los genes diana de los miRNA DE también se enriquecieron en varios términos GO y vías KEGG relacionadas con la matriz extracelular (MEC), lo que sugiere su participación en el desarrollo y la función de la MEC. La MEC proporciona soporte estructural y bioquímico a las células circundantes y la remodelación de la MEC es crucial para el desarrollo. La interacción MEC-receptor conduce al control directo o indirecto de actividades celulares tales como adhesión, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis, que son de las vías KEGG más significativamente enriquecida para los genes diana de los miRNA DE en este estudio. Otro camino importante relacionado con el MEC llamado adhesión focal también se enriqueció significativamente encontrando este término en las dos regiones en estudio presente en todas las edades. La adhesión focal es una estructura especializada de la MEC en la que los filamentos de actina se anclan a los receptores transmembrana de la familia de las integrinas a través de un complejo multimolecular de proteínas de la placa de unión. La vía de adhesión focal es importante para la movilidad celular.

Se ha visto que mir-375 está relacionado con funciones como proliferación celular, lactación, desarrollo de glándula mamaria y sobre los procesos en el que las células neuro-epiteliales del tubo neural adquieren características estructurales y/o funcionales especializadas de las neuronas motoras viscerales como parte del desarrollo de los animales. Birinci *et al.*, (2020) reportó que este miRNA puede ser

secretado en vesículas que pueden regular la comunicación célula – célula. Wicik *et al.*, (2016) reportó que miRNA-375 está involucrado en el proceso de lactancia y en la glándula mamaria, planteado que estas vesículas pueden ser liberadas en la leche materna y ser consumida por el animal contando así con una vía de transferencia de miRNA involucrados en el desarrollo de la respuesta inmune, lo que explicaría su presencia en los animales de los 0 y los 7 días. Luoreng *et al.*, (2018), reportaron que este miRNA es uno de los más regulados a la baja en el tejido mamario cuando se presentan infecciones con *S. aureus* y *E. coli*, lo que sugiere que participa en la regulación de la respuesta inmunitaria e inflamación inducidas por las bacterias presentes.

Otro de los miRNA que ha mostrado respuestas a infecciones bacterianas corresponde a la familia mir-192/215. Zi *et al.*, (2018), reportó que mir-192 puede estar involucrado en el proceso de regulación de las infecciones causadas por *E. coli*, lo que podría llevar a este miRNA a ser un biomarcador para enfermedades como diarrea en becerros.

Por su parte Mukiibi *et al.*, (2020), en su estudio describieron a mir-192 como uno de los más abundantes en hígado de rumiantes, además de que la familia mir-192/215 tiene varios homólogos entre especies lo que le confiere a este miRNA varias funciones biológicas, en ratones para regular genes implicados en el metabolismo de la glucosa, adhesión y migración; en ovejas, se ha informado que miR-192 participa en la regulación del crecimiento y desarrollo del músculo esquelético, consistente con los datos obtenidos en este estudio de una alta expresión de mir-192 en animales en crecimiento y desarrollo. Liang *et al.*, (2014), reportó que mir-192/215 puede estar relacionado con la diferenciación de leucocitos y el desarrollo de tejidos linfoides en el yeyuno, sin embargo aunque el autor reportó una mayor expresión de este miRNA en yeyuno que en rumen, sin embargo, en el presente estudio se encontró una mayor expresión de mir-192 en rumen, demostrando que también puede intervenir en el desarrollo de la respuesta inmune del rumen.

Tal como algunos miRNA tiene homólogos en otras especies, Lawless et al., (2014), reportan que hay miRNA que son especie específico, tal es el caso de la familia mir-2284 y 2285 en los bovinos donde estos tienen como blanco a más de 100 miRNA maduros involucrados con tejidos inmuno-relevantes como monocitos CD14 y macrófagos alveolares.

Hanif *et al.*, (2018), encontraron que la familia mir-2285 y la familia mir-2284 estaban asociadas con varios TLR, regulando así la respuesta inmunitaria innata inespecífica reduciendo las respuestas proinflamatorias, colaboran con linfocitos CD8<sup>+</sup> que desempeñan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmunitaria hacia microorganismos intracelulares, así como en la formación de células B. Sugiriendo que los mir-2285 y mir-2284 podría desempeñar uno de los papeles clave en la resistencia de los becerros a patógenos vía respuesta inmune innata. Esto puede brindar una perspectiva prometedora sobre funciones adaptativas, moleculares y biológicas que les confiere a los animales de trópico una mayor resistencia tanto a enfermedades, como al medio ambiente en el que se desarrollan.

Al igual que en este trabajo, Wang et al., (2016), reporto una alta expresion de mir-378 en rumen asociados a la proliferación y diferenciacion celular, esto también es consistente con lo reportado por Tong et al., (2018). De igual forma Ma et al., (2019), reportaron que el uso de mir-378 y mir-185 pueden servir como biomarcadores de calidad e inocuidad de la leche, comprobando que estos miRNA pueden estar en el medio ambiente en exosomas en la leche y ser transferidos de la madre a los becerros.

Como se describió anteriormente mir-21 es uno de los miRNA que tuvo una mayor cantidad de genes blanco, es por esto que se han reportado diferentes funciones para el mir-21 bovino, Do et al., (2019), informaron que las dietas de forraje de baja calidad influyeron en la expresión de miRNA asociados con la eficiencia del alimento y el nitrógeno, como miR-99b o miR-21-3p en el rumen. Además, miR-21-3p ruminal podría regular el transporte de aminoácidos al dirigirse al gen de la subunidad alfa 2 transportadora de ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (ATP1A2) (Wang et al., 2016). Por su parte

Gecaj et al., (2017), describió a bta-miR-21-5p y bta-miR-143 como dos especies muy abundantes independientemente de la etapa funcional o de desarrollo del cuerpo lúteo en bovinos, cumpliendo también un papel fundamental en el desarrollo reproductivo en los animales.

Otro miRNA detectado en el presente estudio se ha relacionado con el desarrollo reproductivo es mir-183. Gebremedhn et al., (2014, 2015), han descrito al mir-183 en etapas específicas en las células de la granulosa respalda el papel potencial de los miRNA en la regulación postranscripcional de genes durante el desarrollo folicular, principalmente la ovulación y la atresia folicular.

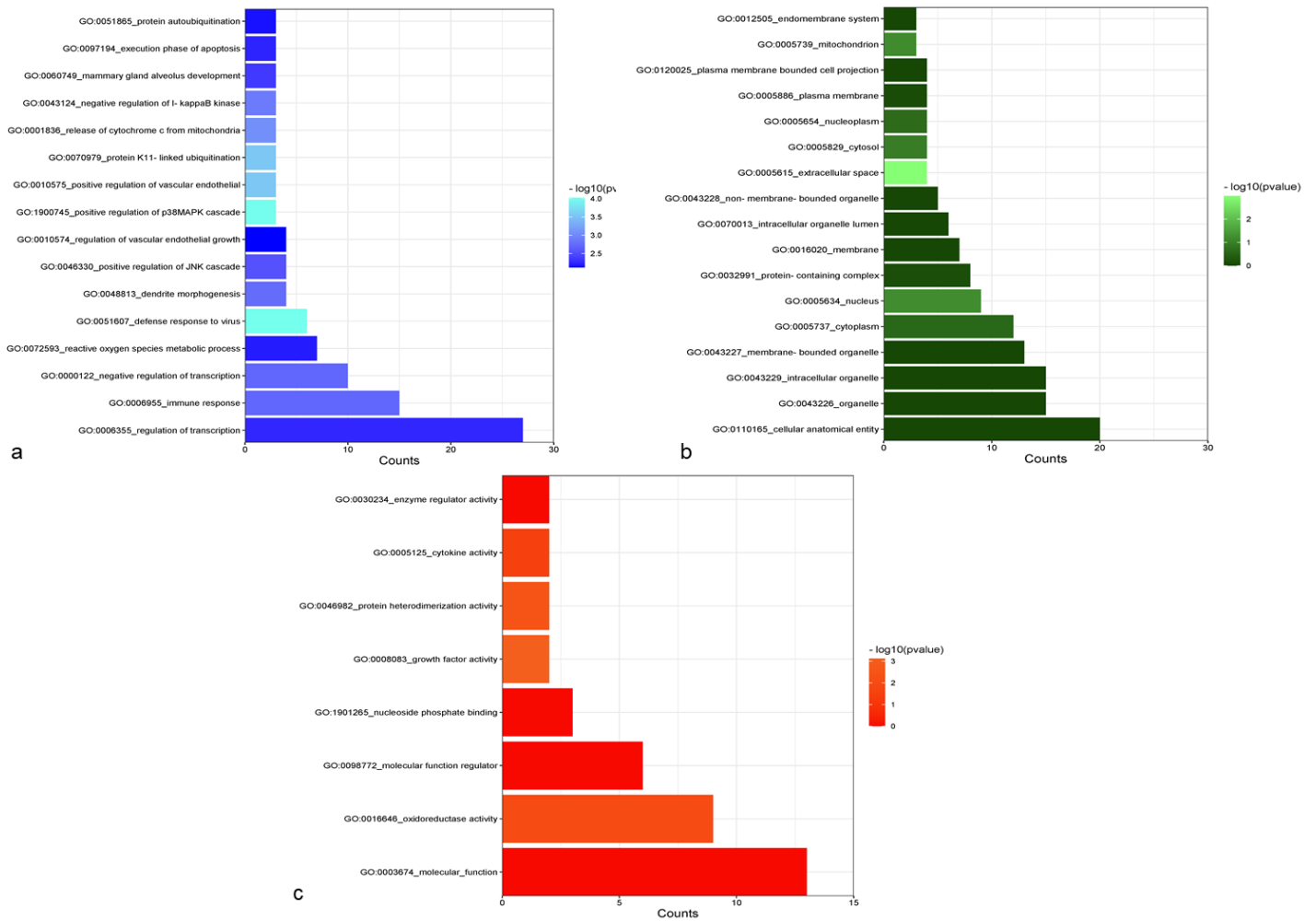
De igual forma los miRNA pueden ayudar a mejorar los parámetros productivos y de calidad de la canal en los animales por ejemplo Kappeler et al., (2019), en su estudio sobre miRNA involucrados en la ternera de la carne encontraron que el clúster mir-182, mir-183, estaba regulado al alza, el análisis funcional identificó vías importantes relacionadas con la ternera, como la apoptosis y el sistema calpaína-calpastatina.

Los trabajos de Sengar et al., (2018), Yadav et al., (2021), detectaron una regulación positiva en la expresión de bta-mir-1248, bta-mir-2332, bta-mir-2478 y bta-mir-1839, mientras que se redujo la expresión de bta-mir-16a, bta-let-7b, bta-mir-142 y la expresión de bta-mir-425 bajo estrés por calor en el verano en comparación con el invierno. Sus patrones de expresión diferencial en varios miRNA podrían afectar las vías metabólicas del organismo y, por lo tanto, regular la termotolerancia en el ganado tropical que puede ayudar al desarrollo de biomarcadores basados en miRNA para seleccionar ganado termorresistente mejorando las características para los hatos lechero y que permita resistir el estrés calórico.

**Cuadro 2.** miRNA expresados diferencialmente entre el día 0 y el día 7 en rumen

0 vs 7	logFC	logCPM	P Valor	FDR
miR-375	-2.43	7.05	6.74E-09	2.86E-06
miR-378c	1.56	9.14	9.69E-06	1.23E-03
miR-21-3p	1.96	2.13	9.87E-06	1.23E-03
miR-21-5p	1.33	14.40	1.16E-05	1.23E-03
miR-142-3p	2.05	5.89	4.38E-05	3.72E-03
miR-2285t	2.30	1.60	5.96E-05	4.22E-03
miR-146a	1.72	6.86	1.72E-04	9.15E-03
miR-378	1.42	11.80	1.72E-04	9.15E-03
miR-378	1.43	11.87	2.09E-04	9.86E-03
miR-142-5p	1.34	6.78	2.91E-04	1.17E-02
miR-18a	1.41	3.72	3.04E-04	1.17E-02
miR-656	-1.29	3.17	4.17E-04	1.48E-02
miR-378d	1.99	6.11	9.20E-04	3.01E-02
miR-455-5p	1.03	8.66	1.18E-03	3.58E-02
miR-33a	1.22	3.14	1.54E-03	4.12E-02
miR-147	1.30	5.78	1.55E-03	4.12E-02

Por sus siglas en ingles: logFC = logarithm fold change, logCPM = logarithm of counts per millions, FDR = False Discovery Rate.



**Figura 10.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 0 al día 7 postnatal en rumen. a) Top 20 de los procesos biológicos enriquecidos del día 0 al día 7 en rumen. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 0 al día 7 en rumen. c) Top 20 de las funciones moleculares enriquecidas del día 0 al día 7 en rumen.

**Cuadro 3.** Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 0 al día 7 en rumen

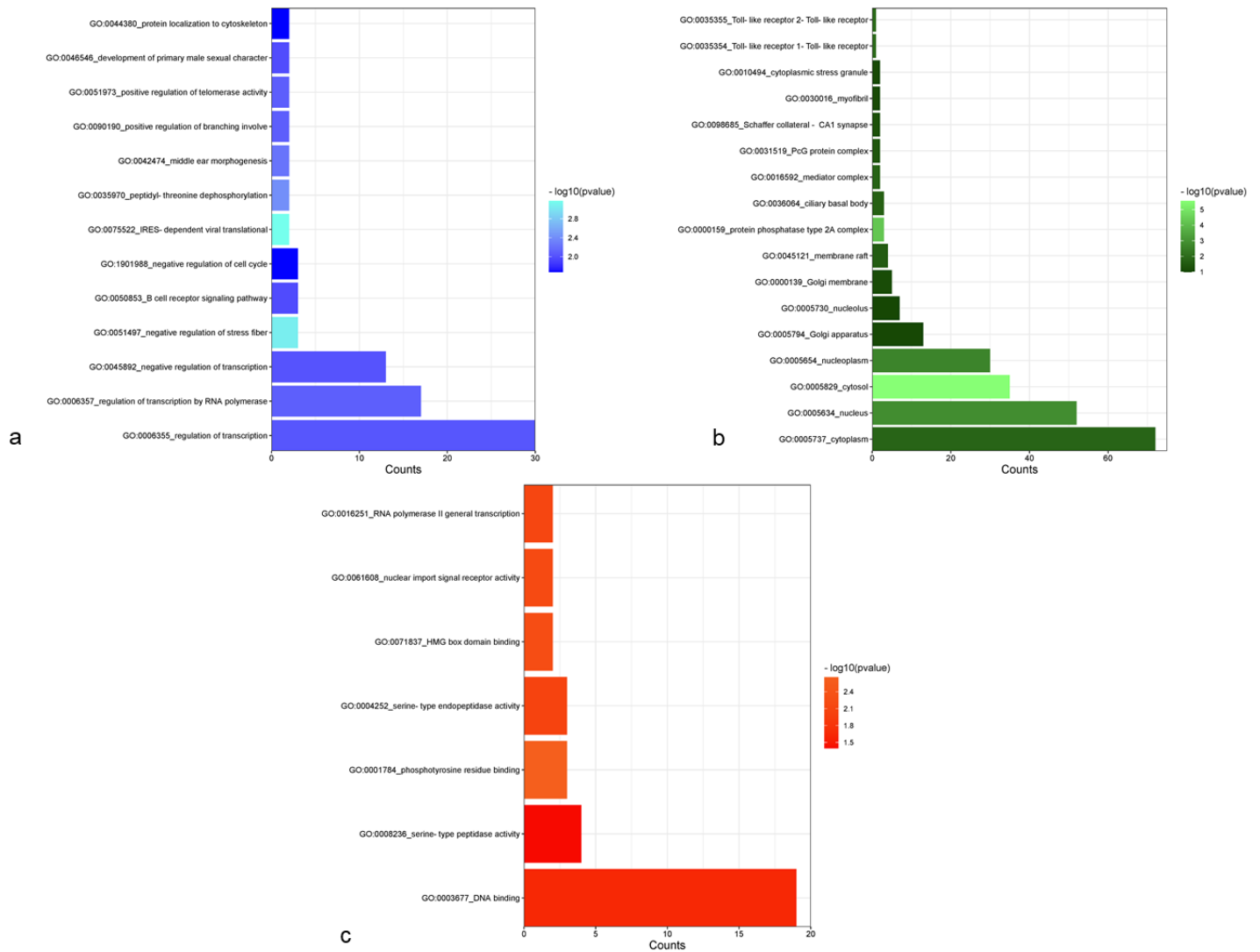
vía KEGG	Genes	%	Pval	Benjamini
MAPK signaling pathway	11	5.5	0.00033	0.072
Pertussis	5	2.5	0.0057	0.46
Apoptosis	6	3	0.01	0.46
Spinocerebellar ataxia	6	3	0.011	0.46
Alcoholic liver disease	6	3	0.014	0.46
Measles	6	3	0.016	0.46
Cellular senescence	6	3	0.018	0.46
Hepatitis C	6	3	0.021	0.46
Protein processing in endoplasmic reticulum	6	3	0.021	0.46
Hepatitis B	6	3	0.023	0.46
Oocyte meiosis	5	2.5	0.025	0.46
Neurotrophin signaling pathway	5	2.5	0.026	0.46
Cell cycle	5	2.5	0.028	0.46
Mitophagy - animal	4	2	0.03	0.46
FoxO signaling pathway	5	2.5	0.032	0.48
Proteoglycans in cancer	6	3	0.04	0.52
Prolactin signaling pathway	4	2	0.042	0.52
Autophagy - animal	5	2.5	0.044	0.52
Colorectal cancer	4	2	0.049	0.52
Ubiquitin mediated proteolysis	5	2.5	0.049	0.52
Progesterone-mediated oocyte maturation	4	2	0.05	0.52
Small cell lung cancer	4	2	0.056	0.56
Pathways in cancer	10	5	0.061	0.58
Ras signaling pathway	6	3	0.076	0.7
NF-kappa B signaling pathway	4	2	0.084	0.74
Toxoplasmosis	4	2	0.088	0.74



**Cuadro 4.** miRNA expresados diferencialmente entre el día 7 y el día 28 en rumen

7 vs 28	logFC	logCPM	PValue	FDR
miR-375	-4.467	4.564	7.39E-06	1.24E-03
miR-1248	2.831	3.001	1.06E-05	1.24E-03
miR-1248	2.831	3.001	1.06E-05	1.24E-03
miR-365b-5p	2.212	2.350	1.57E-04	1.25E-02
miR-1246	3.065	2.740	1.79E-04	1.25E-02
miR-183-5p	-1.566	7.048	7.07E-04	3.73E-02
miR-132-5p	1.760	3.185	7.44E-04	3.73E-02

Por sus siglas en ingles: logFC = logarithm fold change, logCPM = logarithm of counts per millions, FDR = False Discovery Rate.



**Figura 11.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 7 al día 28 postnatal en rumen. a) Top 20 de los procesos biológicos enriquecidos del día 7 al día 28 posnatal en rumen. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 7 al día 28 posnatal en rumen. c) Top 20 de las funciones moleculares enriquecidas del día 7 al día 28 posnatal en rumen.

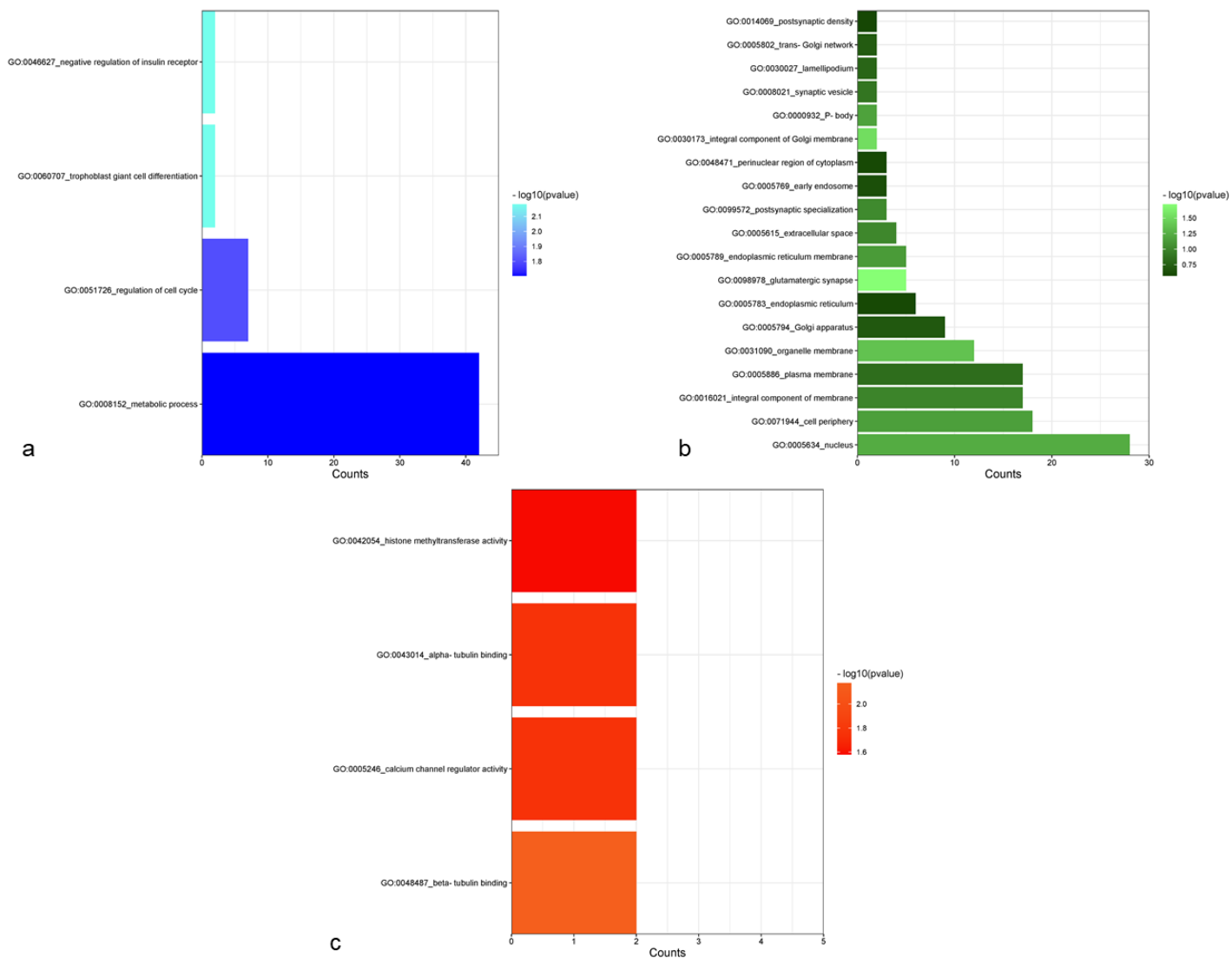
**Cuadro 5.** Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 7 al día 28 en rumen

Vía KEGG	Genes	%	P-Value	Benjamini
Dopaminergic synapse	6	3.6	0.0042	0.67
Autophagy - other	3	1.8	0.028	1
GABAergic synapse	4	2.4	0.036	1
Oocyte meiosis	4	2.4	0.072	1
Serotonergic synapse	4	2.4	0.072	1
AMPK signaling pathway	4	2.4	0.077	1
PI3K-Akt signaling pathway	7	4.1	0.081	1
JAK-STAT signaling pathway	5	3	0.086	1
Regulation of actin cytoskeleton	5	3	0.095	1

**Cuadro 6.** miRNA expresados diferencialmente en rumen entre el día 28 y el día 42 en rumen

28 vs 42	logFC	logCPM	PValue	FDR
miR-215-5p	2.85	7.15	1.09e-05	0.003
miR-182-5p	1.43	7.93	4.07e-05	0.006
miR-192-5p	1.30	9.53	9.92e-05	0.010
miR-30a-5p	1.56	12.79	1.26e-04	0.010

Por sus siglas en ingles: logFC = logarithm fold change, logCPM = logarithm of counts per millions, FDR = False Discovery Rate.



**Figura 12.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 28 al día 42 postnatal en rumen. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en rumen. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en rumen. c) Funciones moleculares enriquecidas del día 28 al día 42 posnatal en rumen.

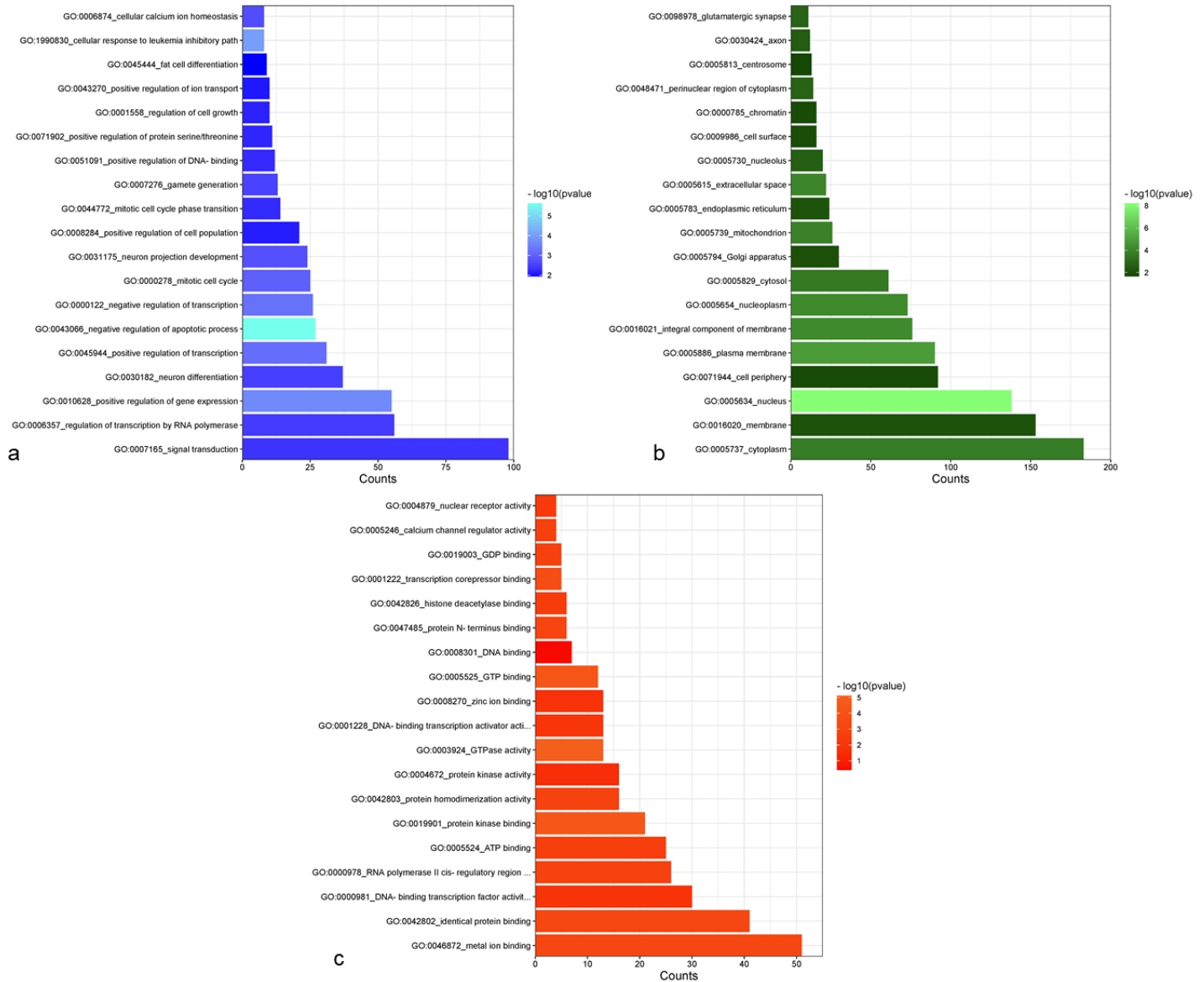
**Cuadro 7.** Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 28 al día 42 en rumen

Vía KEGG	Genes	%	P-Value	Benjamini
MicroRNAs in cancer	5	6.7	0.017	1
Pentose phosphate pathway	2	2.7	0.092	1
Ubiquitin mediated proteolysis	3	4	0.094	1

**Cuadro 8.** miRNA expresados diferencialmente entre el día 0 y el día 7 en yeyuno

0 vs 7	logFC	logCPM	PValue	FDR
miR-339a	-2.23	9.06	3.73E-05	7.28E-03
miR-339b	-2.23	9.06	3.73E-05	7.28E-03
miR-339b	-1.98	7.47	5.68E-05	7.38E-03
miR-210	-1.87	6.83	1.28E-04	1.04E-02
miR-362-5p	-1.86	6.27	1.34E-04	1.04E-02
miR-185	-1.71	8.60	3.04E-04	1.98E-02
miR-660	-1.71	8.18	4.35E-04	2.16E-02
miR-194	-2.04	15.66	4.43E-04	2.16E-02
miR-503-5p	2.22	3.53	5.31E-04	2.30E-02
miR-194	-1.93	15.70	7.66E-04	2.54E-02
miR-378b	-2.28	5.19	7.98E-04	2.54E-02
miR-26b	-1.18	13.31	8.05E-04	2.54E-02
miR-30b-3p	-2.19	2.10	8.48E-04	2.54E-02
miR-2483-5p	-4.09	3.90	1.00E-03	2.60E-02
miR-146a	1.39	8.57	1.03E-03	2.60E-02
miR-204	-2.75	7.91	1.07E-03	2.60E-02
miR-532	-1.56	9.75	1.24E-03	2.75E-02
miR-31	-1.87	7.10	1.27E-03	2.75E-02
miR-192	-1.89	17.17	1.92E-03	3.94E-02
miR-30c	-1.29	11.28	2.57E-03	4.93E-02
miR-147	2.50	5.57	2.65E-03	4.93E-02

Por sus siglas en ingles: logFC = logarithm fold change, logCPM = logarithm of counts per millions, FDR = False Discovery Rate.



**Figura 13.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 0 al día 7 postnatal en jejuno. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 0 al día 7 posnatal en yeyuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 0 al día 7 posnatal en yeyuno. c) Funciones moleculares enriquecidas del día 0 al día 7 posnatal en yeyuno.

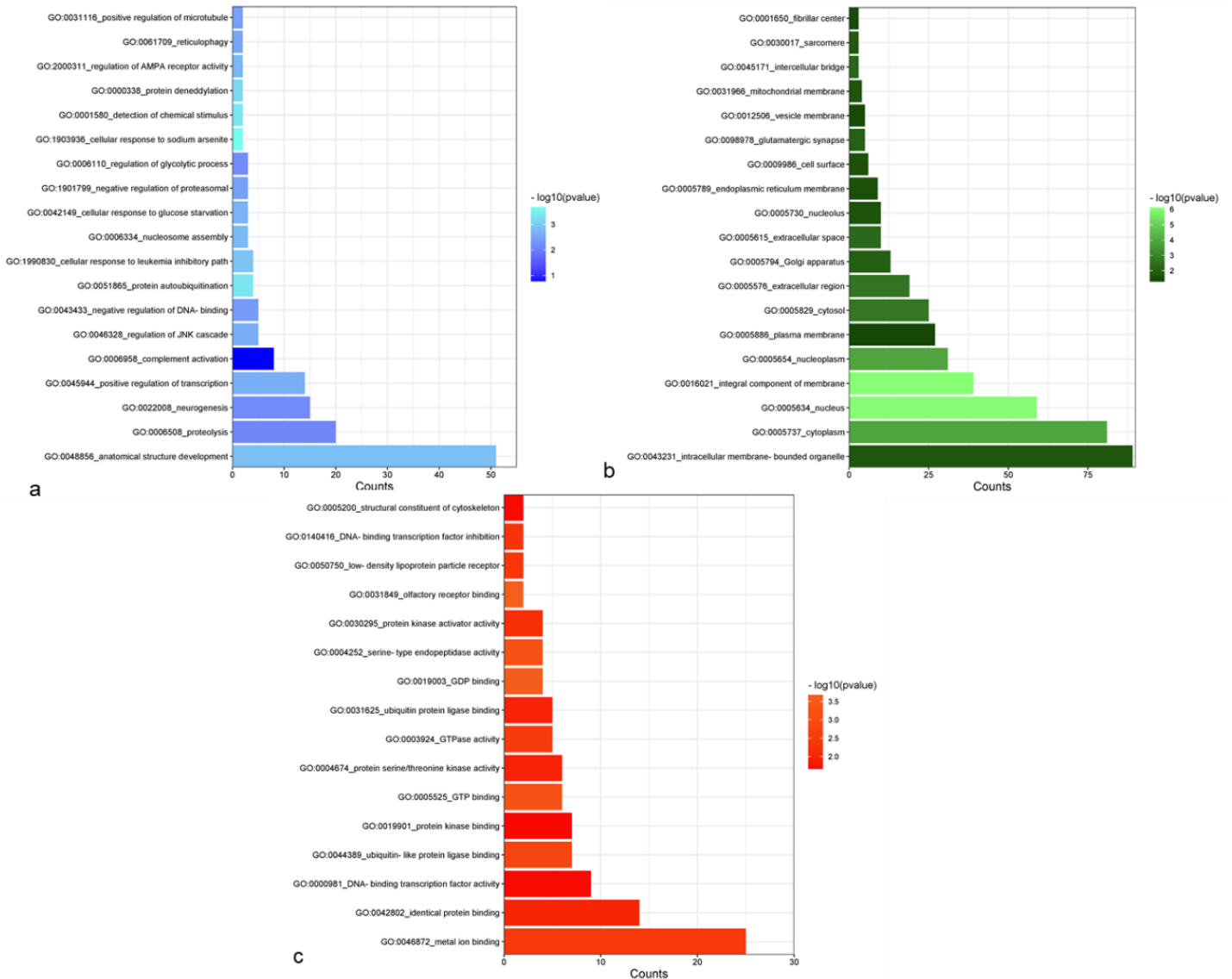
**Cuadro 9.** Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 0 al día 7 en yeyuno

Vía KEGG	Genes	%	P-Value	Benjamini
Pathways in cancer	26	6.2	0.000061	0.016
MicroRNAs in cancer	15	3.6	0.002	0.26
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	9	2.1	0.0076	0.46
Ubiquitin mediated proteolysis	9	2.1	0.0096	0.46
Human papillomavirus infection	15	3.6	0.0098	0.46
Endocytosis	12	2.9	0.011	0.46
FoxO signaling pathway	8	1.9	0.015	0.51
Cellular senescence	9	2.1	0.016	0.51
Transcriptional misregulation in cancer	10	2.4	0.018	0.51
Human T-cell leukemia virus 1 infection	11	2.6	0.019	0.51
Calcium signaling pathway	11	2.6	0.028	0.61
Breast cancer	8	1.9	0.029	0.61
Gastric cancer	8	1.9	0.032	0.61
mTOR signaling pathway	8	1.9	0.037	0.61
PI3K-Akt signaling pathway	14	3.3	0.037	0.61
Cell cycle	7	1.7	0.037	0.61
Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	6	1.4	0.04	0.61
Acute myeloid leukemia	5	1.2	0.045	0.66
Ras signaling pathway	10	2.4	0.055	0.75
Steroid biosynthesis	3	0.7	0.058	0.76
Rap1 signaling pathway	9	2.1	0.066	0.82
Synaptic vesicle cycle	5	1.2	0.071	0.83
p53 signaling pathway	5	1.2	0.073	0.83
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	3	0.7	0.081	0.88
Prolactin signaling pathway	5	1.2	0.084	0.88
Maturity onset diabetes of the young	3	0.7	0.093	0.93

**Cuadro 10.** miRNA expresados diferencialmente entre el día 7 y el día 28 en yeyuno

7 vs 28	logFC	logCPM	PValue	FDR
miR-2285t	2.52	4.12	1.63E-07	6.11E-05
miR-216b	2.55	2.63	2.02E-06	3.79E-04
miR-503-5p	-1.85	3.80	2.36E-05	2.95E-03
miR-3431	-1.44	6.95	6.94E-05	6.51E-03
miR-2285c	2.19	4.08	1.62E-04	1.22E-02
miR-378b	1.33	4.66	4.13E-04	2.58E-02
miR-885	1.86	2.18	6.99E-04	3.37E-02
miR-1246	-2.65	4.69	7.19E-04	3.37E-02
miR-2285n	-1.75	2.22	9.62E-04	3.54E-02
miR-2285n	-1.75	2.22	9.62E-04	3.54E-02
miR-2285n	-1.71	2.28	1.04E-03	3.54E-02





**Figura 14.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 7 al día 28 postnatal en jejuno. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 7 al día 28 posnatal en jejuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 7 al día 28 posnatal en jejuno. c) Funciones moleculares enriquecidas del día 7 al día 28 posnatal en jejuno.

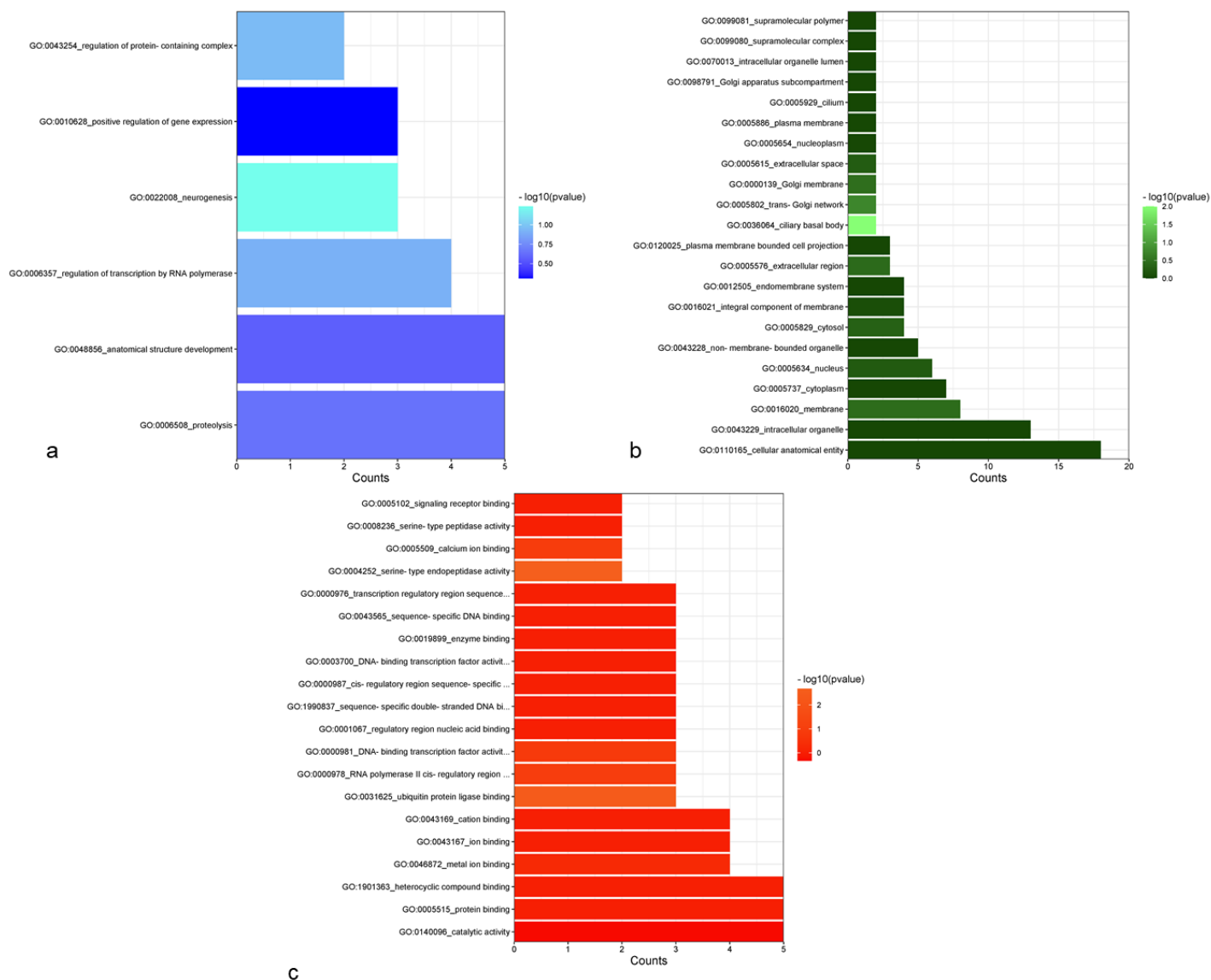
**Cuadro 11.** Vías KEGG enriquecidas para genes diana del día 7 al día 28

Vía KEGG	Genes	%	P-Value	Benjamini
FoxO signaling pathway	5	2.5	0.024	1

**Cuadro 12.** miRNA expresados diferencialmente entre el día 28 y el día 42

28 vs 42	logFC	logCPM	PValue	FDR
miR-1246	3.73	5.60	5.99E-06	2.24E-02

Por sus siglas en ingles: logFC = logarithm fold change, logCPM = logarithm of counts per millions, FDR = False Discovery Rate



**Figura 15.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos en becerros nacidos en el trópico del día 28 al día 42 postnatal en yeyuno. a) Procesos biológicos enriquecidos del día 28 al día 42 postnatal en yeyuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 28 al día 42 postnatal en yeyuno. c) Top 20 de las Funciones moleculares enriquecidas del día 28 al día 42 postnatal en yeyuno.

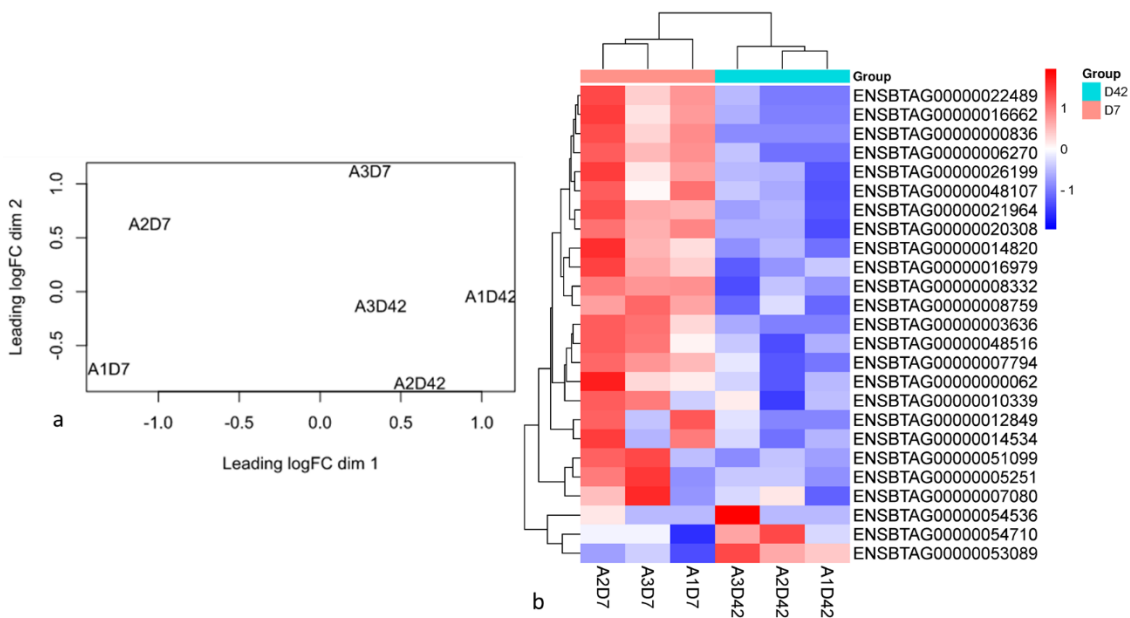
**Cuadro 13.** Genes implicados en Vías KEGG de interés del día 28 al día 42 para yeyuno

ID Ensembl	Gen simbolo	Nombre Gen	Vía KEGG
ENSBTAG00000010371	ChaC	glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1(CHAC1)	bta00480:Glutathione metabolism,bta01100:Metabolic pathways,
ENSBTAG00000006550	GABA	type A receptor associated protein like 2(GABARAPL2)	bta04068:FoxO signaling pathway,bta04136:Autophagy - other,bta04137:Mitophagy - animal,bta04140:Autophagy - animal,bta04621:NOD-like receptor signaling pathway,bta04727:GABAergic synapse,
ENSBTAG00000008612	complement C1r(C1R)	C1r(C1R)	
ENSBTAG00000004557	DHRS9	dehydrogenase/reductase	bta00830:Retinol metabolism,bta01100:Metabolic pathways,
ENSBTAG00000007989	FUT9	fucosyltransferase	bta00515:Mannose type O-glycan biosynthesis,bta00601:Glycosphingolipid biosynthesis-lacto and neolacto series,bta00603:Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series,bta01100:Metabolic pathways,
ENSBTAG00000001872	ORC6	origin recognition complex subunit 6	bta04110:Cell cycle,
ENSBTAG00000020757	PCBP2	poly(rC) binding protein 2	bta04216:Ferroptosis,
ENSBTAG000000054647	RPE	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	bta00030:Pentose phosphate pathway,bta00040:Pentose and glucuronate interconversions,bta01100:Metabolic pathways,bta01200:Carbon metabolism,bta01230:Biosynthesis of amino acids,
ENSBTAG00000018463	VIM	vimentin	bta05169:Epstein-Barr virus infection,bta05206:MicroRNAs in cancer,
ENSBTAG000000050281	ZNF23	zinc finger protein 23	bta05168:Herpes simplex virus 1 infection,
ENSBTAG000000000801	ZNF583	zinc finger protein 583	bta05168:Herpes simplex virus 1 infection,

## Expresión de mRNA en yeyuno

Con el fin de profundizar en la respuesta inmune del tubo digestivo de los animales recién nacidos y su transición a rumiantes, se decidió analizar los cambios que suceden entre el periodo de los 7 a los 42 días de edad en el yeyuno que permitan encontrar genes de interés relacionados con la respuesta inmune.

Como resultado del análisis de mRNA encontramos que la expresión de genes mostró una clara separación en el análisis PCA entre los animales de 7 días y 42 días de nacidos (Fig 16a). De igual forma vemos el comportamiento entre los 20 genes mayormente expresados y su diferencia de expresión entre los días analizados (Fig 16b).

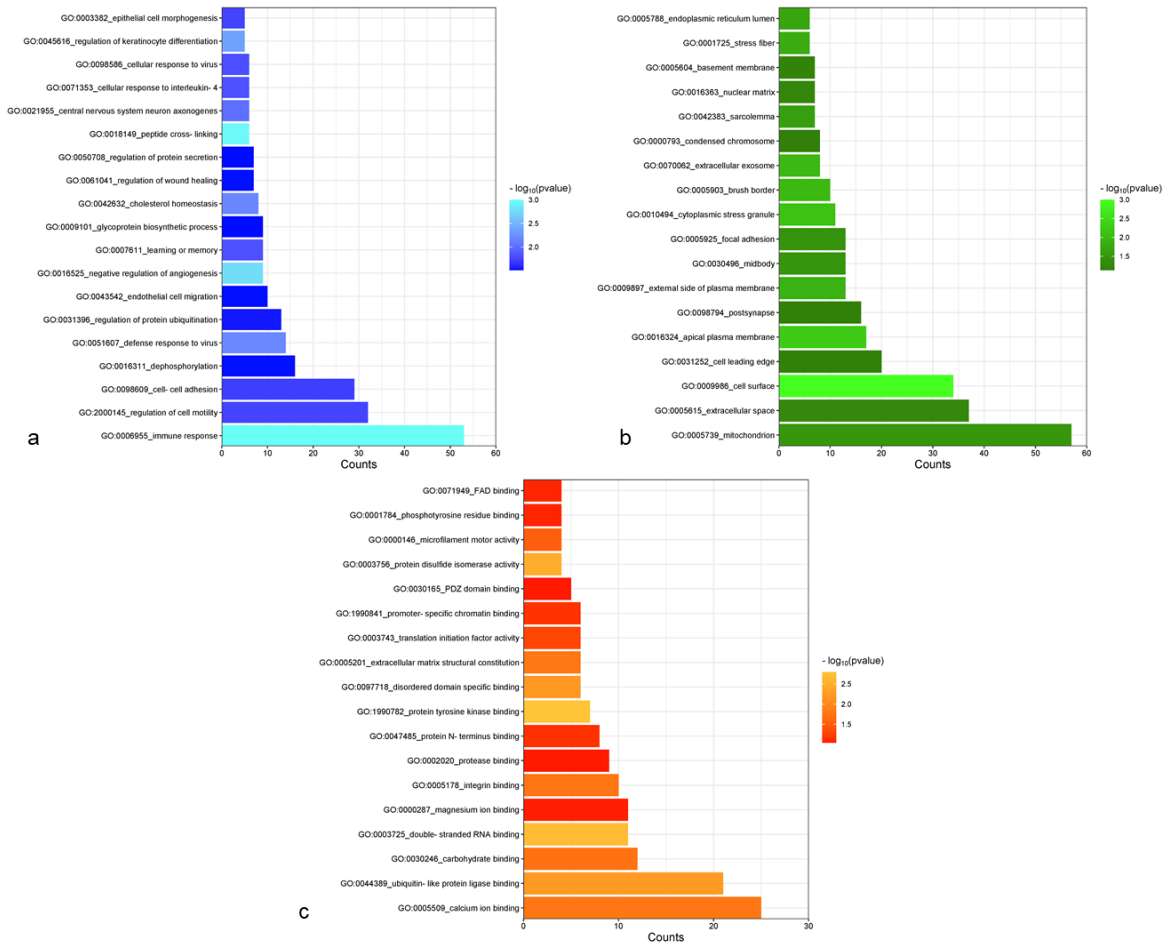


**Figura 16.** a) Analisis de componentes principales (PCA) entre las muestras del día 7 y el día 42. b) Heatmap plot de la abundancia relativa entre muestras de los genes DE.

Al análisis de los términos GO enriquecidos, se detectaron 51 terminos; siendo el termino GO de respuesta inmune el que mas destaca con 322 genes relacionados. Ademas, observaron términos como motilidad celular y adhesión celula-celula, ambos relacionados tanto con la funcionalidad del yeyuno asi como con la

inmunidad y la salud intestinal en general, ya que mantener una buena adhesión célula-célula evita problemas de intestino permeable y mala absorción que pueden causar enfermedades tales como diarrea, mala absorción y desnutrición.

Al análisis de las vías KEGG se encontraron 53 vías enriquecidas, en las cuales destacan algunas de importancia para la inmunidad vías como la interacción MEC-receptor, la adhesión focal, la vía de receptores tipo NOD, la vía PI3K-AKT. Estas interacciones conducen a un control directo o indirecto de actividades celulares, tales como adhesión, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis. Por su parte los receptores NOD, son receptores de reconocimiento de patrones responsables de detectar varios patógenos especialmente bacterias gram + y generar los diferentes mecanismos de la respuesta inmunitaria innata, detectan la presencia citosólica de los fragmentos de peptidoglicano bacteriano que escaparon de los compartimentos endosómicos, lo que impulsa la activación de NF-kappaB y MAPK, la producción de citocinas y la apoptosis.



**Figura 17.** Términos de ontología génica (GO) enriquecidos a partir de RNAm en becerros nacidos en el trópico del día 7 al día 42 postnatal en yeyuno. a) Top 20 de los Procesos biológicos enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. b) Top 20 de los componentes celulares enriquecidos del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno. c) Top 20 de las Funciones moleculares enriquecidas del día 28 al día 42 posnatal en yeyuno

**Cuadro 14.** Top 20 de las Vías KEGG enriquecidas de los mRNA en yeyuno del día 7 al día 42

Vía KEGG	Genes	%	P-Value	Benjamini
Protein processing in endoplasmic reticulum	25	4	3.9E-09	0.0000012
Carbon metabolism	15	2.4	0.000027	0.0034
Biosynthesis of amino acids	12	1.9	0.000034	0.0034
ECM-receptor interaction	13	2.1	0.000047	0.0035
Focal adhesion	20	3.2	0.000058	0.0035
Human papillomavirus infection	26	4.2	0.00043	0.022
Influenza A	16	2.6	0.002	0.085
Phagosome	15	2.4	0.0023	0.087
NOD-like receptor signaling pathway	16	2.6	0.0027	0.087
Amyotrophic lateral sclerosis	25	4	0.0031	0.087
Regulation of actin cytoskeleton	17	2.7	0.0032	0.087
Antigen processing and presentation	10	1.6	0.0039	0.096
PI3K-Akt signaling pathway	24	3.9	0.0055	0.13
Amoebiasis	11	1.8	0.0068	0.14
Protein export	5	0.8	0.0072	0.14
Proteoglycans in cancer	15	2.4	0.01	0.19
Fluid shear stress and atherosclerosis	12	1.9	0.011	0.19
Pathways in cancer	30	4.8	0.011	0.19
Hepatocellular carcinoma	13	2.1	0.016	0.26
Metabolic pathways	70	11.3	0.023	0.33
Platelet activation	10	1.6	0.024	0.33
TGF-beta signaling pathway	7	1.1	0.099	0.56
Cardiac muscle contraction	7	1.1	0.099	0.56



**Cuadro 15.** Top 30 de las Vías KEGG enriquecidas para respuesta inmune en yeyuno

Vía KEGG	Genes	%	P-Value	Benjamini
innate immune response	71	22.1	5.3E-52	1.4E-48
Immunity	61	19	2.4E-42	1.6E-40
Innate immunity	47	14.6	2.5E-37	8.1E-36
T cell receptor signaling pathway	25	7.8	7.7E-24	1E-20
cellular response to interferon-gamma	23	7.2	1.4E-20	1.3E-17
activation of innate immune response	14	4.4	1.5E-17	9.8E-15
cytosol	101	31.5	8.9E-16	3.2E-13
inflammatory response	29	9	4.4E-15	2.4E-12
positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	23	7.2	5.9E-15	2.6E-12
positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	24	7.5	1.2E-14	4.7E-12
defense response to virus	25	7.8	6E-14	2E-11
Coronavirus disease - COVID-19	33	10.3	1.5E-13	3.8E-11
phagocytic vesicle	15	4.7	1.7E-13	3.1E-11
immune response	28	8.7	2E-13	6E-11
positive regulation of tumor necrosis factor production	16	5	3.7E-13	1E-10
Complement pathway	12	3.7	5.4E-13	1.2E-11
positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	21	6.5	5.7E-13	1.4E-10
DOMAIN:SH2	17	5.3	1.2E-12	8.8E-10
positive regulation of interleukin-2 production	12	3.7	2.6E-12	5.8E-10
SH2 domain	17	5.3	2.7E-12	1.9E-09
identical protein binding	49	15.3	6.3E-12	3.6E-09
positive regulation of defense response to virus by host	11	3.4	8.6E-12	1.8E-09
positive regulation of interferon-beta production	12	3.7	9.3E-12	1.8E-09
Antiviral defense	16	5	1.1E-11	1.9E-10
protein homodimerization activity	34	10.6	1.3E-10	3.5E-08
positive regulation of interleukin-6 production	14	4.4	4.3E-10	7.6E-08
Ubl conjugation	48	15	9.6E-10	2.4E-08
positive regulation of interleukin-1 beta production	11	3.4	1.6E-09	0.00000027
Cytoplasm	79	24.6	1.8E-09	7.4E-08
immunological synapse	10	3.1	2.1E-09	0.00000023

negative regulation of viral release from host cell	8	2.5	2.6E-09	0.00000041
--------------------------------------------------------	---	-----	---------	------------

Cuadro 16. Top 20 de los genes implicados en la vía de respuesta inmune.

ID Ensembl	Nombre
ENSBTAG00000010663	ADAM metallopeptidase domain 15(ADAM15)
ENSBTAG00000020453	C-type lectin domain containing 5A(CLEC5A)
ENSBTAG00000035907	DEAD-box helicase 3 X-linked(DDX3X)
ENSBTAG00000006142	DEAH-box helicase 36(DHX36)
ENSBTAG00000019061	E74 like ETS transcription factor 4(ELF4)
ENSBTAG00000015083	F-box protein 9(FBXO9)
ENSBTAG00000011851	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase(FYN)
ENSBTAG00000006056	HEXIM P-TEFb complex subunit 1(HEXIM1)
ENSBTAG00000020034	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase(LYN)
ENSBTAG00000030913	MX dynamin like GTPase 1(MX1)
ENSBTAG00000005413	NLR family CARD domain containing 5(NLRC5)
ENSBTAG00000015779	PML nuclear body scaffold(PML)
ENSBTAG00000020535	PYD and CARD domain containing(PYCARD)
ENSBTAG00000038428	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit(RELB)
ENSBTAG00000010042	RIO kinase 3(RIOK3)
ENSBTAG00000001225	RNA binding motif protein 14(RBM14)
ENSBTAG00000021637	RNA polymerase III subunit C(POLR3C)
ENSBTAG00000008825	RNA polymerase III subunit F(POLR3F)
ENSBTAG00000022007	SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1(SAMHD1)
ENSBTAG00000017401	TANK binding kinase 1(TBK1)
ENSBTAG00000049422	TRAF interacting protein with forkhead associated domain(TIFA)

Al profundizar el análisis de los genes relacionados con respuesta inmune encontramos 70 genes relacionados. Entre lo genes expresados se encuentran los pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas, proteínas de superficie celular y proteínas que cumplen funciones como receptores de antígenos de superficie celular (Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)), co-receptores (CD4, CD8) y moléculas coestimuladoras del sistema inmunitario (CD28), moléculas

involucradas en la presentación de antígenos a los linfocitos T, moléculas de adhesión celular (CD2), ciertos receptores de citocinas y proteínas musculares intracelulares.

Malmuthuge *et al.*, (2016), en su estudio analizaron genes relacionados con la respuesta inmune y función de barrera en tubo digestivo de becerros, encontraron marcadores como CD3D, CD3E y CD3G y CD247, como marcadores específicos de linaje para las células T, mientras que los genes que codifican CD79A y CD79B pertenecen al linaje de las células B y el gen que codifica forkhead box P3 (FOXP3) se seleccionó como un marcador específico de linaje para las células T reguladoras.

Otro de los genes detectados involucrados en la respuesta inmune es el factor regulador de interferón (IRF) es el regulador transcripcional de los genes IFN que modula la respuesta inmune, Park *et al.*, (2018) observaron que la regulación a la baja de la familia de IRF en infecciones por micobacterium pueden conducir a una pobre respuesta inmune de los Th1, así como la inhibición de la proliferación estas de células T conduciendo a un estadio de inmunosupresión, resultando en inflamación intestinal y presencia de diarrea.

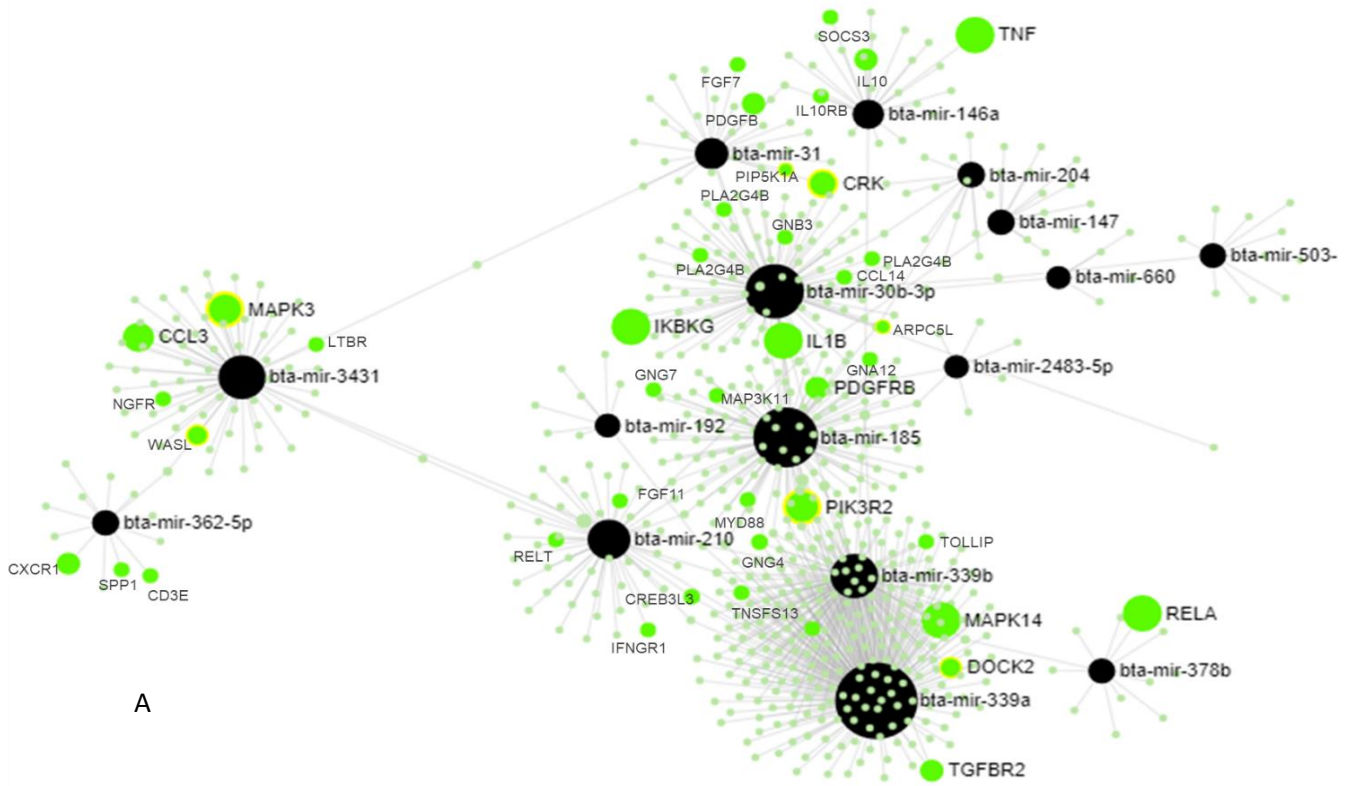
Por su parte Koch *et al.*, (2019), en su estudio del estrés por calor y como afecta la integridad intestinal reportaron un total de 14 genes marcadores típicos de inmunidad, entre los que se encontraban genes asociados a macrófagos/fagocitos/células mieloides como CD68, CD163, CD14, MCR1 (CD206) y FCGR2B (CD32), lo que indica que las células infiltrantes son del tipo de células fagocítica como el macrófago; así como los genes característicos de las células B o las células T (CD4, CD8A, CD3E y CD40LG), las células asesinas naturales o las células dendríticas. Esto es consistente con los hallazgos hechos en el presente trabajo donde encontramos genes marcadores de la inmunidad intestinal que ayudan a crear una barrera intestinal sólida, que protege al huésped contra la infiltración bacteriana por pérdida de uniones estrechas entre los enterocitos.

Liang *et al.*, (2016), observaron una mayor expresión del componente del complemento 3 (C3) que juega un papel clave en la activación del sistema del complemento, y del componente del complemento 5a (C5a) crucial en las funciones

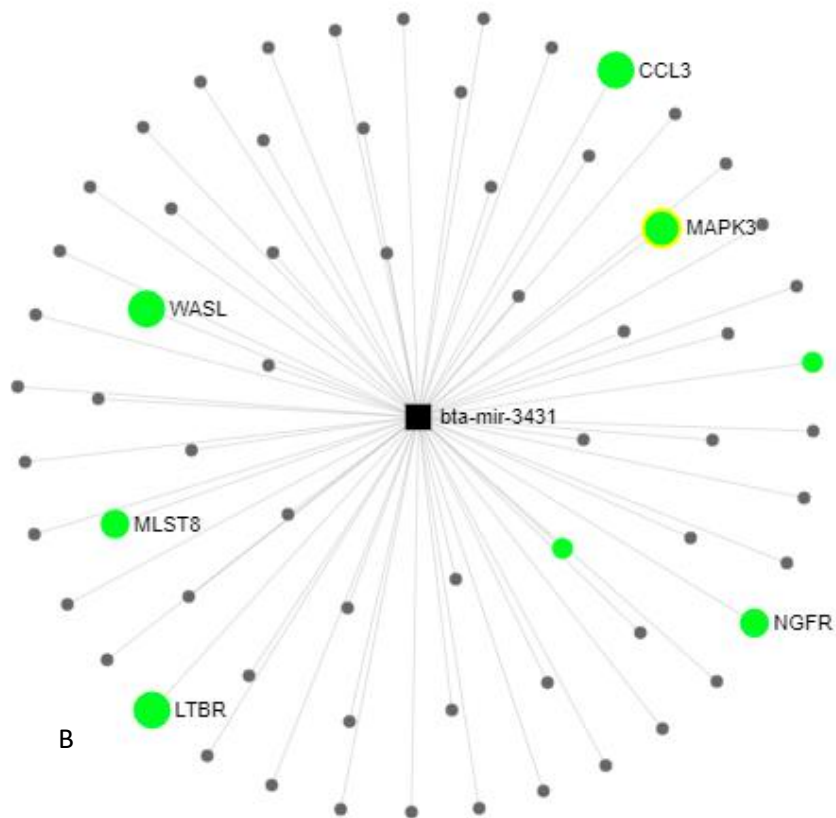
posteriores de la cascada del complemento, que puede reclutar células fagocíticas a los sitios de infección. El sistema del complemento juega un papel en la respuesta inflamatoria a los microorganismos y el reclutamiento de células fagocíticas siendo una de las primeras funciones inmunitarias innatas que se establece por completo en los tejidos mucosos de los recién nacidos humanos. De igual forma Liang *et al.*, (2016), encontró una mayor abundancia de IgA y del linaje celular de linfocitos B dependiente de la edad en yeyuno, consistente con el desarrollo posnatal de la función inmune adaptativa en el yeyuno.

Muchos genes detectados en este estudio no solo están relacionados con la inmunidad intestinal sino también con el desarrollo y correcta maduración de los órganos tal es el caso de la hormona IGF, encargada del crecimiento normal de los tejidos; de igual forma Connor *et al.*, (2010), estudiaron la expresión de distintos genes a lo largo del TGI y sus funciones en el crecimiento y desarrollo el TGI, en donde reportaron la presencia de genes INS-R, IGFBP-2 e IGFBP-3 entre las puntas de las vellosidades y las criptas en el yeyuno, y la expresión de IGF-2, IGFBP-2 e IGFBP-3 entre las puntas de las vellosidades y las criptas en el íleon de becerros recién nacido, así como expresión diferencial de IGF-1, IGF-2, IGFBP-2, IGFBP-3, GH-R, INS-R, IGF-1R e IGF-2R, como biomarcadores de un correcto desarrollo del TGI.

Por su parte Zhong *et al.*, (2022), estudiaron los long coding RNA y su papel en el desarrollo del tubo digestivo, ellos detectaron genes como FoxO1, que regular el ciclo celular y la apoptosis a través de la vía de señalización de FoxO, además mostraron como varios lncRNA pueden regular el desarrollo del rumen dirigiéndose a los mRNA (COL4A4, COL6A2, TNC, COL6A3, MAPK1, TSC1, LAMC1, MAPK3) en la vía de señalización de PI3K-Akt; así como la proteína quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) puede usarse como un punto de integración para múltiples señales bioquímicas y participar en varios procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la regulación transcripcional y el crecimiento y desarrollo.



A



B

**Figura 18.** MicroRNA en el yeyuno. A) miRNA diferencialmente y sus genes blanco expresados en yeyuno de becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano. B) bta-mir-3431 y sus genes blanco expresados en becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano. Los puntos resaltados en verde corresponden a lo genes relacionados con la respuesta inmune.

Para comprender mejor la función de los genes de interés en el yeyuno en desarrollo, las relaciones entre los miRNA, los genes diana se visualizaron como una red (Figura 18). La red incluía DE miRNAs en el yeyuno como bta-miR-330a/b, bta-miR-378, bta-miR-185, bta-miR-30b.3p, bta-miR-31, bta-miR-146, bta-miR-362,5p, bta-miR-3431 y sus genes diana implicados en la respuesta inmune.

A los hallazgos vemos que hay alrededor de 30 genes implicados en la respuesta inmune del yeyuno de los becerros entre los miRNA DE expresados y que además están involucrados en vías KEGG como la vía de: MAPK, NF-KappaB, receptores tipo Toll, receptores tipo NOD, receptores de células T, señalización de TNF, receptor de interacción citocina-citocina. Además se puede observar que hay una comunicación, cercanía e interacción entre los DE miRNA y sus genes blancos.

Entre los DE miRNA encontramos al bta-miR-3431 un miRNA específico para bovinos, este miRNA se encuentra DE en los días 7 vs 28, y ha sido objeto de poco estudio (fig. 18B), sin embargo al análisis realizado detectamos que tiene varios genes que juegan un papel importante en la respuesta inmune del animal y que además tiene al menos 15 vías KEGG importantes descritas para inmunidad intestinal entre las que destacan: la vía NF-KappaB, receptores tipo Toll, receptores tipo NOD, receptores de células T, señalización de TNF, receptor de interacción citocina-citocina.

Además se destaca la presencia de la vía de la Red inmune intestinal para la producción de IgA; el intestino es el tejido linfoide más grande del cuerpo. Una característica llamativa de la inmunidad intestinal es su capacidad para generar grandes cantidades de inmunoglobulina A (IgA) que sirven como primera línea de

defensa específica contra los microorganismos. El mapa básico de la producción de IgA incluye la inducción de células B mucosas en las placas de Peyer, la circulación a través del torrente sanguíneo y el alojamiento en la mucosa intestinal de células plasmáticas comprometidas con la síntesis de IgA, para exportar a través de las membranas intestinales (transitosis). Se requieren múltiples citocinas, incluidas TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-5 e IL-6, para promover el cambio de clase de IgA y el proceso de diferenciación terminal de las células B. La IgA secretada promueve la exclusión inmune reconoce los antígenos y microorganismos de la dieta en el moco y funciona para la neutralización de toxinas y microbios patógenos (Kanehisa *et al.*, 2000).

Sobre este miRNA solo se logró encontrar un estudio que lo reporta, Beudoin *et al.*, (2015), estudió el patrón de expresión de los miRNA después de la adaptación de la glándula mamaria a la suplementación dietética con un 5 % de aceite de linaza o de cártamo, describen que el bta-mir-3431, cumple funciones en el desarrollo muscular postnatal así como desempeñar un papel en las vías de síntesis de lípidos específicas de rumiantes. Estas funciones son distintas a las descritas en este trabajo donde nos enfocamos a sus funciones sobre la respuesta inmune, sin embargo vemos como las funciones descritas por Beudoin *et al.*, (2015), son consistentes con la edad y desarrollo normal de los animales.

Por su parte el bta-mir-339a/b, ha sido descrito en trabajos realizados con ganado de raza cebú como los utilizados en este estudio, tal es el caso de De Oliveira *et al.*, 2018, donde estudió la regulación de los miRNA-mRNA sobre la eficiencia alimenticia y el consumo residual de alimento en ganado Nelore, donde encontraron asociaciones con bta-miR-30b-5p y la vía de señalización de FoxO asociada con el consumo residual de alimentos, del mismo modo, los genes diana bta-miR-339a/b G6PC2 y TGFBR2 también se asociaron con esta vía; en otro de sus estudios De Oliveira *et al.*, (2019), analizó que el bta-mir-339 es un regulador a la baja del ácido oleico, además se ha reportado como uno de los principales reguladores para la composición de ácidos grasos del músculo en ganado Nelore.

Otros estudios han estudiado la correlación de los miRNA con los mRNA, tal es el caso de Gonzalez-Rascon *et al.*, (2015), observaron que el miR-146a juega un papel

clave en la tolerancia a endotoxinas al regular a la baja las proteínas de señalización, negativamente regula a IRAK1 y TRAF6, constituyendo un circuito de retroalimentación negativo. La regulación positiva de miR-146a parece desencadenar una respuesta inmune hacia la inflamación. Además Eulalio et al, (2012) reportaron que miR-146a reprime la molécula de señalización TLR asociada al receptor de la interleucina 1 (IRAK1), que es suficiente para inducir la tolerancia inmunitaria innata y proporcionar protección contra el daño epitelial inducido por bacterias en los recién nacidos.

Pacifico *et al.*, (2022), reportaron en su estudio la presencia de miRNA en el desarrollo del tubo digestivo, informaron que miR-21-5p, mir-27b, let-7a-5p, let-7f y miR-205 están presentes en la sangre de las vacas y están asociados con la inmunidad y la detección del estrés ambiental en el ganado así como la regulación de la inmunidad mediada por macrófagos y células T.

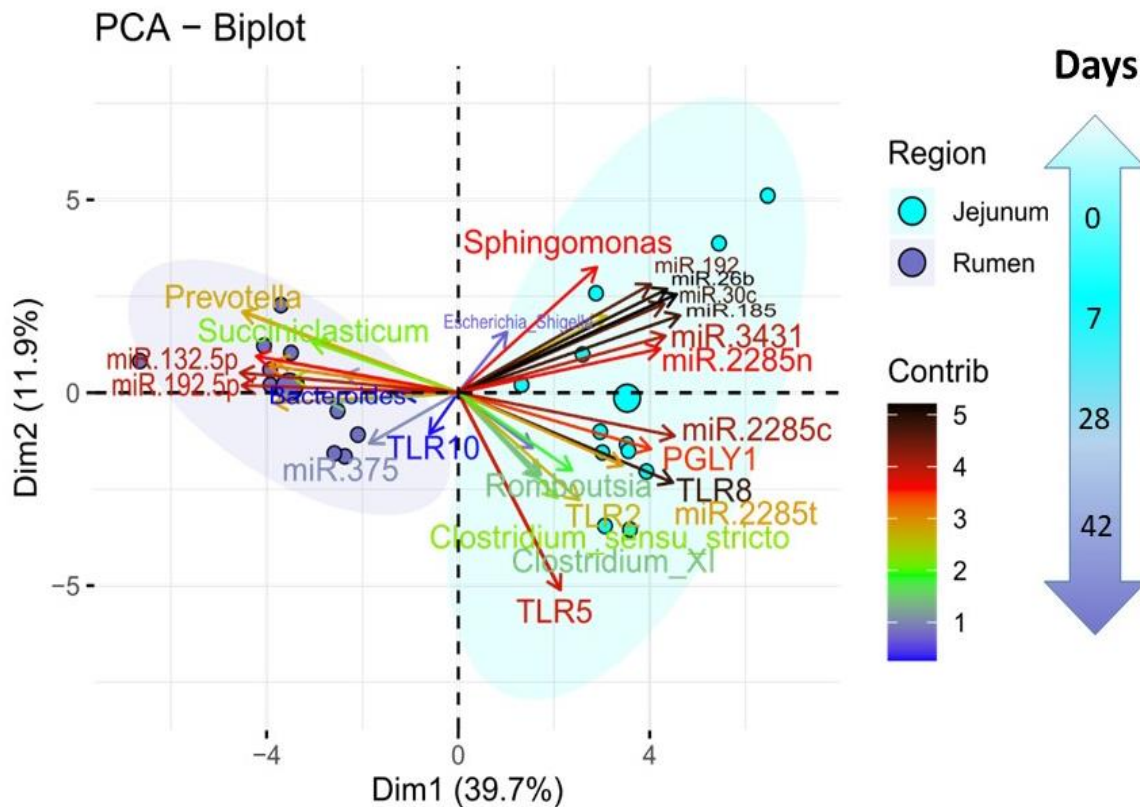
### **Relación miRNA-microbiota-TLR**

Para comprender mejor las relaciones de miRNAs, TLRs y el microbioma, se realizó un PCA (Figura 19) que muestra una clara diferencia entre los órganos rumen y yeyuno, también muestra diferencia entre días, donde las muestras de 0 y 7 días se ubicaron en los cuadrantes superiores del PCA mientras que las muestras de los días 28 y 42 se ubicaron en la parte inferior, donde se observó una mayor homogeneidad entre las muestras de rumen que en las de yeyuno.

En el caso del rumen se observa una relación de mir-192, a los días 0 y 7, con *Prevotella* y *Saccharofermentans*. Cabe resaltar que el TLR10 fue el único TLR asociado al rumen, en los días 28 y 42 días, con mir-375 y *Lachnospira*. Se ha descrito que tanto *Prevotella* como *Lachnospira* son géneros indicadores de buena salud digestiva ya que su presencia se ha asociado a una menor incidencia de diarreas (Dowd *et al.*, 2008), de forma consistente mir-375 se ha utilizado como biomarcador para detectar infecciones con *S. aureus* y *E. coli* (Luoreng *et al.*, 2018). Por su parte mir-192 está involucrado en la modulación activa de leucocitos y el desarrollo del tejido linfoide (Liang *et al.*, 2014).



En yeyuno se observó una alta correlación de las muestras correspondientes a los días 0 y 7 con 8 miRNAs y bacterias como *Sphingomonas* y *E. coli*, lo cual es consistente con la edad ya que estas bacterias pueden ser adquiridas principalmente por el canal vaginal de la madre, la piel de los pezones al amamantar y el medio ambiente. Por otro lado existe una alta correlación entre TLR2, 5, 8 y PGLY1a entre sí y con el género *Clostridium* el cual puede regular la expresión de genes involucrados en la vía de los TLR de la mucosa yeyunal, mejorando la barrera epitelial intestinal, atenuando la inflamación y regulando la microbiota intestinal, y con el miRNA-2285 involucrado en la respuesta inmunitaria innata, todo ello forma un gran grupo fuertemente asociado con el desarrollo de la respuesta inmune entre los días 28 y 42 (Lawless *et al.*, 2014; Hanif *et al.*, 2018).



**Figura 19.** Gráfica PCA. Asociaciones formadas entre los miRNA, los TLR y los géneros bacterianos en rumen y yeyuno de becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano

Al estudiar las relaciones formadas podemos observar como *Prevotella* se ha demostrado que desempeña un papel importante en la inmunidad y la homeostasis del tubo digestivo como lo informan Jiao *et al.*, (2017) en su estudio sobre los cambios del microbioma intestinal ligados a la dieta. Zeineldin *et al.*, (2017), han visto que *Prevotella* realiza interacciones con el sistema inmunitario en el tubo digestivo, incluyendo la producción de citocinas y la activación de células inmunitarias como los linfocitos T y las células dendríticas. Estas interacciones pueden influir en la respuesta inflamatoria y además participa en el mantenimiento del equilibrio microbiano, otros autores han reportado que la presencia de *Prevotella* en asociación *Saccharofermentans* y *Succiniclustum* en el intestino está implicada con una mayor diversidad microbiana y con la producción de metabolitos beneficiosos, como los ácidos grasos volátiles (Van Gylswyk *et al.*, 1995; Tajima *et al.*, 2001; Jiao *et al.*, 2017; Betancur *et al.*, 2022).

Por su parte Liang *et al.*, (2014); Mukiibi *et al.*, (2020) reportan que mir-192, se ha visto implicado en diferenciación de leucocitos y el desarrollo de tejidos linfoides, modulación activa de los leucocitos, regulación del crecimiento y desarrollo del músculo esquelético. Mir-192 también desarrolla funciones en el metabolismo de la glucosa, que junto con mir-375 es esencial para la homeostasis de la glucosa, el recambio de células  $\alpha$  y  $\beta$  y la expansión adaptativa de células  $\beta$  en respuesta a la creciente demanda de insulina (Clark *et al.*, 2018). Esto es consistente con las relaciones bacterianas presentes donde en rumen vemos una mayor proporción del filo *Bacteroidetes*, capaces de llevar a cabo la degradación de carbohidratos, en concordancia con la dieta que recibían los animales basada en concentrado y leche, lo cual nos permite ver como hay una asociación entre la funcionalidad del microbioma y los miRNA presentes en rumen tanto para el desarrollo inmune como para el desarrollo del tubo digestivo.

De igual manera mir-375 muestra asociación no solo con las bacterias comensales sino también con la respuesta inmune pues puede tener comunicación con los TLR, en este caso particular con TLR10, influyendo en la proliferación celular y la angiogénesis a través de la transducción de señales que incluye MAPK,

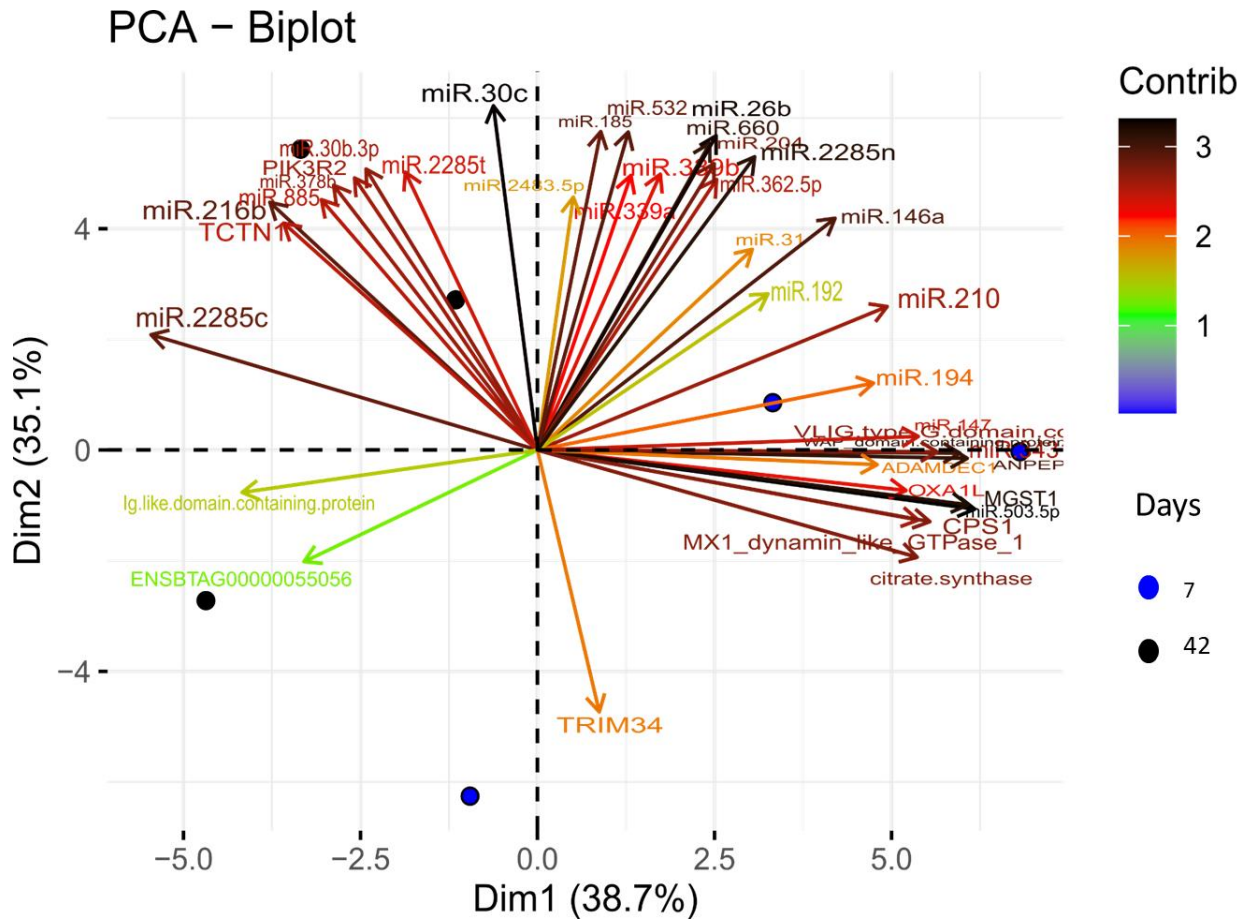
PIK3CA/AKT NF- $\kappa$ B (NFKBI)/NF (Gahafar *et al.*, 2020), genes que forman parte de la cascada de señalización de TLR10 aguas abajo. Menzies *et al.*, (2006) observaron en su estudio de la expresión de los TLR, que TLR10 tiene presencia en todo el TGI y una expresión dependiente de la edad, así como expresión en las células dendríticas. Opsal *et al.*, (2006) describen que los TLR10 se caracterizan por formar heterodímeros funcionales con TLR1, TLR2 y TLR6 por lo que es posible que TLR10 pueda participar en el reconocimiento de una variedad de PAMP microbianos, incluidos los reconocidos por TLR2, formando así una fuerte línea de defensa ante patógenos (Vahanan *et al.*, 2008).

En los estudios de Lopetuso *et al.*, (2013); Lawless *et al.*, (2014); Jin *et al.*, (2020) se han observado que en el yeyuno la presencia de *Clostridium* ayuda a optimizar la expresión de comunidades bacterianas, de metabolitos plasmáticos que ayudan a mejorar la inmunidad y la barrera epitelial, así como, aliviar los efectos nocivos causados por el balance energético negativo en el período de transición, actuando sobre la inflamación local. Así mismo estudios recientes como el de Gebeyew *et al.*, (2021) describen como *Romboustia* está asociado con respuestas inmunitarias leves modulando los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias y una asociación con TNF $\alpha$ , ocludinas, IL-8 y TLR (Gerritsen *et al.*, 2017).

Esto es consistente con la información encontrada para los TLRs donde se reporta que son más abundantes en las placas de Peyer, en los linfonodos mesentéricos de yeyuno (Cario y Podolsky, 2000; Menzies *et al.*, 2006), además en las placas de Peyer se pueden encontrar células inmunitarias como monocitos, células B y células T. Se ha descrito que existe una correlación entre la población bacteriana total y la expresión de TLR, donde se muestra una disminución dependiente de la edad en la expresión de los genes TLR y un aumento de linfocitos T como las células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, esta baja respuesta de los TLR a las bacterias presentes en intestino delgado puede ser un mecanismo del huésped para evitar las respuestas inmunes indeseadas a las bacterias comensales (Malmuthuge *et al.*, 2014; Abecia *et al.*, 2017).

De igual forma encontramos que en estudios como el de Lawless *et al.*, (2014); Hanif *et al.*, (2018) se describe a mir-2285, como un miRNA especie específico en bovinos involucrado con tejidos inmuno-relevantes como monocitos CD14, así como con los macrófagos alveolares que pueden intervenir en la activación y expresión de TLRs desempeñando un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmunitaria y en la formación de células B. Además otro miRNA importante en este órgano es mir-3431, Beudoin *et al.*, (2015); De Oliveira *et al.*, (2018) han descrito este miRNA como bovino específico cuya expresión se ha visto asociada a las razas cebú, consistente con los animales utilizados en este estudio, se ha reportado que este miRNA mejora la eficiencia alimenticia a través de la vía de señalización de FOXO interviniendo en el metabolismo de lípidos y en el metabolismo de la glucosa regulación de los niveles de glucosa, la regulación de los niveles de glucosa en sangre y una mayor eficiencia en la utilización de la glucosa como fuente de energía mejorando así el desarrollo muscular postnatal.

## Relacion miRNA-mRNA



**Figura 20.** Gráfica PCA. Relación entre los miRNA y los mRNA de los días 7 y 42 en yeyuno de becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano. Para comprender mejor las relaciones de miRNAs y mRNA, se realizó un PCA (Figura 20) mostrando las diferencias entre días, donde las muestras de 7 días se ubicaron a la derecha de PCA mientras que las muestras de 42 días posnatales se ubicaron a la izquierda del gráfico, se observa la formación de un conjunto bastante grande entre miRNA y mRNA para el día 7 consistente con los datos anteriormente descritos, así como la constante presencia de mi-2285.

En el día 7 de este análisis encontramos relación entre TRIM34 y MX1 donde ambos genes son parte del sistema inmunitario innato, actúan como antivirales al inhibir la replicación viral y modular las respuestas inmunitarias ante estos (Khan *et al.*, 2011; Rajsbaum *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020).

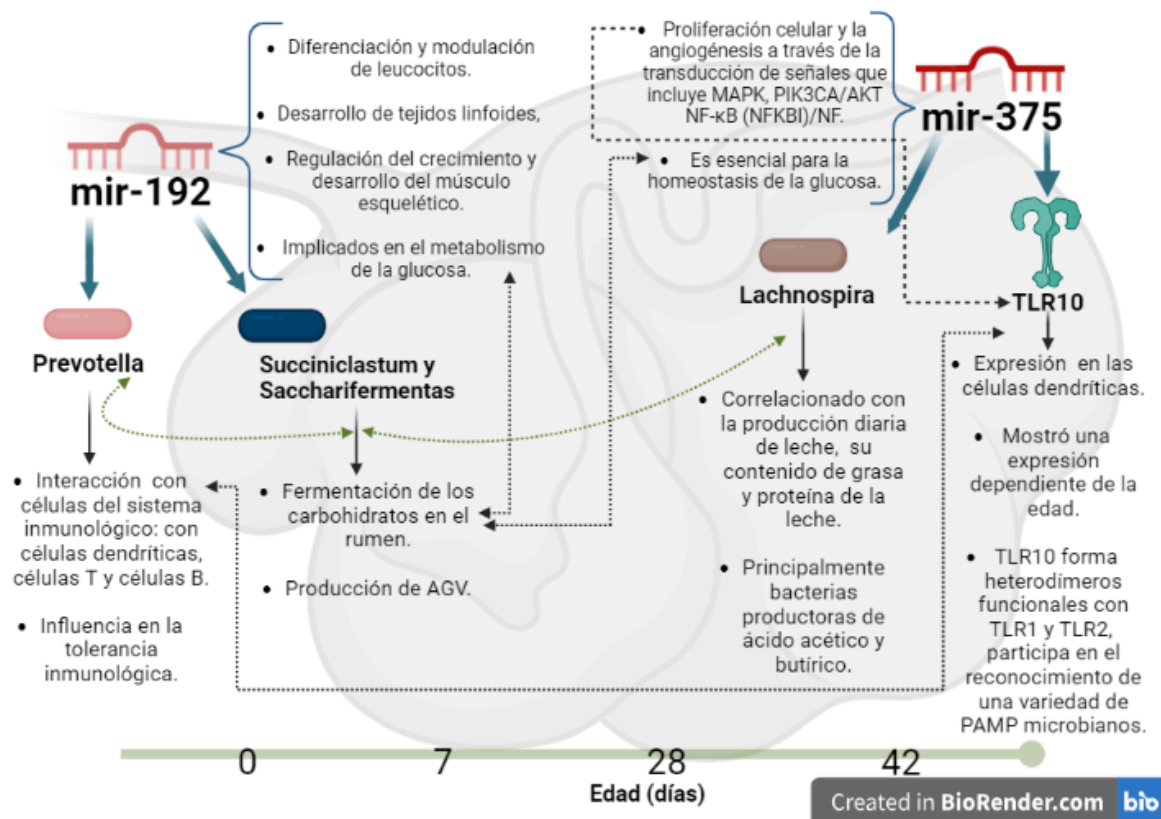
Otros de los genes encontrados como el citrato sintasa, ANPEP (Aminopeptidasa N, también conocida como CD13), y ADAMDEC1 (similar a ADAM, decisina 1, es un miembro de ADAM desintegrina y metaloproteinasa A) están todos fuertemente ligados a la respuesta inmunitaria cumpliendo roles como Inmunometabolismo la activación de macrófagos, Inflamación, señalización redox, migración de leucocitos activación de células T, procesamiento y presentación de antígenos, modulación de la inflamación (Ma *et al.*, 2015; Dominguez *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020; Ha *et al.*, 2022).

Estas funciones están ligadas a miRNA expresados como mir-147 con funciones de proliferación de células endoteliales, el reconocimiento de bacterias, la regulación de la respuesta inflamatoria y regulación de la proliferación celular, funciones que están relacionadas con los TLR, el mantenimiento de la homeostasis intestinal y el recambio de enterocitos; además se ha descrito que puede suprimir y regular la vía JAK/STAT esta vía intracelular transmite señales de citocinas, factores de crecimiento y desempeña un papel crítico en la regulación de la respuesta inmunitaria y otros procesos celulares (Stenfeldt *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2021). La activación de esta vía puede influir en la transcripción de genes y modular diversos aspectos del sistema inmunitario, con esto podría afirmarse que a través de la regulación de los mRNA y los TLR por los miRNA se puede dar una regulación al alza de la respuesta inmune.

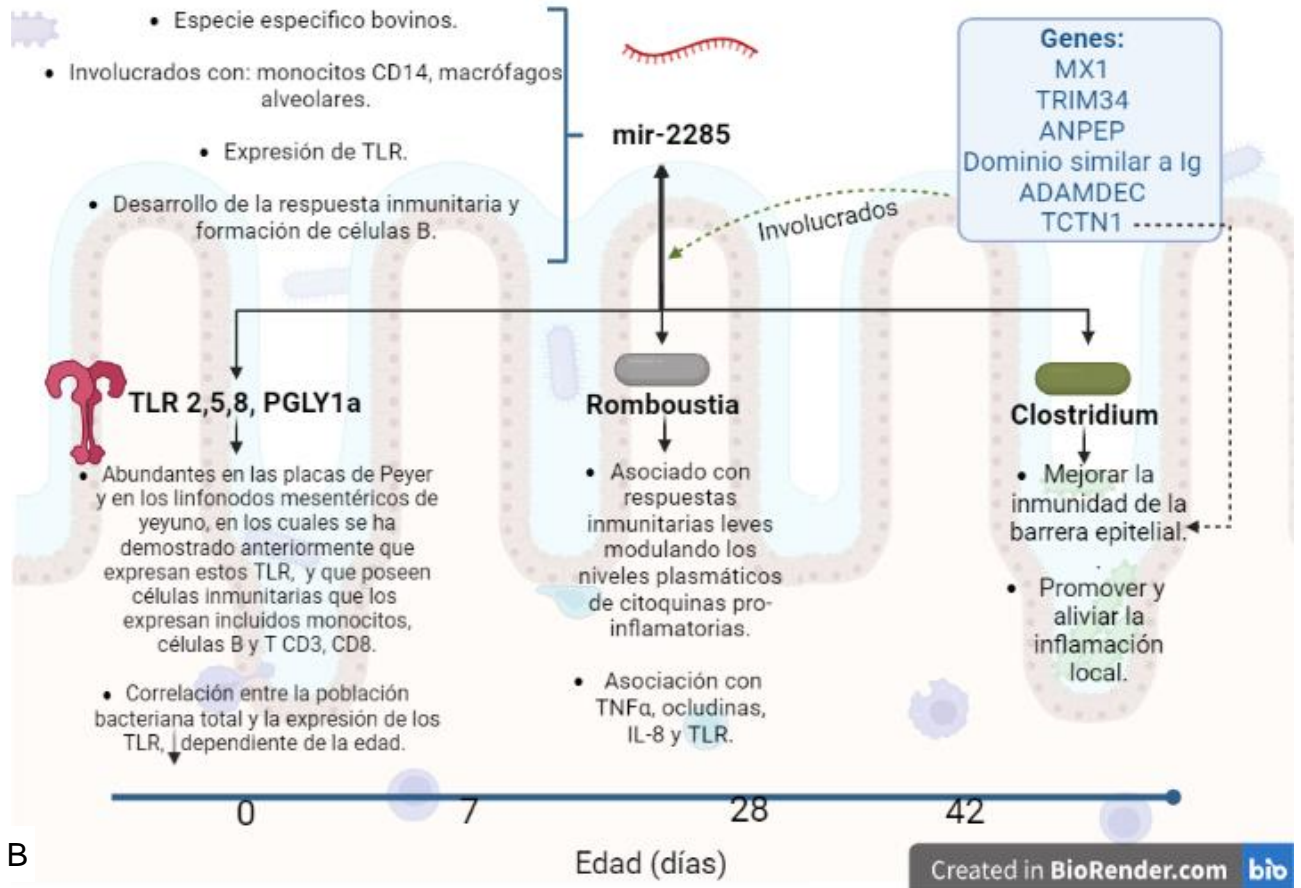
Para el día 42 encontramos funciones relacionadas con la integridad de la barrera epitelial del intestino, donde participan genes como TCTN1 que regular la formación y mantenimiento de las microvellosidades que actúan como un guardián, controlando la entrada y salida de moléculas dentro y fuera de los enterocitos esta zona de transición es crucial para la función de absorción y la señalización adecuadas (Liu *et al.*, 2018; Chai *et al.*, 2019; Coria *et al.*, 2019), esto junto con PIK3R2 que codifica una subunidad reguladora de la PI3K participando en la transducción de señales celulares relacionadas con el crecimiento, la supervivencia, el metabolismo celular y del desarrollo ayudando a mantener la homeostasis enterica (Dibble *et al.*, 2015; Weichhart *et al.*, 2008; Rommel *et al.*, 2007) que ligado

a la correcta colonización por bacterias comensales como los *Clostridium* y los metabolitos producidos por estos, pueden ejercer efectos antiinflamatorios, previniendo diversas enfermedades intestinales, como la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino permeable y posteriormente prevenir la posible presencia de diarreas.

En este punto también se puede mencionar la acción del mir-30 (Huang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020) sobre genes como la regulación de ADAM19, este gen se requiere para la adhesión de células inmunitarias como leucocitos, modula la activación de linfocitos T. Así mismo la acción del dominio similar a Ig, media en la unión y el reconocimiento de las células inmunitarias a otras células con lo que se podría decir que tanto el miRNA como el gen tienen una acción conjunta para el reconocimiento y unión de antígenos, la señalización de células inmunitarias así como su desarrollo diferenciación y maduración y por último la regulación de puntos de control inmunitarios (Clark *et al.*, 2018).



A



**Figura 21.** A) Relación entre los miRNA, TLR y la microbiota en rumen de becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano. B) Relación entre los miRNA, TLR, microbiota y los mRNA en yeyuno de becerros de los 0 a los 42 días de edad nacidos en trópico mexicano



## CONCLUSIONES

A lo largo de este estudio hemos visto como hay diferencias temporales y regionales en el microbioma, en la expresión de los TLR, en la expresión de miRNA, así como en las de los mRNA, que se complementan para un correcto establecimiento del sistema inmune de los becerros.

Se determinó el cambio las poblaciones bacterianas en función de la edad y la alimentación, al análisis por región encontramos una mayor proporción de Bacteroidetes en rumen consistente con una alimentación a base de concentrado y en donde vemos que van creciendo las poblaciones de bacterias fibrinolíticas pertenecientes a los filos Firmicutes; por su parte en yeyuno vemos una gran proporción de Firmicutes un indicativo de una sana colonización del yeyuno por las bacterias. Así mismo se observó como los TLR, están activos desde el día 0 de nacidos, sin embargo con el cambio de la microbiota van cambiando su expresión, reduciendo su sensibilidad hacia los microorganismos comensales lo cual ayuda a una correcta colonización bacteriana, evitando las respuestas aberrantes a los microorganismos comensales, además también funcionan como monitores de las poblaciones bacterianas detectando cualquier cambio que causen una disbiosis que provoque la proliferación de patógenos oportunistas.

En cuanto a los miRNA, se observó que los miRNA están implicados en una gran cantidad de procesos biológicos, que aunque en este trabajo está enfocado al desarrollo de la respuesta inmune que está modulada por miRNA desde el día 0 y continua su establecimiento hasta el día 42, también encontramos procesos biológicos regulados por los miRNA que van desde el desarrollo y maduración de estructuras anatómicas hasta funciones metabólicas correspondientes a la función normal de los órganos en estudio. Además, detectamos que el mir-3431 es un miRNA poco estudiado y que contribuye en gran manera a la respuesta inmune.

Al complementar los análisis de miRNA con los mRNA se observó que la mayoría de genes DE en yeyuno están relacionados con la respuesta inmune, lo cual tiene relación con el hecho de que el yeyuno es un tejido linfoide donde hay gran abundancia de células inmunes encargadas de mantener la homeostasis entre el

hospedero, la microbiota comensal, así como de mantener de la mejor manera la integridad de los enterocitos y sus uniones estrechas, impidiendo el paso de patógenos y/o su proliferación, ya que esto puede llevar a presentar cuadros de enfermedad como diarreas.

Como conclusiones generales de este trabajo se observa que al analizar las posibles asociaciones encontramos que en rumen (Figura 22a) se observó como bacterias altamente representadas como *Prevotella*, *Succinoclastum* y *Saccharofermentas* actúan en la fermentación de los carbohidratos en el rumen y la producción de AGV, que puede activar miRNA como mir-192 y mir-375 que actúa sobre el metabolismo de la glucosa y sobre la proliferación celular y el músculo esquelético. Además estos miRNA pueden comunicarse y activar TLR, a través del reconocimiento de PAMPs y desencadenar la respuesta inmune vía MAPK y NF- $\kappa$ B, activando células dendríticas, leucocitos, linfocitos T y B.

En yeyuno (Figura 22b) se aprecia que los TLR se expresan más en este órgano, así mismo se ha visto que ciertos miRNA como mir-147 pueden expresarse en conjunto con genes como ANPEP, que en conjunto con *Romboustia* se han asociado a respuestas que desencadenan la activación de la función inmune. Además existe una regulación entre los TLR y el microbioma del yeyuno que ayuda a un correcto establecimiento de las bacterias comensales como *Clostridium* que junto con genes como TNFC1 forman una mejora en la barrera epitelial gracias a que las bacterias adhieren a la pared intestinal evitando la adhesión de patógenos y la aparición de problemas entéricos como intestino permeable, esto junto con una mejor eficiencia alimenticia asociada a una expresión de mir-3431 y deposición de grasa intramuscular asociada a la expresión mir-30, pueden suponer mejoras en los parámetros productivos de los animales y menor incidencias de enfermedades entéricas como diarreas.

Aunque aun falta comprender mejor la relación entre las interacciones miRNA/mRNA-TLR-microbioma, su análisis nos permite vislumbrar parte del proceso de comunicación que se lleva a cabo a través de los miRNA y como estos funcionan como moduladores de la comunicación entre procesos biológicos y vías

metabólicas y que permiten un correcto proceso del establecimiento de la inmunidad tanto innata como adaptativa en los becerros durante su transición a rumiantes.

## LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. 2022. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier Health Sciences. 10 ED.
- Abecia. L., Jiménez. E., Martínez. G., Martín. A., Ramos. E., Pinloche. E. 2017. Natural and artificial feeding management before weaning promote different rumen microbial colonization but not differences in gene expression levels at the rumen epithelium of newborn goats. *PLoS ONE* 12.
- Alarcón. P., González. M., Castro. E. 2016. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista médica de Chile.*, 144: 910-916.
- Alexa A, Rahnenfuhrer J (2023). topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.52.0.
- Amin. N., Seifert. J. 2021. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Computational and structural biotechnology journal*. 19: 989.
- Austin, K. J., Cunningham, H. C., Powell, S. R., Carpenter, K. T., & Cammack, K. M. (2018). Investigation of maternal breed and rearing type on the calf rumen microbiome from day 28 through weaning. *Translational Animal Science*, 2(suppl\_1), S125-S129.
- Bautista-Garfias. R., Gualito. M. 2005. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Veterinaria México*. 36: 453-468.
- Beas, EJ. 2017. Implicación de los micrnas en la obtención de células productoras de insulina a partir de células troncales pluripotentes. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Beltrán. L. 2011. Inmunidad del becerro recién nacido. Tesis de grado. Universidad de Cuenca.
- Betancur-Murillo, C. L., Aguilar-Marín, S. B., Jovel, J. 2022. Prevotella: A Key Player in Ruminant metabolism. *Microorganisms*. 11: 1.
- Bilbao. G., Pinto. A., Badaracco. A., Rodríguez. D., Monteavaro. C., Parreño. V. 2013. Diarrea neonatal del ternero. *Albeitar.*, 142.

Birinci. Y., Preobraschenski. J., Ganzella. M., Jahn. R., Park. Y. 2020. Isolation of large dense-core vesicles from bovine adrenal medulla for functional studies. *Scientific reports*. 10: 1-8.

Brownlie, R., & Allan, B. (2011). Avian toll-like receptors. *Cell and tissue research*, 343, 121-130.

Bushati. N., Cohen. M. 2007. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23: 175.

Cadavid. A., Giraldo. A., Sierra-Bedoya. S., Montoya. M., Chaparro. J., Restrepo. E., Olivera. M. 2014. Bovine neonatal diarrhea in a herd in the Northern Antioquia (Colombia) Highlands a descriptive study. *Veterinaria y Zootecnia*. 8: 120.

Cai. X., Hagedorn. H., Cullen. R. 2004. Human microRNAs are processed from capped. polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10. 1957.

Cairo, E., & Podolsky, D. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 68, 7010–7017.

Casanueva. A., Tuffin. M., Cowan. A. 2011. The Nanoarchaeota: Physiology. *Genomics and Phylogeny*.

Chae. J., Choi. J., Lee. J., Ajayi. F., Kim. S. 2008. Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis. *Int. J. Hydrogen Energ.* 33: 5184.

Chai, L., Yang, G. 2019. MiR-216a-5p targets TCTN1 to inhibit cell proliferation and induce apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cellular & molecular biology letters*. 24: 1-13.

Chase. C. 2018. Enteric Immunity: Happy Gut. Healthy Animal. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 34: 1.

Chen. Y., & Oba. M. 2012. Variation of bacterial communities and expression of Toll-like receptor genes in the rumen of steers differing in susceptibility to subacute ruminal acidosis. *Veterinary microbiology*. 159: 451-459.

Choi, W., Kim, S., Park, T., Park, E., Choi, S., Yoo, S. 2021. MicroRNA profiling in bovine serum according to the stage of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Plos one*. 16: e0259539.

Chokeshaiusaha. K., Sananmuang. T., Puthier. D., Nguyen. C. 2018. An innovative approach to predict immune-associated genes mutually targeted by cow and human milk microRNAs expression profiles. *Veterinary world*. 11: 1203.

Chomczynski P. Mackey K. 1995. Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19: 942.

Clark, E. A., Giltiay, N. V. 2018. CD22: a regulator of innate and adaptive B cell responses and autoimmunity. *Frontiers in immunology*. 9: 2235.

Clemmons. B., Martino. C., Schneider. G., Lefler. J., Embree. M., Myer. R. 2019. Temporal stability of the ruminal bacterial communities in beef steers. *Scientific reports*. 9: 1.

Concha. C. 2007. La inmunidad en la vaca lechera como factor relevante en la lucha contra la mastitis. Departamento de producción animal. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

Connor, E. E., Li, R. W., Baldwin, R. L., & Li, C. (2010). Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. *Animal*, 4(7), 993-1007.

Coria, M. S., Reineri, P. S., Tonhati, H., Palma, G. A. 2019. Análisis de asociación genómica para terneza y marmoreo en novillos braford. *Comunicación. Revista argentina de producción animal*. 39: 9-19.

Dalmasso. G., Nguyen. T., Yan. Y., Laroui. H., Charania. M. 2011. Microbiota modulate host gene expression via microRNAs. *PLOS One* 6.

De Oliveira, P. S., Coutinho, L. L., Tizioto, P. C., Cesar, A. S., de Oliveira, G. B., Diniz, W. J. D. S., Regitano, L. C. 2018. An integrative transcriptome analysis indicates regulatory mRNA-miRNA networks for residual feed intake in Nelore cattle. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.

De Oliveira, P. S., Coutinho, L. L., Cesar, A. S., Diniz, W. J. D. S., De Souza, M. M., Andrade, B. G., Regitano, L. C. 2019. Co-expression networks reveal potential

regulatory roles of miRNAs in fatty acid composition of Nelore cattle. *Frontiers in genetics*, 10, 651.

Dibble, C., Cantley, C. 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in cell biology*. 25: 545-555.

Dill-McFarland. K., Breaker. J., Suen. G., 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to the first lactation. *Scientific Reports*. 7. 40864.

Dill-McFarland. K., Weimer. J., Breaker. J., Suen. G. (2019). Diet influences early microbiota development in dairy calves without long-term impacts on milk production. *Applied and Environmental Microbiology*. 85. e02141-18.

*Ecology* 79: 337.

Do, D. N., Dudemaine, P. L., Fomenky, B. E., & Ibeagha-Awemu, E. M. (2018). Integration of miRNA and mRNA co-expression reveals potential regulatory roles of miRNAs in developmental and immunological processes in calf ileum during early growth. *Cells*, 7(9), 134.

Domínguez, M., Pérez-Chacón, G., Guillén, J., Muñoz-Alonso, J., Somovilla-Crespo, B., Cibrián, D., Zapata, J. M. 2020. CD13 as a new tumor target for antibody-drug conjugates: validation with the conjugate MI130110. *Journal of Hematology & Oncology*. 13: 1-15.

Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeegan, T., Hagevoort, R. G., & Edrington, T. S. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC microbiology*, 8(1), 1-8.

Du Y, et al. (2019). MX1 is a positive regulator of autophagy and modulates cellular lipid metabolism by suppressing fatty acid synthesis. *Cell Death Dis*. 2019 Mar 25;10(4): 291.

Edgar. R. 2010a. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 26: 2460.

Edgar. R. 2010b. *Usearch*. Lawrence Berkeley National Lab (LBNL). Berkeley. CA. United States.

Eulalio. A., Schulte. L., Vogel. J. 2012. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA biology*. 9. 742.

Example marker-gene workflow. Amplicon Analysis. Tomado de: [https://astrobiomike.github.io/amplicon/workflow\\_ex#merging-forward-and-reverse-reads](https://astrobiomike.github.io/amplicon/workflow_ex#merging-forward-and-reverse-reads)

Fernández. E., Campero. M., Morrell. E., Cantón. J., Moore. D., Cano. A., Odriozola. E. 2007. Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos muertes prematuras natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. *Rev Med Vet.*, 88: 246.

Flores. F., Martinez. M., Arenas. C., Reyes. J. 2007. ¡Silencio mensajeros! qué son y cómo actúan los micrornas. *REB*. 26: 135.

Fraune, S and Bosch, TCG (2007). Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 13146–13151.

García. J. 2011. Biogénesis y expresión de microRNAs durante el desarrollo preimplantacional de ratón. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Ghafar, M. T. A., & Soliman, N. A. (2022). Metadherin (AEG-1/MTDH/LYRIC) expression: significance in malignancy and crucial role in colorectal cancer. *Advances in clinical chemistry*, 106, 235-280.

Gebremedhn. S., Ahmad. I., Salilew-Wondim. D., Sahadevan. S., Hoelker. M., Rings. F., Tesfaye. D. 2014. 113 expression profiling of noncoding microRNAs in bovine granulosa cells of preovulatory dominant follicle using deep sequencing. *Reproduction. Fertility and Development*. 26: 170-171.

Gebremedhn. S., Salilew-Wondim. D., Ahmad. I., Sahadevan. S., Hossain. M. M., Hoelker. M., Tesfaye. D. 2015. MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. *PloS one*. 10: e0125912.

Gecaj. R. M., Schanzenbach. C. I., Kirchner. B., Pfaffl. M. W., Riedmaier. I., Tweedie-Cullen. R. Y., Berisha. B. 2017. The dynamics of microRNA transcriptome in bovine corpus luteum during its formation. function and regression. *Frontiers in genetics*. 8: 213.



Gerritsen, J., Hornung, B., Renckens, B., van Hijum, A., Dos Santos, M., Rijkers, T., Smidt, H. 2017. Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIBT reveals adaptation to the small intestine. *PeerJ*, 5, e3698.

Gómez. M., Morales. M. 2017. Comunicación bidireccional de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema nervioso central y en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién.* 22: 53.

Gómez. M., Ramon. J., Pérez. L., Blanco. J. 2019. El eje microbiota- intestino-cerebro y sus grandes proyecciones. *Rev neurol.*, 19:111.

González-Rascón. A., Mata-Haro. V. 2015. MicroRNAs: Regulators of TLR2-Mediated Probiotic Immune Responses. *MicroRNA.* 4:168.

Griffith. S., Rodríguez. A., Ashurst. J., Bradley. A. 2004a. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research.* 14: 1902-1910.

Griffiths. S. 2004b. The microRNA registry. *Nucleic acids research.* 32: 109.

Grilli. J., Fliegerová. K., Kopečný. J., Lama. P., Egea. V., Sohaefer. N., Mrázek. J. 2016. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe.* 42. 17.

Guan. L., Li. F. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology.* 89: 1.

Guarner. F. 2007. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición hospitalaria.* 22:14.

Guo. J., Li. P., Liu. S., Miao. B., Zeng. B., Jiang. Y., Zhang. H. 2020. Characterization of the Rumen Microbiota and Volatile Fatty Acid Profiles of Weaned Goat Kids under Shrub-Grassland Grazing and Indoor Feeding. *Animals.* 10: 176.

Ha. M., Kim. V. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology.* 15: 509.

Ha, S. E., Jorgensen, B. G., Wei, L., Jin, B., Kim, M. S., Poudrier, S. M., Ro, S. 2022. Metalloendopeptidase ADAM-like Decysin 1 (ADAMDEC1) in colonic subepithelial PDGFR $\alpha$ + cells is a new marker for inflammatory bowel disease. *International journal of molecular sciences.* 23: 5007.

Hanif, Q., Farooq, M., Amin, I., Mansoor, S., Zhang, Y., & Khan, Q. M. (2018). In silico identification of conserved miRNAs and their selective target gene prediction in indicine (*Bos indicus*) cattle. *PLoS One*, 13(10), e0206154.

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Abecia, L., Attwood, G. T. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*. 5: 14567.

Hooper, V., Littman, R., Macpherson, J. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *science*. 336: 1268.

Huang, J., Wang, S., Feng, X., Liu, X., Zhao, J., Zheng, Q., Ma, Y. 2019. miRNA transcriptome comparison between muscle and adipose tissues indicates potential miRNAs associated with intramuscular fat in Chinese swamp buffalo. *Genome*. 62: 729-738.

Indugu, N., Bittinger, K., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Pitta, D. 2016. A comparison of rumen microbial profiles in dairy cows as retrieved by 454 Roche and Ion Torrent (PGM) sequencing platforms. *PeerJ*. 4: 1599.

Iqbal, M. Zhang, Q., Yang, Y., Zou, C., Li, L., Liang, X., Lin, B. 2018. Ruminal fermentation and microbial community differently influenced by four typical subtropical forages in vitro. *Animal Nutrition*. 4:100.

Jaramillo, R., Portillo, A., Jordán, A., García, A. 2018. Evaluación socioeconómica del sistema de ganado bovino en Tejupilco estado de México. 13er. Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria.

Jarett, K., Nayfach, S., Podar, M., Inskeep, W., Ivanova, N., Munson-McGee, J Kyrpides, C. 2018. Single-cell genomics of co-sorted Nanoarchaeota suggests novel putative host associations and diversification of proteins involved in symbiosis. *Microbiome*. 6: 1-14.

Jiao, J., Huang, J., Zhou, C., Tan, Z. 2015. Taxonomic identification of ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats. *Appl. Environ. Microbiol*. 81: 3502.

Jiao, J., Zhou, C., Guan, L. L., McSweeney, C. S., Tang, S., Wang, M., Tan, Z. 2017. Shifts in host mucosal innate immune function are associated with ruminal microbial

succession in supplemental feeding and grazing goats at different ages. *Frontiers in microbiology*. 8: 1655.

Kamra. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current science*. 124.

Khan, S., Shin, E. M., Choi, R. J., Jung, Y. H., Kim, J., Tosun, A., Kim, Y. S. 2011. Suppression of LPS-induced inflammatory and NF- $\kappa$ B responses by anomalin in RAW 264.7 macrophages. *Journal of cellular biochemistry*. 11: 2179-2188.

Kappeler. B. I., Regitano. L. C., Poleti. M. D., Cesar. A. S., Moreira. G., Gasparin. G., Coutinho. L. 2019. MiRNAs differentially expressed in skeletal muscle of animals with divergent estimated breeding values for beef tenderness. *BMC molecular biology*. 20: 1-11.

Kent-Dennis. C., Aschenbach. J. R., Griebel. P. J., & Penner. G. B. 2020. Effects of lipopolysaccharide exposure in primary bovine ruminal epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. 103: 9587-9603.

Kent-Dennis. C., Pasternak. A., Plaizier. J. C., Penner. G. B. 2019. Potential for a localized immune response by the ruminal epithelium in nonpregnant heifers following a short-term subacute ruminal acidosis challenge. *Journal of dairy science*. 102: 7556-7569.

Kim, Y. K., Yu, J., Han, T. S., Park, S. Y., Namkoong, B., Kim, D. H., Kim, V. N. (2009). Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic acids research*, 37(5), 1672-1681.

Kim. M., Morrison. M., Yu. Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS microbiology ecology*. 76: 49.

Klein-Jöbstl. D., Quijada. M., Dzieciol. M., Feldbacher. B., Wagner. M., Drillich. M., Mann. E. 2019. Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PloS one*. 14.

Koch, F., Thom, U., Albrecht, E., Weikard, R., Nolte, W., Kuhla, B., & Kuehn, C. (2019). Heat stress directly impairs gut integrity and recruits distinct immune cell populations into the bovine intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 10333-10338.

Lawless. N., Vegh. P., O'Farrelly. C., Lynn. J. 2014. The Role of microRNAs in Bovine Infection and Immunity. *Frontiers in immunology*. 5: 611.

Lee. Y., Costumbrado. J., Hsu. Y., Kim. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.*, e3923.

Lee, J., Lee, S., Son, J., Lim, H., Kim, E., Kim, D., Choi, I. 2020. Analysis of circulating-microRNA expression in lactating Holstein cows under summer heat stress. *PLoS One*. 15: e0231125.

Lértora. J. 2016. Diarrea viral bovina: actualización. *Revista Veterinaria*. 14: 42.

Li. W., Connor. E., Baldwin. L., Sparks. L. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ Microbiol*. 14: 129.

Li, R., Beaudoin, F., Ammah, A. A., Bissonnette, N., Benchaar, C., Zhao, X., Ibeagha-Awemu, E. M. (2015). Deep sequencing shows microRNA involvement in bovine mammary gland adaptation to diets supplemented with linseed oil or safflower oil. *BMC genomics*, 16(1), 1-16.

Liang. G., Malmuthuge. N., Bao. H., Stothard. P., Griebel. J. 2016. Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system development in the small intestine of neonatal calves. *BMC genomics*. 17: 602.

Liang. G., Malmuthuge. N., McFadden. T., Bao. H., Griebel. J., Stothard. P. 2014. Potential regulatory role of microRNAs in the development of bovine gastrointestinal tract during early life. *PloS one*. 9.

Liu, W., Wan, X., Mu, Z., Li, F., Wang, L., Zhao, J., Huang, X. 2018. MiR-1256 suppresses proliferation and migration of non-small cell lung cancer via regulating TCTN1. *Oncology Letters*. 16: 1708-1714.

Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V., Gasbarrini, A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens.*, 5: 1-8.

Lu. J., Salzberg. S. L., 2020. Ultrafast and accurate 16S rRNA microbial community analysis using Kraken 2. *Microbiome*. 8. 1.

Lu, C., Amin, A., Fox, A. (2020). CD13/aminopeptidase N is a potential therapeutic target for inflammatory disorders. *The Journal of Immunology*. 204: 3-11.

Lugo. A., Trujillo. K. 2009. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria*. 11: 187

Lundborg G. Svensson E y Oltenacu P. 2005. Herd level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0-90 days. *Preventive Veterinary Medicine*. 68: 123.

Luoreng. Z. M., Wang. X. P., Mei. C. G., Zan. L. S. 2018. Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*. 14. 87.

Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Wei, F. 2015. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research*: 4.

Ma. S., Tong. C., Ibeagha-Awemu. E. M., Zhao. X. 2019. Identification and characterization of differentially expressed exosomal microRNAs in bovine milk infected with *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics*. 20:1-13.

Magaña-Monforte, J. G., Ríos-Arjona, G., & Martínez-González, J. C. (2006). Los sistemas de doble propósito y los desafíos en los climas tropicales de México. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 14(3), 105-114.

Malmuthuge N. Li M. Chen Y. Fries PN. Griebel PJ. Baurhoo B. Zhao X., Guan L 2011. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiology*.

Malmuthuge N. Li M. Fries PN. Griebel P., Guan L. 2012. Regional and age dependent changes in gene expression of Toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 146: 18.

Malmuthuge. N. 2016. Role of gut microbiota in neonatal calf gut development. Tesis doctoral. University of Alberta. Edmonton. Canadá.

Malmuthuge. N. 2017. Understanding the gut microbiome of dairy calves: opportunities to improve early-life gut health. *Journal of dairy science*. 100: 5996.

Malmuthuge. N., Griebel. J., Guan. L. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Frontiers in veterinary science*. 2: 36.

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

Malmuthuge. N., Guan. L. 2017. Understanding the gut microbiome of dairy calves: opportunities to improve early-life gut health. *Journal of dairy science*. 100: 5996-6005.

Manzullo. A. 1982. Protección inmunitaria del ternero recién nacido. Jornada Académica 9 y 10 de diciembre. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba.

Margueritte. J., Mattion. N., Blackhall. J., Fernández. F., Parreño. V., Vagnozzi. A., Combessies. G. 2005. Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento. *Sitio argentino de Producción Animal*. 1: 11.

Martella. V., Decaro. N., Buonavoglia. C. 2015. Enteric viral infections in lambs or kids. *Vet Microbiol.*, 181: 154.

Martínez. J., Cotera. J., Abad. J. 2012. Características de la producción y comercialización de leche bovina en sistemas de doble propósito en Dobladero. Veracruz. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 30: 816.

Mayer. M., Abenthuma. J., Matthesa. D., Kleebergera. J., Egeb. C., Holzel. J., Bauer. J., Schwaiger. K. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Vet. Microbiol.*, 161:179.

McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J. L., Glass, E. J., & Jann, O. (2006). Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal genetics*, 37(1), 47-50.

Melendez, E. D., Martínez, A. R., & Vázquez, V. S. (2018). Competitividad de la ganadería de doble propósito en la costa de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 43: 77-88.

Menzies, M., Ingham, A. 2006. Identification and expression of Toll-like receptors 1–10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary immunology and immunopathology.*, 109: 23-30.

Meza. V., Mateos. A. 2019. Crianza de Becerros en el Trópico. *Producción Agropecuaria: Un enfoque integrado*. Universidad del Papaloapan. 1. Ed. Oaxaca. México.

Minuti. A., Palladino. A., Khan. M. J., Alqarni. S., Agrawal. A., Piccioli-Capelli. F., Loor. J. J. (2015). Abundance of ruminal bacteria, epithelial gene expression, and systemic biomarkers of metabolism and inflammation are altered during the periparturient period in dairy cows. *Journal of dairy science*. 98(12). 8940-8951.

Mishra. S. R. 2020. Significance of molecular chaperones and micro RNAs in acquisition of thermo-tolerance in dairy cattle. *Animal Biotechnology*. 1-11.

Monforte. M., Arjona. R., González. M. 2006. Los sistemas de doble propósito y los desafíos en los climas tropicales de México. *Arch Latinoam Prod Anim*. 14:105.

Mukiibi. R., Johnston. D., Vinsky. M., Fitzsimmons. C., Stothard. P., Waters. S. M., Li. C. 2020. Bovine hepatic miRNAome profiling and differential miRNA expression analyses between beef steers with divergent feed efficiency phenotypes. *Scientific reports*. 10: 1-17.

Nájera-Garduño, A. D. L., Piedra-Matias, R., Albarrán-Portillo, B., & García-Martínez, A. (2016). Cambios en la ganadería doble propósito en el trópico seco del estado de México. *Agrociencia*, 50: 701-710.

Nava. M., Stappenbeck., S. 2011. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut microbes*. 2: 99.

Olguin. A. Síndrome Diarreico Neonatal. *Clinica de Bovinos I*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 11 de noviembre del 2019 de [[http://www.ammveb.net/clinica/sindrome\\_diarreico\\_neonatal.pdf](http://www.ammveb.net/clinica/sindrome_diarreico_neonatal.pdf)]

Orantes. Á., Platas. D., Córdova. V., los Santos-Lara. D., del Carmen. M., Córdova-Avalos. A. 2014. Caracterización de la ganadería de doble propósito en una región de Chiapas. México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 1: 49.

Pabón. Y. 2011. MicroARNs: una visión molecular. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud.*, 43.

Opsal, M. A., Våge, D. I., Hayes, B., Berget, I., Lien, S. 2006. Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6-TLR1-TLR10. *Gene*. 384: 45-50.

Pacífico, C., Ricci, S., Sajovitz, F., Castillo-Lopez, E., Rivera-Chacon, R., Petri, R. M., Kreuzer-Redmer, S. (2022). Bovine rumen epithelial miRNA-mRNA dynamics

reveals post-transcriptional regulation of gene expression upon transition to high-grain feeding and phytogetic supplementation. *Genomics*, 114(3), 110333.

Pardo. D. 2012. Determinación de los factores de riesgo y de los agentes etiologicos asociados con la presentación de diarrea neonatal bovina (dnb) en fincas de la sabana de Bogotá. Tesis de maestria. Universidad Nacional de Bogotá. Bogotá. Colombia.

Pardo. D., Oliver. O. 2012. Identificación de agentes infecciosos asociados con Diarrea Neonatal Bovina en la Sabana de Bogotá. *Revista MVZ Córdoba*. 17: 3162.

Park, H. E., Park, H. T., Jung, Y. H., & Yoo, H. S. (2018). Gene expression profiles of immune-regulatory genes in whole blood of cattle with a subclinical infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One*, 13(4), e0196502.

Pech. M., Carvajal. H., Montes. P. 2007. Impacto Económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la zona centro del estado de Yucatán. México. *Tropical and Subtropical. Agroecosystems*. 7: 127.

Pejenaute. E., Ricote. M. 2018. Desde el intestino a la piel probióticos en la práctica clínica. Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria. Editorial IMC. Madrid. España.

Pérez. P., Rojo. R., Álvarez. A., García. J., Ávila. C., López. S. 2003. Necesidades de investigación y transferencia de tecnología de la cadena de bovinos de doble propósito en el estado de Veracruz. Fundación Produce Veracruz. P.170.

Petri. M., Schwaiger. T., Penner. B., Beauchemin. A., Forster. R. J., McKinnon. J., McAllister. A. 2013. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *PloS one*. 8.

Rajsbaum, R., García-Sastre, A., & Versteeg, G. A. 2014. TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *Journal of molecular biology*. 426: 1265-1284.

REDGATRO. 2018. Estado del arte sobre investigación e innovación tecnológica en ganadería bovina tropical. Libro Técnico. 2° Ed. México.



Reinhardt. G., Zamora. J., Riedeniann. S., Tadich. N., Montecinos. I. 1991. Diagnóstico etiológico de diarrea neonatal del ternero mediante la prueba inmunoenzimática (ELISA). Arch. Med. Vet. 23: 189.

Reis de Souza, T. C., Mariscal Landín, G., & Escobar García, K. (2010). Algunos factores fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. Veterinaria México, 41(4), 275-288.

Rocha. J., González. R., Ávila. R., Peña. B., Reyes. A. 2019. Economic impact of mortality and morbidity from diseases in dairy calves. Abanico Veterinario. 9: 1.

Roche. S. M., Von Massow. M., Renaud. D., Shock. D. A., Jones-Bitton. A., & Kelton. D. F. 2020. Cost-benefit of implementing a participatory extension model for improving on-farm adoption of Johne's disease control recommendations. Journal of dairy science. 103. 451-472.

Roh. W., Kim. J. Y., Whon. W., Lim. M. Y., Kim. Y. B., Kim. N., Nam. I. 2020. The human gut archaeome: identification of diverse haloarchaea in Korean subjects.

Román-Ponce, H., Reyes, L. O., Andrade, L. H., Aparicio, E. D., García, J. A. E., Hernández, G. N., López, F. D. J. R. (2009). Producción de leche de bovino en el sistema de doble propósito. Centro de Investigación Regional Golfo-centro. Libro Técnico, 23.

Román. S., Ruíz. F., Montaldo. H., Rizzi. R. 2013. Efectos de cruzamiento para producción de leche y características de crecimiento en bovinos de doble propósito en el trópico. Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria. 4: 405.

Rommel, C., Camps, M., Ji, H. 2007. PI3K $\delta$  and PI3K $\gamma$ : partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?. Nature Reviews Immunology. 7: 191-201.

Rosa. F., Busato. S., Avaroma. C., Linville. K., Trevisi. E., Osorio. J. 2018. Transcriptional changes detected in fecal RNA of neonatal dairy calves undergoing a mild diarrhea are associated with inflammatory biomarkers. PLoS ONE 13: e0191599.

RTL Genomics. 2019. Data Analysis Methodology for Microbial Diversity.

Sánchez. M. 2018. Claves para mejorar la ganadería de doble propósito. Contexto Ganadero Consultado el 6 de noviembre del 2019 de

<https://www.contextoganadero.com/blog/claves-para-mejorar-la-ganaderia-de-doble-proposito>.

Sánchez-Zauco, N. A., Giono-Cerezo, S., & Maldonado-Bernal, C. (2010). Toll-like receptors, pathogenesis and immune response to *Helicobacter pylori*. *Salud Publica de Mexico*, 52(5), 447-454.

Sbardellati, L., Fischer, A., Cox, S., Li, W., Kalscheur, F., Suen, G. 2020. The bovine epimural microbiota displays compositional and structural heterogeneity across different ruminal locations. *Journal of Dairy Science*. 103: 3636.

Seabury, C. M., Cargill, E. J., Womack, J. E. 2007. Sequence variability and protein domain architectures for bovine Toll-like receptors 1, 5, and 10. *Genomics*. 90: 502-515.

Sengar, G. S., Deb, R., Singh, U., Junghare, V., Hazra, S., Raja, T. V., Joshi, C. G. 2018. Identification of differentially expressed microRNAs in Sahiwal (*Bos indicus*) breed of cattle during thermal stress. *Cell Stress and Chaperones*. 23: 1019-1032.

Sentandreu, R. 2017. El hombre y los microorganismos: el eje cerebro-intestino. *An Real Acad Farm*. 83: 360.

Stenfeldt, C., Arzt, J., Smoliga, G., LaRocco, M., Gutkoska, J., Lawrence, P. 2017. Proof-of-concept study: profile of circulating microRNAs in Bovine serum harvested during acute and persistent FMDV infection. *Virology journal*. 14: 1-18.

Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 67: 2766-2774.

Tapio, I., Fischer, D., Blasco, L., Tapio, M., Wallace, R. J., Bayat, A., Vilkki, J. 2017. Taxon abundance, diversity co-occurrence and network analysis of the ruminal microbiota in response to dietary changes in dairy cows. *PloS one*. 12: 1.

Taschuk, R., Griebel, J. 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal health research reviews*. 13: 129.

Taschuk, R., Griebel, P. 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal health research reviews*. 13: 129.

Tepán. R. 2011. Diarrea neonatal de los terneros. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cuenca.

Tong. H., Jiang. R., Liu. T., Wei. Y., Li. S., Yan. Y. 2018. bta-miR-378 promote the differentiation of bovine skeletal muscle-derived satellite cells. *Gene*. 668: 246-251.

Torres. Y. 2015. Plan de negocios para ganado bovino de doble propósito en la comunidad de Allende. Quintana Roo. Informe Técnico de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

Trevisi. E., Amadori. M., Riva. F., Bertoni. G., & Bani. P. 2014. Evaluation of innate immune responses in bovine forestomachs. *Research in Veterinary Science*. 96: 69-78.

TRIZOL Reagent technical insert Invitrogen.

Vahanan, B. M., Raj, G. D., Pawar, R. M. C., Gopinath, V. P., Raja, A., Thangavelu, A. 2008. Expression profile of toll like receptors in a range of water buffalo tissues (*Bubalus bubalis*). *Veterinary immunology and immunopathology*. 126: 149-155.

Van Gylswyk, N. O. 1995. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45: 297-300.

Vences-Pérez, J., Martínez-García, C. G., Morales-Almaraz, E., Albarrán-Portillo, B., Rayas-Amor, A. A., Vázquez-Armijo, J. F., & García-Martínez, A. (2021). Análisis socioeconómico y tendencias de desarrollo de la ganadería doble propósito en tropico seco. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24, 57.

Vilaboa. J., Díaz. P. 2009. Caracterización socioeconómica de los sistemas ganaderos en siete municipios del estado de Veracruz. México. *Zootecnia Tropical*. 27: 427.

Villena. J., Aso. H., & Kitazawa. H. 2014. Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: role of signaling pathways and negative regulators. *Frontiers in immunology*. 5. 421.

Wahid. F., Shehzad. A., Khan. T., Kim. Y. 2010. MicroRNAs: Synthesis mechanism function and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*., 1803: 1231.

Wang. L., Xu. Q., Kong. F., Yang. Y., Wu. D., Mishra. S., Li. Y. 2016. Exploring the Goat Rumen Microbiome from Seven Days to Two Years. PLoS ONE,. 11

Weichhart, T., Costantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K. M., Säemann, D. 2008. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity*. 29: 565-577.

Werling. D., Piercy. J., Coffey. T. J. 2006. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells—potential role in pathogen discrimination. *Veterinary immunology and immunopathology*. 112: 2-11.

Wicik. Z., Gajewska. M., Majewska. A., Walkiewicz. D., Osińska. E., Motyl. T. 2016. Characterization of micro RNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 133: 31-42.

Williams. A. 2019. Rarefaction. Alpha Diversity and Statistics. *Front. Microbiol.*, 10: 2407.

Windeyer. M., Leslie. E., Godden. M., Hodgins. C., Lissemore. D., LeBlanc. J. 2014. Factors associated with morbidity mortality and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive veterinary medicine*. 113. 231-240.

Xue. M., Sun. H., Wu. X., Liu. J. 2018. Assessment of rumen microbiota from a large dairy cattle cohort reveals the pan and core bacteriomes contributing to varied phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84.

Yadav. P., Yadav. B., Swain. D. K., Anand. M., Yadav. S., & Madan. A. K. 2021. Differential expression of miRNAs and related mRNAs during heat stress in buffalo heifers. *Journal of Thermal Biology*. 97: 102904.



Yang, W., Gu, Z., Zhang, H., Hu, H. 2020. To TRIM the immunity: from innate to adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*. 11, 02157.

Yáñez-Ruiz. D. R., Abecia. L., & Newbold. C. J. 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in microbiology*. 6. 1133.

Zeineldin, M., Barakat, R., Elolimy, A., Salem, A. Z., Elghandour, M. M., Monroy, J. C. 2018. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microbial pathogenesis*. 124: 106-115.

- Zhong. T., Hu. J., Xiao. P., Zhan. S., Wang. L., Guo. J., Li. L., Zhang. H., Niu. L. 2017. Identification and characterization of microRNAs in the goat (*Capra hircus*) rumen during embryonic development. *Front. Genet.*, 8:163.
- Zhou. Z., Meng. Q., Yu. Z. 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in in vitro ruminal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:2634-2639.
- Zhou, M., Chen, Y., & Guan, L. L. (2015). Rumen bacteria. *Rumen microbiology: from evolution to revolution*, 79-95.
- Zhou, J., Chen, J., Zhang, X. M., Gao, Z. C., Liu, C. C., Zhang, Y. N., Zhou, B. 2018. Porcine Mx1 protein inhibits classical swine fever virus replication by targeting nonstructural protein NS5B. *Journal of Virology*, 92(7), e02147-17.
- Zi. C., Zeng. D., Zhou. J., Dai. J., Jiang. L., Xue. F., Li. B. 2018. Selected microRNA-192 mutant indicates association with several function genes in bovine cells. *Genes & genomics*. 40: 361-371.

# Microbial colonization dynamics of the postnatal digestive tract of *Bos indicus* calves

Carolina Robles-Rodríguez<sup>1</sup>  | Vijaykumar Yogesh Muley<sup>2</sup> |  
 María Laura González-Dávalos<sup>3</sup> | Armando Shimada<sup>3</sup> | Alfredo Varela-Echavarría<sup>2</sup> |  
 Ofelia Mora<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Mexico

## Correspondence

Ofelia Mora, Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Mexico.  
 Email: [ofemora66@unam.mx](mailto:ofemora66@unam.mx); [ofemora2001@yahoo.com.mx](mailto:ofemora2001@yahoo.com.mx)

## Funding information

PAPIIT-UNAM, Grant/Award Number: IN211518

## Abstract

The rumen and the jejunum of calves have distinct functional roles; the former is in the storage and fermentation of feed, and the latter is in transporting digesta to the ileum. It is unknown how nutrition changes the evolution of the microbiome of these organs after birth. We sequenced and characterized the entire microbiome of the rumen and the jejunum from *Bos indicus* calves of the Mexican Tropics to study their dynamics at Days 0, 7, 28, and 42 after birth. Operational taxonomic units (OTUs) belonging to 185 and 222 genera from 15 phylum were observed in the organs, respectively. The most abundant OTUs were Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes. We observed that proteobacterial species were outcompeted after the first week of life by Bacteroidetes and Firmicutes in the rumen and the jejunum, respectively. Moreover, *Prevotella* species were found to predominate in the rumen (36% of total OTUs), while the jejunum microbiome is composed of small proportions of several genera. Presumably, their high relative abundance assists in specialized functions and is more likely in fermentation since they are anaerobes. In summary, the rumen and the jejunum microbiomes were outcompeted by new microbiomes in a dynamic process that begins at birth.

## KEYWORDS

*Bos indicus*, calves, jejunum, microbiome, rumen

## 1 | INTRODUCTION

Ruminants possess a diversity of microbial communities in their digestive tract, which enables them to digest the consumed forages and, therefore, meet their energy and metabolic demands, hence playing an important role in maintaining their well-being and health. The colonization by the initial microbiota is a dynamic process that occurs during the postnatal period and can be influenced by diverse factors, including the diet, the feeding method (breast or

artificial feeding), the birth canal's microbiota, and the surrounding environment.

An additional complexity level of the ruminant gut microbiota is that its composition varies along the different sections of the digestive tract (Bergmann, 2017). In the rumen and the jejunum, for instance, there are distinct microbial populations from different ecological niches at different life stages, enhancing nutrient utilization and decreasing the onset of enteric diseases (Bergmann, 2017; Jiao et al., 2015; Zheng et al., 2021).

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Animal Science Journal* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Japanese Society of Animal Science.

Several investigations have analyzed the establishment of microbiota in the gastrointestinal tract (GIT) in calves (Alipour et al., 2018; Amin et al., 2021; Jami et al., 2013; Meale et al., 2017; Rey et al., 2014), but few studies have focused on the rumen and the jejunum microbiota just after birth. Furthermore, research on the tropical *Bos indicus* Zebu experiments is scarce (Korir et al., 2022; Pandit et al., 2018). Likewise, the previous works on digestive tract microbiomes in ruminants relied on bacterial culture techniques, which detect a limited fraction of the species present (Pitta et al., 2010). However, next-generation sequencing techniques and metagenomics have allowed us to overcome this limitation and expand our understanding of the digestive tract microbiota and its interactions with the host animal.

This study aimed to characterize the ruminal and the jejunal microbial colonization of Zebu calves from the Mexican Tropics, during the postnatal period at Days 0, 7, 28, and 42. We reveal that the initial microbial communities in the rumen and the jejunum undergo a reorganization just after birth and describe competitive colonization patterns. Overall, this study provides insights into the establishment and development of the microbiota in tropical ruminant digestive tracts, which could lead to better strategies for promoting animal health and productivity.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals and sampling

The experimental protocols were approved by the Internal Committee for the Experimental Animal Care and Use of the National Autonomous University of Mexico (CICUAE.DC-2019/4-2, CICUAE, UNAM, Ciudad de México, México) following the NOM-062-ZOO-1999. The animals were obtained from the Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT, UNAM, Tlapacoyan, Veracruz State, México).

We used 12 clinically healthy newborn Zebu calves, three per group ( $n = 3$ ) of 0, 7, 28, and 42 days. Calves at Age 0 were sacrificed immediately after birth without ingesting colostrum (Zhong et al., 2017). Calves 7, 28, and 42 days old received the same management in the livestock unit (up to their sacrifice), which included 4-day ingestion of colostrum from the dam in a maternity pen. After this period, the calves were separated from the cow and moved to the rearing area with the rest of the calves, where they were fed with a milk replacer prepared in warm water (MR; Calf Milk Replacer, Purina with 22% protein and 12% fat; Agriband Purina de México, México), administered in two portions at 07:00 and 17:00 h.

The daily amount of MR administered from 1 to 10 days of age was 4 L of MR; from 11 to 20 days, with 6 L of MR; and from 21 to 35 days with 8 L of MR, and from Days 36 to 42; weaning began by giving 4 L of MR in a single administration in the mornings.

They were allowed free access to grazing forage, and from the second week on, 4.1 kg of concentrate pellets per animal was daily given (Ampli-Calf Starter, Purina with 18% protein; Purina Animal Nutrition, LLC, United States).

All calves were euthanized using a captive bolt gun, and samples were collected within 30 min thereafter. Ruminal and intestinal (jejunum) contents (5 to 30 ml in two separate tubes) were collected from all animals; content from the jejunum was collected from a site approximately 60 cm after the duodenal flexure. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen for further analysis (Liang et al., 2014, 2016).

### 2.2 | DNA extraction

To determine microbial diversity, we extracted genomic DNA from each sample with the RBB + C method (Yu & Morrison, 2004) using zirconium beads and lysis buffer for cell disruption, followed by precipitation of nucleic acid using 10 M ammonium acetate, isopropanol, and 70% ethanol. Finally, the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Aarhus, Denmark) columns were used for protein removal and DNA purification.

DNA concentration was quantified using a Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States), and at least 20 ng of total DNA from the rumen and jejunum samples was used to prepare libraries for sequencing.

These libraries comprised three replicates of samples from calves of 0, 7, 28, and 42 days of age. Product integrity was confirmed on a 1% agarose gel. Subsequently, DNA samples were sequenced by RTL Genomics (Lubbock, TX, United States), using primers covering the V4 region of 16 s ribosomal RNA (357wF:3'-CCTACGGGNGGCWGCAG-5'; 785R:3'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-5') and the Illumina MiSeq platform (paired-end, 250 nucleotides).

The resulting sequencing Fastq files were subjected to the USEARCH V.11 pipeline for quality control and follow-up analyses. Quality control involved removing adapters and partial sequence reads, with reads <200 bp excluded from the analysis and the target set up to 400 bp. We then clustered the selected reads using UCLUST into operational taxonomic units (OTUs) (Edgar, 2010). The OTU taxonomy was determined based on 97% identity with the known taxa in the RDP V.16 16S ribosomal RNA reference database (Edgar, 2010).

Sequencing data were deposited in the NCBI SRA database, project number PRJNA945191.

### 2.3 | Statistical analysis of the data

The statistical data analysis was performed using the R statistical programming and the Phyloseq package (McMurdie & Holmes, 2013). Alpha-diversity values for microbial communities in ruminal and jejunum samples were obtained using observed OTUs, Pielou's evenness index, and Shannon's diversity index through the microbiome Bioconductor R package. Relative abundance was computed using the transform function from the microbiome Bioconductor package employing a compositional method. The transform function was also used to normalize the data with the center log-ratio (CLR). Both transformations were applied to counts summed at the phylum level. The

Kruskal–Wallis test was used to evaluate the statistical significance of the CLR value differences among the four age groups. The null hypothesis was that CLR values did not vary across four age groups, and the alternative hypothesis was that they differed in at least one of the four age groups. Dunn's multiple comparison post hoc test was used to evaluate the statistical significance between pairs of the four age groups. The resulting *p* values were adjusted for multiple hypothesis testing using the Benjamini and Hochberg (1995) method. The null hypothesis for the test was that there was no difference between the two age groups, and the alternate hypothesis was that there was a difference between the groups. The significance of the overlap among genera across the four age groups was determined using Fisher's exact test.

### 3 | RESULTS

To determine microbial diversity in the rumen and jejunum, we analyzed samples from newborn Zebu calves of 0, 7, 28, and 42 days old. On average, 89% of reads of all libraries passed quality checks and were subsequently mapped to 998 and 787 OTUs in rumen and jejunum samples, respectively. These OTUs belonged to a total of 16 and 15 phyla in each organ, respectively. The total reads mapped to OTUs were 170,182 and 193,180 in the rumen and the jejunum, respectively. The total number of OTUs with less than three reads (i.e., singletons and doubletons) was 102 and 80 in the rumen and the jejunum, respectively, representing approximately 10% of OTUs and potentially being spurious. However, since the number of potential spurious OTUs was small, we used all of them for further analyses unless otherwise specified.

#### 3.1 | Microbial diversity of rumen and jejunum differs at the beginning and end of the postnatal period

To gain insight into the structure and dynamics of the microbial communities of rumen and jejunum, we computed the alpha-diversity measures, including the number of observed OTUs (i.e., richness), Pielou's evenness index (i.e., the homogeneity of species counts in a sample), and Shannon diversity index (i.e., diversity along with species richness). These indices are global indicators of the ecosystem state and were calculated from raw read counts in each sample.

Figure 1 displays the microbiome richness, evenness, and diversity across 0 to 42 *postpartum* days in the rumen and the jejunum. In both organs, alpha diversity indices markedly decreased from Days 0 to 7 and then increased at Day 28 to levels exceeding those observed at Day 0. In the jejunum, alpha-diversity continued to increase at Day 42, whereas in the rumen, it decreased (Figure 1b). These results suggest that the original microbiota of newborns in both organs persist for less than a week and are replaced within a month with new microbiota with high diversity, richness, and evenness.

In the rumen, richness exhibited a statistically significant difference ( $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis test), indicating that a selection occurs

from Day 0 with a reduction of the abundance of specific microbes, with new ones emerging at 28 days, and many being selected up to Day 42 (Figure 1a).

Overall, a noticeable difference between species richness and diversity in both organs was observed for samples from 0 to 7 and 28 to 42 postnatal days. To confirm this, we transformed the read count to the relative abundance of OTUs and used this compositional matrix to perform detrended correspondence analysis using the Bray–Curtis distance metric (beta diversity). This ordinate analysis confirmed the similarity of the Day 0 samples with the 7- and 28-day with the 42-day samples (Figure 2), supporting the notion that the global shift in the diversity and richness of microbial communities occurs after the first weeks of postnatal development. Overall, rumen and jejunum microbial diversity shows a clear distinction between 0–7 and 28–42 days.

#### 3.2 | Species of Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, and Actinobacteria predominate in rumen and jejunum microbiota

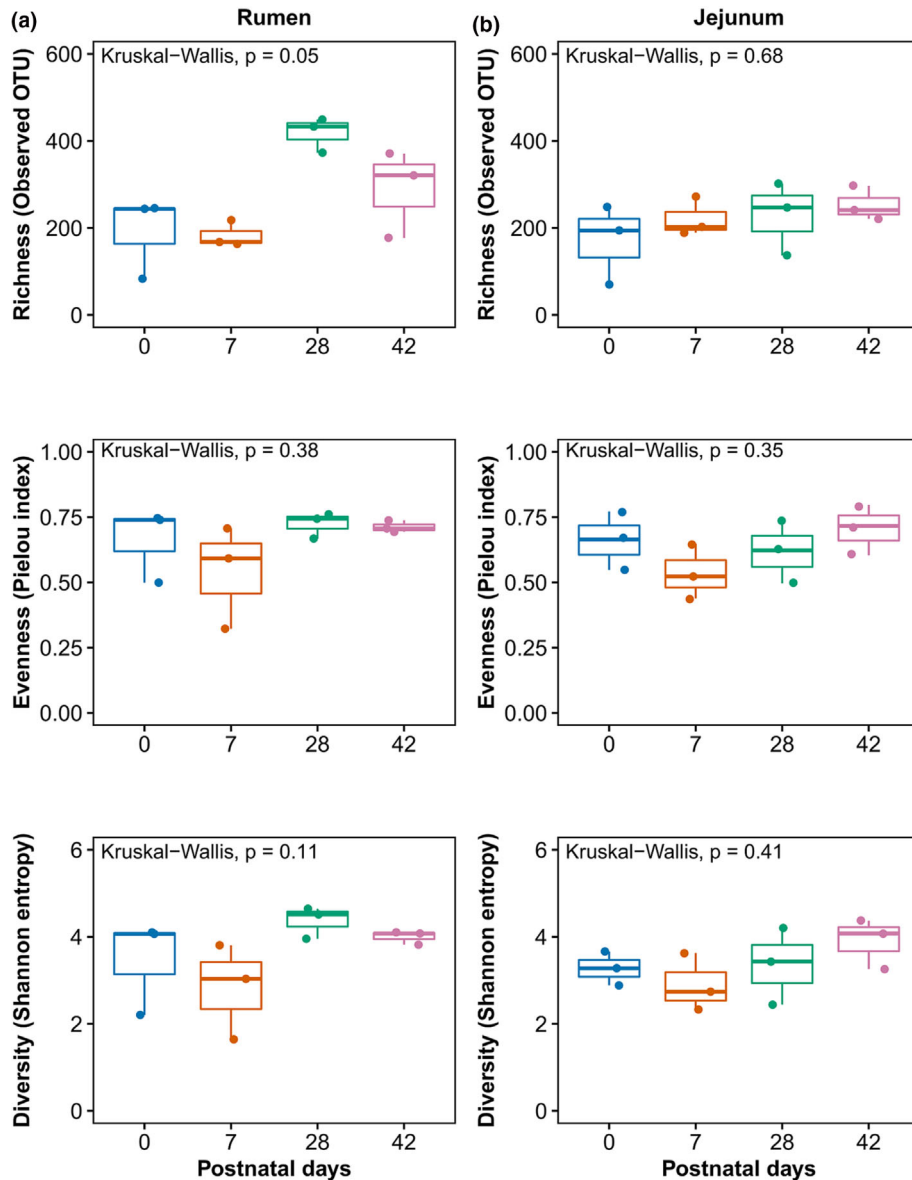
Figure 3 presents the relative abundance of phylum and genera identified across the postnatal days analyzed in this study. Species of Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, and Actinobacteria were quantitatively dominant comprising 97.69% and 95.68% of the total species, identified in rumen and jejunum, respectively (Figure 3a,b). Bacteroidetes were the most abundant in the rumen accounting for 52.30% of OTUs while only 13.85% in the jejunum. In contrast, Firmicutes were most prevalent in the jejunum constituting 52.86%, and only 21.74% in the rumen. In contrast, the percentage of Actinobacteria was higher in the jejunum (8.13%) than in the rumen (4.71%), while Proteobacteria were present at similar levels in both organs, with 18.94% in the rumen and 20.84% in the jejunum. At the beginning of the culture, however, Proteobacteria dominated in both organs and declined over time (Figure 3a,b). Interestingly, Proteobacteria appear to be competitively replaced by Bacteroidetes in the rumen (Figure 3a) and Firmicutes in the jejunum (Figure 3b).

At the genus level, the OTUs belonged to 185 (including 3 unidentified) and 222 (including 18 unidentified) genera in the rumen and the jejunum, respectively, suggesting a higher microbial diversity in the latter. Nevertheless, only 121 (42.31%) genera were presented in both organs revealing their strikingly different microbial composition of both organs (Figure 3c).

*Prevotella* genus members predominate in the rumen contributing to 36.47% of the total OTUs observed (Figure 3a). The remaining genera constitute less than 5% of OTUs, which included *Bacteroides* (4.31%), *Barnesiella* (3.31%), *Streptococcus* (3.21%), and *Acinetobacter* (1.90%). In contrast, in the jejunum, many genera contribute to the microbiome in small proportions, and not a single genus predominates (Figure 3b). In this organ, the most abundant genus is *Prevotella*, with 5.21% of OTUs, followed by *Lachnospiracea\_incertae\_sedis* (4.07%), *Acinetobacter* (3.05%), *Ruminococcus* (2.80%), and *Olsenella* (2.29%) (Figure 3b).

Many genera observed in the rumen can also be found in the jejunum at comparable proportions. However, only a few jejunum genera can be found in the rumen (Figure 3c). These results indicate that the





**FIGURE 1** Temporal changes of richness, evenness and diversity in the rumen (a) and the jejunum (b) during postpartum development in Mexican calves across 0, 7, 28, and 42 days postpartum.

rumen microbiota is shared with the jejunum's but the latter differs greatly in composition.

Overall, these results reveal a dynamic reorganization of the original microbiota that takes place during postpartum development. Rumen microbiota mainly composes of *Prevotella* genus members, while many genera contribute to the jejunum microbiota.

### 3.3 | Establishment of new genera in rumen and jejunum at the end of the postnatal period

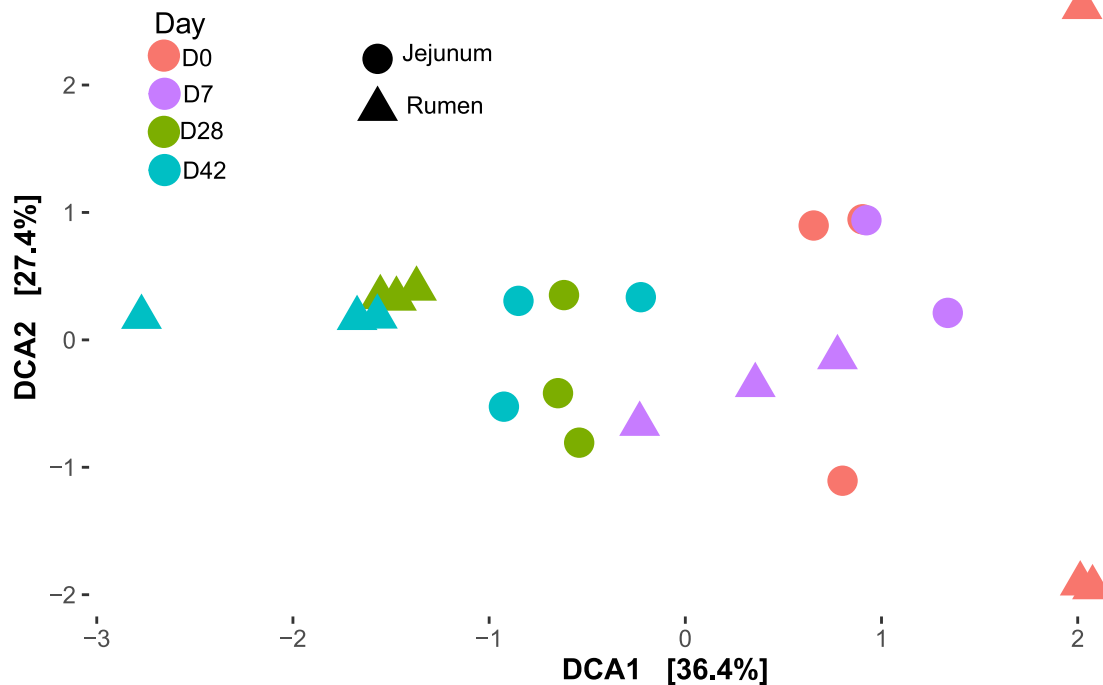
The overlap of genera in the four age groups was computed, and the statistical significance was evaluated using the Fisher exact test (Figure 4). In the rumen, there is a significant overlap between Days 0 and 7 ( $p = 0.0022$ ) and between Days 28 and 42 ( $p < 2e-16$ ) (Figure 4a). Similarly, in the jejunum, there is a significant overlap between Days 0 and 7 ( $p = 7.9e-08$ ) and between Days 28 and

42 ( $p = 2.8e-12$ ) (Figure 4b). These results were consistent with the principal coordinate analysis and the alpha-diversity measures across these age groups (Figures 1 and 2). Furthermore, only 47 (25.41%) and 83 (37.39%) genera were present across all age groups in the rumen and the jejunum, respectively. However, many genera are exclusively present at Days 28 and 42, constituting 24.32% of total rumen genera, while 20.27% in the jejunum.

In summary, these results reveal that the microbial composition of the microbiome on Days 0 and 7 is significantly similar, as is the composition between Days 28 and 42. Moreover, more than 20% of the genera in both organs were exclusively established on Days 28 and 42.

## 4 | DISCUSSION

The number and diversity of microorganisms are often related to the ecological niche in which they thrive, and the anatomical regions they



**FIGURE 2** Detrended correspondence analysis (DCA) scatter plot based on Bray–Curtis distances between the relative abundance of microbial communities in four age groups in the rumen and the jejunum.

inhabit are no exceptions to this trend. The rumen and jejunum aid in the digestion of ingested food. The rumen acts as both a feed storage vat and a major fermentation hub favoring the growth of microbes that can digest feed within the organ and produce volatile fatty acids, most of which are then absorbed in situ. In contrast, the jejunum's major function is to absorb small nutrient molecules that have been previously digested by the duodenum for transport to the liver. Therefore, the microbes adapted to the rumen are expected to be specialized and different from those in the jejunum. The influence of prenatal and postnatal dietary changes on the establishment and composition of microbial communities in the digestive tract of calves during early development has been studied by Dias et al. (2018) and Cui et al. (2020), but questions remain.

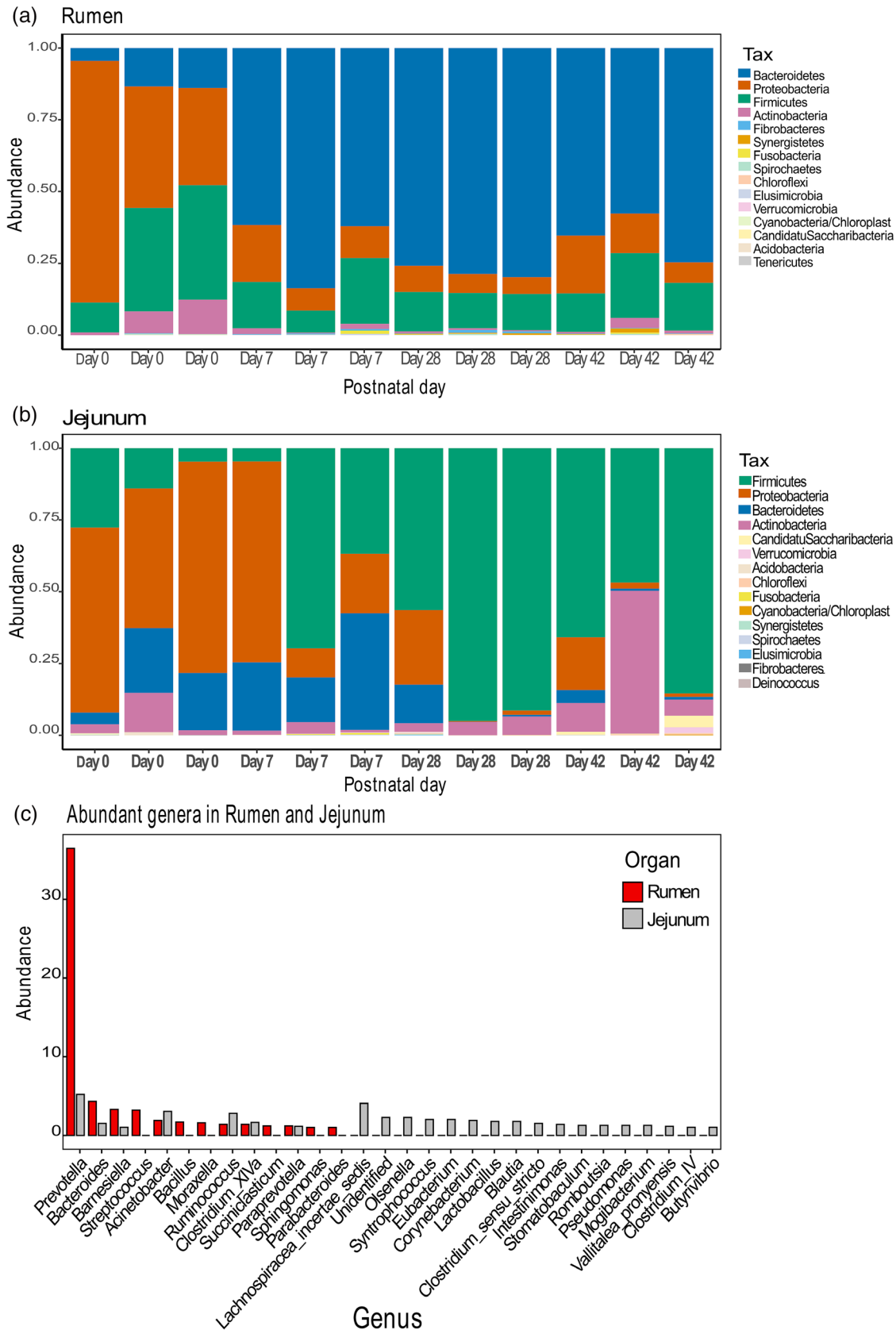
In this study, we considered the microbial communities of the rumen and jejunum of the first day (Day 0) of newborn calves as a reference point. We determined how their composition changes after 7, 28, and 42 days, covering the postpartum development period. We used alpha-diversity measures, principal coordinate analysis, relative abundance, and significant overlap between genera in those age groups.

The alpha diversity measures, used to compare species richness, evenness, and diversity, showed substantial differences in the rumen and jejunum. A statistically significant difference was observed in the rumen, at least in one of the age groups, and all alpha diversity measures were higher on Days 28 and 42. In contrast, alpha diversity measures increased substantially over the latter time points in the jejunum, but the difference was not statistically significant. These results are consistent with previous studies by Malmuthuge et al.

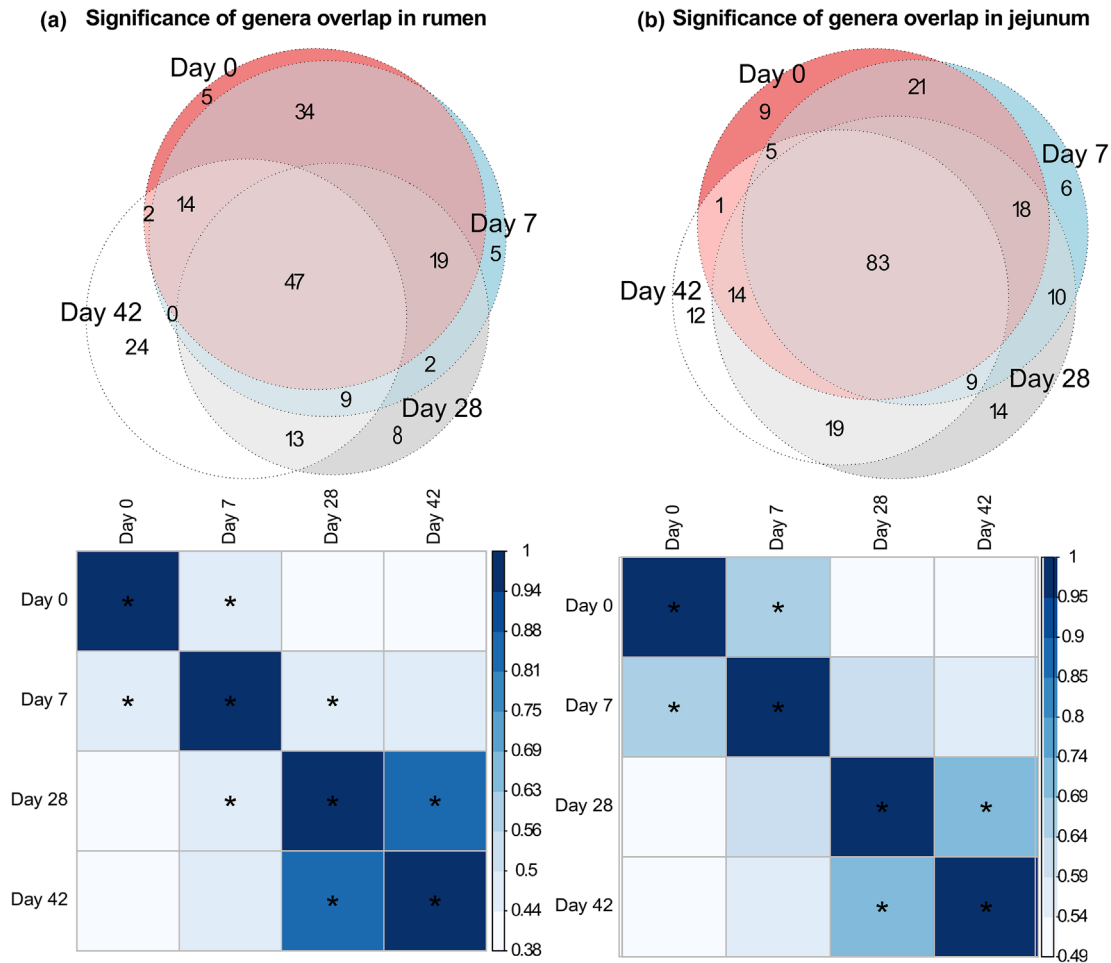
(2019) and Mao et al. (2015), which compared alpha diversity indices between mucosal tissues and digest of each gut region and found higher values in the rumen than in the jejunum. The alpha diversity of the bacterial community showed a close relationship between 0- and 7-day age groups and similarly between 28- and 42-day age groups (Figures 1 and 2). The microbial diversity in the rumen and the jejunum of calves aged 28 and 42 days was significantly higher than that observed in samples taken at Days 0 and 7, aligning with earlier studies that reported increased species richness and diversity with age (Klein-Jöbstl et al., 2014; Oikonomou et al., 2013), as well as a surge in alpha diversity measures by Day 28 (Austin et al., 2018).

Alipour et al. (2018) reported a significant decrease in species richness, diversity, and the number of observed OTUs between 6 and 24 h after birth; Yeoman et al. (2018) also observed a decline in the mean of Chao1, Shannon, and observed OTUs. Similarly, Malmuthuge et al. (2019) reported a change in the microbial profiles in the first hours after birth, in which the microbiota appeared to stabilize its populations in mature animals. Our results also revealed changes in microbial composition shortly after the first week of birth, likely to be influenced by the ingested food.

The inoculation of the newborn's rumen with microbes begins immediately after birth through various sources, such as the vaginal canal, fecal material, colostrum, skin, and saliva from the dam. Meale et al. (2017) have reported the presence of methanogens, fibrinolytic bacteria, or *Proteobacterium* species in the rumen of calves less than 20 min after birth, suggesting that inoculation may occur even before birth. Consistently, we observed a very high relative abundance of *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria* in both



**FIGURE 3** Temporal variations in the relative abundance of microbial phyla identified in the rumen (a) and jejunum (b). The relative abundance of phylum identified in the rumen and jejunum in 0-, 7-, 28-, and 42-day old calves from the Mexican tropics.



**FIGURE 4** Comparative overlap of genera across Days 0, 7, 28, and 42 shows the introduction of several new genera at Days 28 and 42 of the postpartum developmental period and shows the overlap of genera across four-time points in the rumen (a) and jejunum (b) using Fisher-exact tests, and color intensity represents the similarity of gene groups based on the common genera in them.

organs. However, their composition changed gradually with age and differentially in the rumen and the jejunum.

Proteobacteria members were the most abundant at Day 0 in both organs but declined in numbers with age and appeared to be outcompeted by Bacteroidetes in the rumen and Firmicutes in the jejunum. Proteobacterium species promote an anaerobic environment that favors the colonization and fermentative activities of rumen microorganisms, which could play an essential role in blood oxygen uptake and ruminal ammonia oxidation (Amin et al., 2021). Consistent with their functions in the gut, our results suggest that Proteobacterium species provide an environment for many anaerobic Bacteroidetes and Firmicutes species to grow.

Jiao et al. (2015) reported that the rumen of Proteobacteria predominates in the first few postnatal days (90%), which decreases drastically with age. By Day 42, the most abundant phylum was Firmicutes, which was also observed by Sbardellati et al. (2020). On the other hand, Indugu et al. (2016) found a higher proportion of Bacteroidetes, followed by Firmicutes, in their analysis of ruminal bacteria, which was attributed to a diet based on milk replacer, thus allowing greater development of Bacteroidetes as was mentioned earlier.

According to our observation, the inoculation of newborns with microbes from the dam may begin during birth. Studies by Klein-Jöbstl et al. (2019) and Taschuk and Griebel (2012) have shown that the most significant phylum was Firmicutes, whereas colostrum contains Proteobacteria. Interestingly, this is consistent with their observation that the fecal and intestinal microbiota of calves was similar to that of their mother's vaginal canal, suggesting it may be acquired from the birth canal at birth. Our findings also confirm that the Firmicutes phylum is the most prevalent at birth in the jejunum.

Dias et al. (2018) described that several taxa coexisted in the rumen, jejunum, cecum, and colon but that their abundances differed considerably by GIT region and age. As calves aged, it observed lower abundances of genus such as *Bacteroides*, *Parabacteroides*, and *Paraprevotella* with higher abundances of *Bulleidia* and *Succiniclasticum* in the rumen, probably due to the transition from pre-ruminant to ruminant, resulting in a greater amount of cellulolytic bacteria. The jejunum also displayed taxonomic changes with increases in *Clostridiaceae* taxa in older calves. The correct establishment of commensal bacteria such as *Clostridium* and *Olsenella* can enhance lactose digestion, stimulate the immune system, prevent and treat diarrhea, improve the

epithelial barrier, and reduce lipopolysaccharide in the intestine, thanks to the fact that the bacteria adhere to the intestinal wall, avoiding adhesion of pathogens and the appearance of enteric problems such as leaky gut (Kraatz et al., 2011).

It has been observed that gut microbial communities in calves fed silage or mixed diets are similar to those found in adult animals (Dill-McFarland et al., 2019). Age is thus considered one of the main factors that drive the establishment of microbial communities in developing animals, according to previous studies (Dill-McFarland et al., 2017, 2019; Jami et al., 2013). In a study by Ma et al. (2019), changes in intestinal microbial diversity were detected in healthy calves that were fed only with milk replacers, indicating that age and growth were the main factors driving the development of microbial diversity during the early days of life.

This has been studied by Cui et al. (2020) comprising the community structure of rumen and small intestine in yak with two feeding conditions (maternally nursed and grazed and supplied milk replacer, starter feed, and alfalfa hay); they reported that the low fiber feeding group significantly increased microbes that were mostly involved in the utilization of non-fibrous carbohydrate, as *Bacteroides* and *Acinetobacter*, the more abundant carbohydrates supplied from both fibrous carbohydrate and non-fibrous carbohydrates, have been suggested to be involved in the enhanced intestinal digestion and absorption function.

Ren et al. (2020) described how some amino acids like leucine tended to increase some bacterial species like family Ruminococcaceae and Bacteroidales; these are an essential bacterial for ruminants, which digest a wide variety of fiber and starch; also, this microorganism produces AGVs, usable by its bovine host. These studies are consistent with the findings in this work where a diet rich in carbohydrates could modify the bacterial populations by carbohydrate-degrading bacteria; likewise, the diet is one of the main modifying agents of the microbiome, that is why a correct, diversified colonization will help to respond in a better way to the changes in the diet during the different productive phases of the animals.

Interestingly, our study shows that the rumen is predominantly occupied by *Prevotella* species, which constitutes 37% of the total OTUs belonging to 185 genera. In contrast, not a single genus shows a clear predominance in the jejunum. The relatively high abundance of *Prevotella* in the rumen suggests that they play a crucial role in fermentation, given their anaerobic nature and broad genetic capacity to use a variety of soluble sugars, starch, and proteins. *Prevotella* also includes amyolytic and fibrinolytic bacteria (Amin et al., 2021).

The absence of a dominant genus in the jejunum, which is highly diverse with 222 genera compared to 185 in the rumen, indicates that its microbiome aids in breaking down numerous small molecules from the food digested by duodenal enzymes before their transport from the jejunum to the liver (Palomba et al., 2017), also significantly increased the diversity of species and abundance of microbes which used different carbohydrates benefit the growth and immune function of the gastrointestinal tract (Cui et al., 2020).

In summary, our study highlights the dynamics of the microbial composition during the postpartum period, in which Proteobacteria are outcompeted by Bacteroidetes in the rumen and Firmicutes in the

jejunum just after a week of development. Moreover, *Prevotella* species predominate in the rumen, while the jejunum microbiome is composed of small proportions of several genera. These findings provide insights into the complex world of microbial communities in developing animals.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by PAPIIT-UNAM under Grant IN211518 to Dr. Ofelia Mora. We thank Carlos Lozano-Flores, Luis Aguilar Bautista, Alejandro de León Cuevas, Alejandro Ávalos Fernández, and Jair García from Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS); Miriam Bravo López and Carolina Rocha from Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano (LIIGH)-UNAM; and Mariana Isabel Olivares Salazar from CEIEGT-UNAM for technical support. Carolina Robles-Rodríguez thanks CONACYT for the scholarship at PCIPSA-UNAM.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing interests.

## ORCID

Carolina Robles-Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0002-9133-5505>

Ofelia Mora  <https://orcid.org/0000-0002-7073-7740>

## REFERENCES

- Alipour, M. J., Jalanka, J., Pessa-Morikawa, T., Kokkonen, T., Satokari, R., Hynönen, U., & Niku, M. (2018). The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports*, 8, 10437. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28733-y>
- Amin, N., Schwarzkopf, S., Kinoshita, A., Tröscher-Mußotter, J., Dänicke, S., Camarinha-Silva, A., & Seifert, J. (2021). Evolution of rumen and oral microbiota in calves is influenced by age and time of weaning. *Animal Microbiome*, 3, 31. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00095-3>
- Austin, K. J., Cunningham, H. C., Powell, S. R., Carpenter, K. T., & Cammack, K. M. (2018). Investigation of maternal breed and rearing type on the calf rumen microbiome from day 28 through weaning. *Translational Animal Science*, 2, 125–129. <https://doi.org/10.1093/tas/txy034>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B: Methodological*, 57, 289–300.
- Bergmann, G. T. (2017). Microbial community composition along the digestive tract in forage- and grain-fed bison. *BMC Veterinary Research*, 13, 253. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1161-x>
- Cui, Z., Wu, S., Liu, S., Sun, L., Feng, Y., Cao, Y., & Yao, J. (2020). From maternal grazing to barn feeding during pre-weaning period: Altered gastrointestinal microbiota contributes to change the development and function of the rumen and intestine of yak calves. *Frontiers in Microbiology*, 11, 485. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00485>
- Dias, J., Marcondes, M. I., Motta de Souza, S., Cardoso da Mata e Silva, B., Fontes Noronha, M., Tassinari Resende, R., & Suen, G. (2018). Bacterial community dynamics across the gastrointestinal tracts of dairy calves during preweaning development. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, e02675–e02671. <https://doi.org/10.1128/AEM.02675-17>
- Dill-McFarland, K., Breaker, J., & Suen, G. (2017). Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to the first lactation. *Scientific Reports*, 7, 40864. <https://doi.org/10.1038/srep40864>



- Dill-McFarland, K., Weimer, J., Breaker, J., & Suen, G. (2019). Diet influences early microbiota development in dairy calves without long-term impacts on milk production. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, e02141–e02118. <https://doi.org/10.1128/AEM.02141-18>
- Edgar, R. (2010). Search and cluster orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Indugu, N., Bittinger, K., Kumar, S., Vecchiarelli, B., & Pitta, D. (2016). A comparison of rumen microbial profiles in dairy cows as retrieved by 454 Roche and ion torrent (PGM) sequencing platforms. *PeerJ*, 4, 1599, e1599. <https://doi.org/10.7717/peerj.1599>
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7, 1069–1079. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>
- Jiao, J., Huang, J., Zhou, C., & Tan, Z. (2015). Taxonomic identification of ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3502–3509. <https://doi.org/10.1128/AEM.00203-15>
- Klein-Jöbstl, D., Quijada, M., Dzieciol, M., Feldbacher, B., Wagner, M., Drillich, M., & Mann, E. (2019). Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PLoS ONE*, 14, e0220554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220554>
- Klein-Jöbstl, D., Schornsteiner, E., Mann, E., Wagner, M., Drillich, M., & Schmitz-Esser, S. (2014). Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. *Frontiers in Microbiology*, 5, 622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00622>
- Korir, B. K., Kuria, J. K. N., Mwangi, D. M., & Gachuri, C. K. (2022). Diversity and taxonomic identification of bacteria in the rumen of zebu cattle fed various diets. *South African Journal of Animal Science*, 52, 195–201. <https://doi.org/10.4314/sajas.v52i2.9>
- Kraatz, M., Wallace, R. J., & Svensson, L. (2011). *Olsenella umbonata* sp. nov., a microaerophilic anaerobic lactic acid bacterium from the sheep rumen and pig jejunum, and emended descriptions of *Olsenella*, *Olsenella uli* and *Olsenella profusa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 795–803. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022954-0>
- Liang, G., Malmuthuge, N., Bao, H., Stothard, P., & Griebel, J. (2016). Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system. *BMC Genomics*, 17, 602. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2957-y>
- Liang, G., Malmuthuge, N., McFadden, T., Bao, H., Griebel, J., & Stothard, P. (2014). Potential regulatory role of microRNAs in the development of bovine gastrointestinal tract during early life. *PLoS ONE*, 9, e92592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092592>
- Ma, S., Tong, C., Ibeagha-Awemu, E. M., & Zhao, X. (2019). Identification and characterization of differentially expressed exosomal microRNAs in bovine milk infected with *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, 20, 1–13.
- Malmuthuge, N., Liang, G., Griebel, J., & Guang, L. L. (2019). Taxonomic and functional compositions of the small intestinal microbiome in neonatal calves provide a framework for understanding early life gut health. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, e02534–e02538. <https://doi.org/10.1128/AEM.02534-18>
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., & Zhu, W. (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. *Scientific Reports*, 5, 16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meale, S. J., Chaucheyras-Durand, F., Berends, H., & Steele, M. A. (2017). From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 100, 5984–5995. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12474>
- Oikonomou, G., Teixeira, A. G. V., Foditsch, C., Bicalho, M. L., Machado, V. S., & Bicalho, R. C. (2013). Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. *PLoS ONE*, 8, e63157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063157>
- Palomba, A., Tanca, A., Fraumene, C., Abbondio, M., Fancello, F., Atzori, A. S., & Uzzau, S. (2017). Multi-omic biogeography of the gastrointestinal microbiota of a pre-weaned lamb. *Proteome*, 5, 36. <https://doi.org/10.3390/proteomes5040036>
- Pandit, R. J., Hinsu, A. T., Patel, S. H., Jakhesara, S. J., Koringa, P. G., Bruno, F., & Joshi, C. G. (2018). Microbiota composition, gene pool and its expression in Gir cattle (*Bos indicus*) rumen under different forage diets using metagenomic and metatranscriptomic approaches. *Systematic and Applied Microbiology*, 41, 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.02.002>
- Pitta, D. W., Pinchak, W. E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., & Wickersham, T. A. (2010). Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from Bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microbial Ecology*, 59, 511–522. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-6909-6>
- Ren, H., Bai, H., Su, X., Pang, J., Li, X., Wu, S., & Yao, J. (2020). Decreased amyolytic microbes of the hindgut and increased blood glucose implied improved starch utilization in the small intestine by feeding rumen-protected leucine in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 103, 4218–4235. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17194>
- Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., & Monteils, V. (2014). Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 245–257. <https://doi.org/10.1111/jam.12405>
- Sbardellati, L., Fischer, A., Cox, S., Li, W., Kalscheur, F., & Suen, G. (2020). The bovine epimural microbiota displays compositional and structural heterogeneity across different ruminal locations. *Journal of Dairy Science*, 103, 3636–3647. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17649>
- Taschuk, R., & Griebel, P. (2012). Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews*, 13, 129–141. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000096>
- Yeoman, C. J., Ishaq, S. L., Bichi, E., Olivo, S. K., Lowe, J., & Aldridge, B. M. (2018). Biogeographical differences in the influence of maternal microbial sources on the early successional development of the bovine neonatal gastrointestinal tract. *Scientific Reports*, 8, 3197. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21440-8>
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, 36, 808–812. <https://doi.org/10.2144/04365ST04>
- Zheng, X., Wu, J., Zhou, C., Tan, Z., & Jiao, J. (2021). Spatial and temporal organization of jejunal microbiota in goats during animal development process. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 68–79. <https://doi.org/10.1111/jam.14961>
- Zhong, T., Hu, J., Xiao, P., Zhan, S., Wang, L., Guo, J., Li, L., Zhang, H., & Niu, L. (2017). Identification and characterization of microRNAs in the goat (*Capra hircus*) rumen during embryonic development. *Frontiers in Genetics*, 8, 163. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00163>

**How to cite this article:** Robles-Rodríguez, C., Muley, V. Y., González-Dávalos, M. L., Shimada, A., Varela-Echavarría, A., & Mora, O. (2023). Microbial colonization dynamics of the postnatal digestive tract of *Bos indicus* calves. *Animal Science Journal*, 94(1), e13872. <https://doi.org/10.1111/asj.13872>

---

## Interacción microbiota-microRNAs y su importancia en el desarrollo del sistema inmune en becerros

Carolina Robles-Rodríguez   Laura González-Dávalos  

Armando Shimada   Daniela Robles-Espinoza   Ofelia Mora Izaguirre <sup>1</sup>  

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

---

### Microbiota-microRNAs interaction and its importance in the immune system development in calves

**Abstract.** MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that post-transcriptionally regulate eukaryotic gene expression and are involved in a wide range of physiological processes. Temporal and regional changes in miRNA expression have been observed, as well as a correlation between miRNA expression and the microbial population of the gastrointestinal tract in early life stages in calves. This work aims to review the current knowledge of miRNAs in cattle and to contribute to the understanding of miRNAs as regulators of immune cell function and on the microbial colonization of the digestive tract in early life stages of the animal, as well as their role as biomarkers of long-term health and the development of new therapeutic approaches.

**Keywords:** Digestive tract, immunity, microRNAs, microbiome

---

**Resumen.** Los microRNA (miRNA) son pequeños ARN que regulan postranscripcionalmente la expresión génica eucariota, y que participan en una amplia gama de procesos fisiológicos. Se han observado cambios temporales y regionales en la expresión de los miRNA, así como una correlación entre la expresión de estos y la población microbiana del tubo digestivo en las primeras etapas de vida en becerros. Esta revisión sintetiza y analiza el conocimiento actual de los miRNA como reguladores de la función de las células inmunes, así como su papel como biomarcadores de salud. Además de revisar información sobre la relación hospedador-microbiota y sus impactos sobre el sistema inmune y la salud de becerros.

**Palabras clave:** Tubo digestivo, inmunidad, microRNA, microbioma

---

### Interação microbiota-microRNAs e sua importância no desenvolvimento do sistema imunológico em bezerros

**Resumo.** MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs que regulam pós-transcripcionalmente a expressão de genes eucarióticos e participam de uma ampla gama de processos fisiológicos. Mudanças temporais e regionais na expressão de miRNAs têm sido observadas, bem como uma correlação entre sua expressão e a população microbiana do trato digestivo nos primeiros estágios de vida em bezerros. Este trabalho tem como objetivo revisar o conhecimento atual de miRNAs em bovinos e contribuir para o entendimento dos miRNAs como reguladores da função celular imune e sobre a colonização microbiana do trato digestivo nas fases iniciais da vida animal, bem como seu papel como biomarcadores de saúde a longo prazo e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

**Palavras-chave:** Trato digestivo, imunidade, microRNA- Microbioma

---

## Introducción

El nacimiento expone al recién nacido a la microbiota vaginal de la madre y al ambiente, iniciando la colonización bacteriana del tubo gastrointestinal (Klein *et al.*, 2019). La microbiota digestiva tiene un efecto importante en la maduración y adaptación del sistema inmune innato durante el desarrollo temprano, además, tiene efectos metabólicos y nutricionales. Una microbiota intestinal equilibrada constituye una barrera eficaz contra la colonización de patógenos y ayuda a mantener la homeostasis. Por tanto, en la salud del sistema gastrointestinal debe haber un equilibrio entre la microbiota presente, la dieta y la respuesta inmune, así como de secreciones de la mucosa intestinal (Reis de Souza, 2010; Pejenaute y Ricote, 2018). Estudios recientes muestran que los microRNA (miRNA) están involucrados en las interacciones hospedero-microbio (Dalmaso *et al.*, 2011), y pueden ser reguladores de las células inmunitarias innatas y adaptativas; se ha visto que la falta de miRNA como miR-155, puede afectar a un amplio espectro de reacciones inmunitarias, que van desde la producción de citocinas por parte de las células T y B hasta la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas (Lawless *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2009). Esta capacidad reguladora entre el hospedero-microbiota-inmunidad, los ha convertido en objeto de estudio como biomarcadores ya que, al poder ser detectados en fluidos biológicos, puede facilitar la detección rápida de estados enfermedad (Do *et al.*, 2021). Esta revisión sintetiza y analiza el conocimiento actual de los miRNA como reguladores de la función de las células inmunes, así como su papel como biomarcadores de salud. Además de revisar información sobre la relación hospedador-microbiota y sus impactos sobre el sistema inmune y la salud de becerros.

### Relación hospedador-microbiota

Se denomina microbiota a la comunidad de microorganismos vivos (procariontes y eucariontes) que residen en un nicho ecológico determinado estableciendo relaciones que conducen a un equilibrio dinámico entre ellos. El término microbioma se refiere al conjunto de genes que residen en un hábitat concreto (Pejenaute y Ricote, 2018; Sentandreu, 2017; Gómez *et al.*, 2019). Se calcula que el número total de microorganismos que componen la microbiota del tubo digestivo en los rumiantes es de  $10 \times 10^{14}$ , se encuentran más de 1.000 especies distintas de bacterias que codifican para aproximadamente 3 millones de genes, el genoma humano por otra parte contiene unos 23.000 genes (Gómez y Morales, 2017; Sentandreu, 2017;

Gómez *et al.*, 2019). La composición de la microbiota es cambiante y debe adaptarse al lugar donde reside y a las funciones que desarrolla. Esta composición se ve afectada por la dieta, los estilos de vida o el consumo de antibióticos, entre otros factores. Los efectos benéficos de la microbiota en el hospedador se pueden dar en varios niveles:

**Metabólico:** la microbiota ha pasado de considerarse un mero comensal a un “órgano metabólico”. Realiza funciones como: suministrar nutrientes esenciales que el hospedero no es capaz de sintetizar como los ácidos grasos volátiles. Además, pueden degradar compuestos que no son digeribles por el hospedero, por ejemplo, la celulosa de los forrajes (Gómez *et al.*, 2019).

**Protección frente a microorganismos patógenos:** la microbiota impide la colonización del hábitat por microorganismos patógenos mediante dos mecanismos de acción: 1) Interferencia con la colonización (la microbiota autóctona está adaptada a vivir en el hospedador impidiendo que otros microorganismos ocupen ciertos nichos; solo si esta microbiota se altera o se produce una invasión por microbios extraños es posible la colonización por patógenos); 2) Producción de compuestos antimicrobianos [como los ácidos orgánicos o mediante el desarrollo de bacteriocinas, que son bactericidas (Gómez *et al.*, 2019)].

**Estimulación del sistema inmune innato y adquirido,** contribuyendo a mantener un equilibrio entre procesos proinflamatorios y antiinflamatorios (Gómez *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha estudiado el eje microbioma-intestino-cerebro, este eje está formado por la microbiota, el sistema nervioso entérico, el sistema nervioso autónomo, el sistema neuroendocrino, el sistema neuro-inmune y el sistema nervioso central. El sistema nervioso entérico se encarga del funcionamiento básico gastrointestinal (como: motilidad, secreción mucosa, flujo sanguíneo), y el control de las funciones del intestino se lleva a cabo gracias al nervio vago (Gómez *et al.*, 2019). La capacidad de la microbiota para influir en el comportamiento de los mamíferos se relaciona por su capacidad para sintetizar y/o reconocer sustancias iguales o análogas a las producidas por el sistema nervioso del huésped (Sentandreu, 2017).

La comunicación bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el cerebro está presente en



condiciones de salud y en enfermedades (Gómez y Morales, 2017). En las enfermedades existe una disbiosis (cambios en la composición normal de la microbiota) que genera cambios en la motilidad gastrointestinal, afecta a las secreciones y produce una hipersensibilidad visceral. Estudios en modelos animales expuestos a diferentes situaciones de estrés han evidenciado variaciones en la composición microbiana (Miretti *et al.*, 2020). De esta manera se puede postular la comunicación bidireccional en este eje, ya que la microbiota afecta al comportamiento y, a su vez, alteraciones en este eje, producen cambios en la microbiota (Gómez *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha estudiado otro factor que interviene en la regulación de la microbiota gastrointestinal y estos son los miRNA. Los microARN juegan un papel importante en la función gastrointestinal del huésped, pueden participar en muchos aspectos de las funciones intestinales, incluida la proliferación y diferenciación de las células, así como en la regulación de los genes y la homeostasis intestinal del huésped (Li *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021).

### MicroRNA

Los miRNA son moléculas pequeñas de RNA con la capacidad de reconocer, por complementariedad de bases, ciertas regiones de un RNA mensajero blanco (Flores *et al.*, 2007). Los miRNA son una clase de RNA no codificante con una longitud aproximada de 20-25 nucleótidos, secuencias que juegan papeles importantes en la regulación de la traducción y degradación de RNAm a través del emparejamiento de bases a sitios parcialmente complementarios en las regiones no traducidas (UTR) del mensaje. Se asocian con miembros de la familia de las proteínas Argonauta para ser guiados a su secuencia blanco o complementaria en el RNAm (Pabón, 2011). Esta unión resulta en la inhibición de la expresión del mensajero, es decir, su silenciamiento. Esta regulación se da mediante la síntesis de un transcrito policistrónico, que posteriormente es fragmentado para generar múltiples miRNA, lo que sugiere que en algunos casos hay una organización de tipo operón (Flores *et al.*, 2007; Lugo y Trujillo, 2009). Se ha observado que los miRNA presentes en los eucariontes se transcriben de regiones intergénicas, ya sea de manera individual o en grupos de varios miRNA contenidos en un solo transcrito, aunque también se han descrito que hay muchas regiones intrónicas que los contienen individualmente o bien en grupos (Flores *et al.*, 2007). Actualmente se han encontrado numerosos miRNA, de los cuales varios se encuentran conservados en diversas especies, lo que sugiere que la regulación por

miRNA es un mecanismo que adoptaron los organismos multicelulares en su evolución temprana (Flores *et al.*, 2007). Algunos miRNA se expresan de manera ubicua, mientras muchos otros lo hacen de forma tejido-específica, o incluso temporal, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula o tejido, como es el caso de lin-4 (Liang *et al.*, 2014; Griffiths, 2004; Bushati y Cohen, 2007). Un aspecto intrigante en la identificación de estas moléculas como biomarcadores se deriva de su papel en la comunicación de célula a célula, su secreción activa de las células al ambiente extracelular (Miretti *et al.*, 2020). Se han descrito tres interacciones importantes entre el microbioma del huésped y el intestino que involucran miRNA, que incluyen: (i) Los miRNA regulan la expresión de genes del huésped, (ii) La microbiota influye en la expresión del miRNA del huésped, y (iii) el huésped influye en la microbiota intestinal a través de la liberación de miRNA. También se ha sugerido que el propio huésped puede regular su microbiota, pero la evidencia de esto todavía está en sus etapas iniciales (Williams *et al.*, 2017).

### Sistema inmune de los becerros

Los mecanismos de defensa en becerros recién nacidos no están completamente desarrollados ya que estos adquieren inmunidad pasiva de sus madres por ingestión y absorción de los anticuerpos presentes en el calostro. Por ello, la adquisición de esta inmunidad depende de la calidad, cantidad y del tiempo de ingestión de calostro ingerido y absorbido, lo que provoca que la morbilidad y mortalidad sean muy elevadas en esta etapa inicial (Olguin, 2019). Debido a la placenta cotiledonaria de los rumiantes, el recién nacido es generalmente agammaglobulinémico. El aumento en la concentración de hidrocorticoides en el feto antes del parto puede deprimir la respuesta inmune celular (Beltrán, 2011). Adicionalmente, durante las primeras horas de vida el intestino semipermeable de los becerros está caracterizado por un paso abundante no selectivo de macromoléculas y transporte a través del intestino delgado, por lo que la entrada de virus y bacterias es muy probable que pueda ocurrir. Por esto, la ingestión de calostro inmediatamente después del nacimiento es de vital importancia para el recién nacido, ya que constituye su primera y única fuente de protección inmunológica (Olguin, 2019). La vaca desarrolla inmunidad sistémica basada en inmunoglobulinas de tipo IgG1, IgG2 e IgM circulantes, e inmunidad local en las mucosas basada principalmente en IgA secretoria (IgAs) (Beltrán, 2011; Manzullo, 1982; Olguin, 2019). Aproximadamente seis semanas antes del parto ocurre un transporte selectivo de IgG1 del plasma de la madre, así como de otras

sustancias a través de las células epiteliales de los acinos de la ubre. El transporte y síntesis se incrementa de dos a tres semanas antes del parto y disminuye inmediatamente después de que este ocurre (Olguin, 2019). IgG1 constituye el 80 % del total, IgG2 representa el 7 %, IgA alcanza el 8 % y la IgM solamente el 5 % del total. La mayor cantidad de IgG es transferida desde la madre a través del suero sanguíneo; en el caso de la IgA, el 60 % se sintetiza localmente, mientras que las IgM provienen del suero materno y de la glándula mamaria (Beltrán, 2011). Además de las inmunoglobulinas, el calostro contiene varios compuestos bioactivos como factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), insulina y colesterol o señales moleculares en forma de miRNA y RNA largo no codificante (lncRNA) que interactúan o estimulan el desarrollo de enterocitos en los animales recién nacidos. Estas interacciones o estímulos son un punto importante para la maduración adecuada del revestimiento de los enterocitos, promoviendo el establecimiento de la digestión y absorción intestinal (Osorio, 2020). Es importante recordar que las inmunoglobulinas son solo una parte del sistema inmune del becerro, una buena alimentación, mínimo estrés y un ambiente limpio ayudan a mantener becerros sanos (Beltrán, 2011).

Los becerros antes de nacer están predominantemente protegidos por el sistema inmune innato, posteriormente se desarrollará el sistema inmune adaptativo. La inmunidad innata se compone de barreras físicas como la piel y mucosas, barreras químicas como el pH, sales biliares, ácidos grasos, lisozima, peroxidasa, transferrina, lactoferrina, espermina, lisina; y barreras biológicas como la microbiota normal (Abbas *et al.*, 1999; Chase, 2018). Sus componentes son células fagocíticas, neutrófilos y macrófagos, eosinófilos, linfocitos asesinos naturales, linfocitos B y linfocitos T intraepiteliales, y factores solubles que incluyen citoquinas, interferón, factor de necrosis tumoral, complemento, anticuerpos naturales producidos por linfocitos B, y proteínas de respuesta aguda, cuyos mecanismos de acción determinan un proceso inflamatorio (Abbas *et al.*, 1999; Chase, 2018). La inmunidad adaptativa activa poblaciones celulares de linfocitos B, linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos, con la finalidad de eliminar a un agente infeccioso de forma específica. Se han establecido dos tipos de inmunidad adquirida: inmunidad humoral y celular. La inmunidad humoral se basa en la producción de anticuerpos específicos por las células plasmáticas, las cuales se originan en los tejidos linfáticos por diferenciación de linfocitos B activados y llegan a los tejidos por la circulación linfática y sanguínea (Delgado, 2013). Estos anticuerpos actúan

frente a patógenos extracelulares y toxinas. La inmunidad celular mediada por linfocitos T tiene una respuesta inmune contra virus, bacterias y parásitos intracelulares, produce una respuesta específica, tienen memoria inmunológica y responde a una gran variedad de antígenos. En los rumiantes, los linfocitos T producen mucha más interleucina (IL)-12 e interferón (IFN)- $\gamma$ , mostrando un mecanismo para compensar la falta de transferencia de anticuerpos para el sistema inmune adaptativo durante el período neonatal (Concha, 2007; Taschuk y Griebel, 2012; Delgado, 2013; Chase, 2018).

### Microbioma, miRNA e inmunidad en becerros

Una importante fuerza impulsora en la evolución del sistema inmune de los mamíferos ha sido la necesidad de mantener relaciones homeostáticas con la microbiota. Esto implica el control de las interacciones de los microbianos con los tejidos del huésped, así como la composición de los consorcios microbianos (Hooper *et al.*, 2012). El tracto gastrointestinal de los mamíferos sufre colonización microbiana inmediatamente después del nacimiento y posteriormente está continuamente expuesto a microbiota comensal, patógenos y antígenos (Liang *et al.*, 2016; Malmuthuge, 2016; Klein *et al.*, 2019). Los rumiantes jóvenes son pseudo-monogástricos al nacer con un retículo-rumen subdesarrollado, dependen únicamente de una dieta a base de leche donde la mayor parte del alimento líquido fluye directamente hacia el abomaso sin entrar en el rumen, los intestinos delgado y grueso sirven como sus principales sitios de digestión (Amin y Seifert, 2021). Por tanto, los becerros recién nacidos son susceptibles a una variedad de infecciones entéricas bacterianas y virales, y el sistema inmunitario de la mucosa se convierte en la primera línea de defensa, activando respuestas inmunes innatas y adaptativas (Liang *et al.*, 2016).

El tracto gastrointestinal de los becerros neonatales cambia enormemente durante el primer año de vida, con un cambio en la actividad de las enzimas intestinales (lactasa y maltasa), lo que facilita el desarrollo de las glándulas salivales, otros compartimentos digestivos y el comportamiento de rumia en los terneros. Además, el volumen del rumen aumenta y la forma y el tamaño papilar del rumen proliferan, proporcionando un nicho adecuado para la colonización microbiana del rumen y su funcionamiento posterior (Amin y Seifert, 2021). Aunado al cambio fisiológico de maduración del tubo digestivo, el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal neonatal sufre un cambio rápido en respuesta a la colonización por microbios. Esta

colonización es impulsada por el entorno de cría, la edad y la dieta (Liang *et al.*, 2016). Cada vez hay más pruebas de que la microbiota intestinal desempeña un papel vital en la regulación de las funciones inmunes del huésped (Amin y Seifert, 2021). El sistema inmunitario de la mucosa del huésped previene la invasión bacteriana y da forma a la microbiota intestinal, mientras que los microorganismos que habitan el tubo digestivo influyen en el desarrollo del sistema inmune (Liang *et al.*, 2016), controlando la exposición de las bacterias a los tejidos del huésped, disminuyendo potencialmente los resultados patológicos (Liang *et al.*, 2014). Esto ocurre en dos niveles distintos: 1) minimizando el contacto directo entre las bacterias intestinales y la superficie de las células epiteliales (estratificación), y 2) confinando las bacterias en los sitios intestinales y limitando su exposición al compartimento inmunitario sistémico (compartimentación) (Hooper *et al.*, 2012).

Los primeros colonizadores identificados a partir del meconio son *Citrobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. La composición microbiana del meconio es muy similar a la microbiota fecal a las 6 y 12 h después del nacimiento. Transcurridas 24 h de nacidos la composición microbiana en las heces cambia drásticamente, presentando una mayor diversidad microbiana (Mayer *et al.*, 2012), lo que indica el establecimiento de un microbioma complejo muy temprano en la vida. Por su parte al analizar el microbioma de los intestinos se encuentra que los colonizadores iniciales como *Streptococcus* y *Enterococcus* utilizan el oxígeno disponible en el intestino y crean el entorno anaeróbico necesario para los residentes intestinales anaeróbicos estrictos, como *Bifidobacterium* y *Bacteroides* que tienen un impacto beneficioso sobre el sistema inmunológico de las mucosas (Malmuthuge *et al.*, 2015). La microbiota ruminal temprana consiste en especies bacterianas de los géneros *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* y *Bifidobacterium*, mientras que las especies de *Ruminococcus* dominan la población bacteriana celulolítica (Malmuthuge *et al.*, 2015). Las variaciones individuales observadas entre becerros disminuyen con la edad, lo que sugiere el establecimiento de una microbiota con una mayor similitud en los becerros mayores. Grupos bacterianos detectados en las muestras fecales de becerros destetados revelaron que con el crecimiento de los becerros hay un decremento con el crecimiento en la abundancia de bacterias de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Fecalibacterium*, y *Enterococcus*.

La microbiota intestinal se ha consolidado en el panorama científico y clínico como uno de los reguladores de homeostasis más importantes. Además, varias enfermedades se han relacionado con cambios en los perfiles de la microbiota que subyacen al papel de las bacterias y sus metabolitos en la fisiología del huésped. Sólo recientemente, el interés se ha desplazado hacia componentes específicos del huésped que pueden influir en la microbiota intestinal, incluidos los factores genéticos del huésped y los miRNA (Sarshar *et al.*, 2020). Las primeras semanas después del nacimiento son esenciales para la inmunidad entérica a largo plazo, así como para la expresión de miRNA del huésped y los miRNA que expresarán la microbiota comensal, y el establecimiento de sus interacciones (hospedero-microbioma). Para el día 21 de edad, existe una inducción máxima de miRNA del huésped por los altos niveles de microorganismos del microbioma que se han establecido en el tubo digestivo. Los cambios en la dieta en el período inicial de 7 a 21 días de edad influyen en gran medida en el microbioma y los miRNA y, por lo tanto, en la respuesta inmune entérica (Chase, 2018).

El sistema inmune del tubo digestivo en desarrollo debe ser capaz de discriminar entre microbios comensales y microbios patógenos para garantizar la protección del hospedero sin interrumpir funciones intestinales vitales requeridas para mantener la salud (Alarcón *et al.*, 2016). El reconocimiento microbiano se basa en la detección de patrones moleculares conservados que son productos esenciales de la fisiología microbiana. Actualmente dichas estructuras invariantes son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, Pathogen-associated molecular patterns); Los PAMP se caracterizan por ser expresados únicamente por microbios, son relativamente conservados en microorganismos similares y su expresión es esencial para la sobrevivencia del microorganismo, estos son reconocidos por receptores del sistema inmunitario innato denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR, Pattern Recognition Receptor) que los reconoce como firmas moleculares extrañas, y este reconocimiento propicia la inducción de una respuesta inmunitaria. Los PAMP son reconocidos por los PRR presentes en las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, una de las células más importantes del sistema inmunitario, ya que se consideran el vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa (Bautista-Garfias y Gualito, 2005).

Los receptores tipo Toll (TLR, Toll Like Receptor) son un grupo de proteínas altamente conservado y son parte los PRR. Los TLR proporcionan al huésped un medio para discriminar a los extraños de los propios y, como tales, funcionan en las primeras etapas del desarrollo inmunológico. Además, los TLR pueden identificar específicamente agentes patógenos de comensales. Factores como la ubicación y abundancia de cada TLR están íntimamente involucrados en este proceso (González-Rascón y Mata-Haro, 2015; Menzies e Ingham, 2006). Los TLR también se encargan de mantener la homeostasis hospedero-microbio al modular la proliferación de células epiteliales y/o la secreción de proteínas antimicrobianas. Además, la colonización microbiana intestinal también tiene profundos efectos en la diferenciación de las células T (Liang *et al.*, 2014; Malmuthuge, 2016). Por ejemplo, la colonización bacteriana de ratones libres de gérmenes mejoró la diferenciación de las células T helper 17 y las células T reguladoras. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estas interacciones permanecen en gran medida indefinidos (Liang *et al.*, 2014). Se ha visto que los miRNA tienen una función de defensa en la respuesta a las infecciones bacterianas, ya que actúan como desencadenantes de la respuesta inmune mediada por los TLR (Eulalio *et al.*, 2012; Amin y Seifert, 2021). Durante la infección microbiana, las células reconocen los patógenos invasores, o sus proteínas secretadas, a través de varios patrones moleculares asociados a microbios (PAMS) conservados, que incluyen los TLR y receptores similares a Nod (NLR) que se encuentran en la membrana celular o en el citoplasma, respectivamente. La vía de señalización de TLR es una de las respuestas inmunes innatas (Eulalio *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2014). La unión de ligandos bacterianos a PAMS desencadena la activación respuesta inmune innata del huésped, mediada por un conjunto de proteínas adaptadoras y factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y la proteína activadora I (AP-I) (Eulalio *et al.*, 2012).

La mucosa en el intestino delgado bovino consta de tejidos linfoides, como placas de Peyer (PP), y tejido linfoide difuso, que se distribuye por toda la lámina propia y compartimientos intraepiteliales (Liang *et al.*, 2016). Además, el desarrollo de PP comienza en el útero, en ausencia del microbioma comensal, con folículos linfoides presentes al momento del nacimiento. Las PP continuas, ubicadas en el íleon, funcionan principalmente como un sitio para la generación de Células B pre-inmune, mientras que las PP discretas, distribuidas en todo el yeyuno, funcionan como sitios de inducción para la generación de células plasmáticas IgA (Beltrán, 2011; Lawless *et al.*, 2014;

Liang *et al.*, 2016). Se ha visto que hay una baja regulación dependiente de la edad en la expresión de RNAm para varios TLR y péptidos antimicrobianos al comparar tejidos intestinales recogidos de becerros de 3 semanas de edad versus 6 meses de edad. Se han descrito cambios significativos en la expresión de miRNA intestinal bovino en el periodo de posparto (0 a 6 semanas) sugiriendo una posible participación de miRNA en la regulación del desarrollo del sistema inmune (Liang *et al.*, 2016; Do *et al.*, 2018).

Los estudios que demuestran la expresión de miRNA en tejidos bovinos, han identificado 793 miRNA maduros, codificados en el genoma de *Bos taurus*. Muchos miRNA humanos, incluidos algunos de los miRNA relacionados con el sistema inmunológico, comparten importantes similitudes funcionales y de secuencia con sus homólogos bovinos, lo que indica conservación evolutiva y, supuestamente, conservación de la función. Si bien existe una conservación significativa de los miRNA entre especies, también hay diferencias notables que muy probablemente tengan consecuencias funcionales (Lawless *et al.*, 2014). El miRNA humano, hsa-miR-155, por ejemplo, es un homólogo perfecto para su contraparte bovina bta-miR-155. Por su parte el miRNA humano, hsa-miR-198, tiene un papel en la inmunidad humana y no tiene un homólogo aparente en el genoma bovino (Liang *et al.*, 2014; González-Rascón y Mata-Haro, 2015; Do *et al.*, 2018). Las familias bta-miR-2284 y bta-miR-2285, por ejemplo, codifican más de 100 miRNA maduros en el genoma bovino, pero no parecen tener homólogos en humanos ni en ratones. Se ha demostrado que estas familias de miRNA se expresan en varios tejidos inmuno-relevantes en bovinos, incluidos los monocitos CD14+, las células epiteliales mamarias y los macrófagos alveolares (Lawless *et al.*, 2014).

Además de su papel como moduladores transcripcionales intracelulares de la expresión génica, los miRNA también se expresan de manera estable en una gran cantidad de fluidos corporales extracelulares, como leche, saliva, semen y plasma, por lo que convierten a los miRNA en potenciales biomarcadores que se derivan de su expresión espacial y temporal altamente regulada. Los perfiles de miRNA liberados al medio extracelular son capaces de cambiar bajo condiciones tales como enfermedades, infecciones virales o bacterianas y estados fisiológicos (Miretti *et al.*, 2020). Los miRNA extracelulares se pueden transferir a células receptoras distantes mediante transferencia mediada por exosomas y se ha visto su papel, en células dendríticas de ratón, que modulan la transcripción de células receptoras. Se ha demostrado que los miRNA empaquetados en el exosoma son



altamente estables y resistentes a la degradación por RNAsas, congelación-descongelación y pH bajo (Lawless *et al.*, 2014). Se han encontrado miRNA de exosoma, incluidos varios inmuno-relevantes, como bta-miR-223 y bta-miR-125b, tanto en la leche humana como en la bovina, que contribuyeron significativamente en el sistema inmune neonatal y manifestaban sus efectos sobre la función de las células T y la diferenciación de las células B (Figura 1; Chokeshaiusaha *et al.*, 2018). También se ha observado que los niveles de expresión de miRNA en la leche varían durante los diferentes períodos de lactancia y están presentes en los productos lácteos y en la leche cruda. Curiosamente, son particularmente abundantes en calostro (Lawless *et al.*, 2014). Estas pruebas sugirieron que los genes inmuno-asociados dirigidos por los miRNA de leche de vaca y humana manifiestan los efectos inmunomoduladores conservados de los miRNA de leche entre las dos especies. Al implicar tal conocimiento a otras especies que amamantan, la identificación de estos genes diana podría proporcionarnos pistas valiosas sobre las características fundamentales de las interacciones miRNA-RNA a través de la evolución de los mamíferos (Chokeshaiusaha *et al.*, 2018). La susceptibilidad de las células bacterianas a los miRNA eucarióticos se ha demostrado al observar que algunos miRNA como miR-1, miR-130a y miR-2392 pueden ingresar de manera eficiente a las mitocondrias y regular la traducción de transcripciones específicas codificadas por el genoma mitocondrial (Wang *et al.*, 2015; Sarshar *et al.*, 2020). Esta relación entre las bacterias, los miRNA y las mitocondrias ha sido posible debido a la evolución de las mitocondrias existiendo la teoría que surgieron de ancestros bacterianos por endosimbiosis y son cruciales para procesos celulares como la producción de energía y la homeostasis, las respuestas al estrés y la supervivencia celular, por lo cual es posible extrapolar el conocimiento entre los hallazgos de las mitocondrias y las bacterias. Estos hallazgos sentaron las bases para estudiar el impacto de los miRNA en la composición y dinámica de la microbiota intestinal; también se demostró por primera vez que los miRNA de las heces del huésped pueden modular la composición de la microbiota intestinal modificando la abundancia relativa de bacterias a nivel familiar (Sarshar *et al.*, 2020).

La expresión de algunos miRNA como las familias miR-29, miR-196 y miR-15/16 se correlacionó significativamente con el número de *Bifidobacterium* y

*Lactobacillus* spp. en diferentes edades de becerros (Figura 1), revelando mecanismos reguladores potencialmente fundamentales por los cuales los probióticos tienen un efecto. La función principal de la familia miR-29 está relacionada con la maduración de las células dendríticas (CD), ya la familia miR-196 está involucrada en la linfangiogénesis y la familia miR-15/16 está involucrada en la diferenciación de leucocitos. La maduración de las CD y la diferenciación de leucocitos responden al tratamiento con probióticos en el intestino humano. Por lo tanto, los miRNA pueden mediar la interacción huésped-microbiano durante la colonización microbiana respondiendo a cambios (densidad, composición o presencia) en el microbioma, incluyendo *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* spp. La expresión de miR-129 y la población bacteriana total en el rumen estaría involucrada en el desarrollo del sistema digestivo, lo que sugiere que miR-129 puede regular el desarrollo del rumen en respuesta al aumento de la población bacteriana (Figura 1; Liang *et al.*, 2014). Asimismo, recientemente se sugirió la regulación transcripcional impulsada por microbios del desarrollo del rumen en becerros a través de miRNA, se identificaron tres pares de miRNA-mRNA implicados en el desarrollo del rumen: miR-25 y su correlación con proteína de unión a ácidos grasos, miR-29<sup>a</sup> con polipéptido y factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$ , y miR-30 y quinasa unida a integrina (Amin y Seifert, 2021).

Los eventos agudos y crónicos ejercen diferentes influencias sobre las vías metabólicas de los bovinos y pueden afectar la calidad de vida y la productividad de estos animales (Miretti *et al.*, 2020; Osorio, 2020). El estrés por destete en los rumiantes jóvenes es inducido, entre otros factores, por la incapacidad de hacer frente a una nueva dieta y se caracteriza por una estasis del crecimiento y la presentación de problemas entéricos como las diarreas. En cabritos, se han descrito dos miRNA relacionados con el desarrollo del músculo esquelético (miR-206 y miR-133a / b) se regularon significativamente a la baja en animales después del destete, al igual que los miRNA asociados a la proliferación celular (miR-99b-3p, miR-224, miR-143-5p y miR-10b-5p). Esto sugirió que el estrés por destete inducía un retraso del crecimiento en los animales a través de la represión de la proliferación celular, y los autores propusieron que los niveles significativamente alterados de estos miRNA pueden ser biomarcadores potenciales para evaluar la gravedad del estrés por destete en la producción (Miretti *et al.*, 2020).

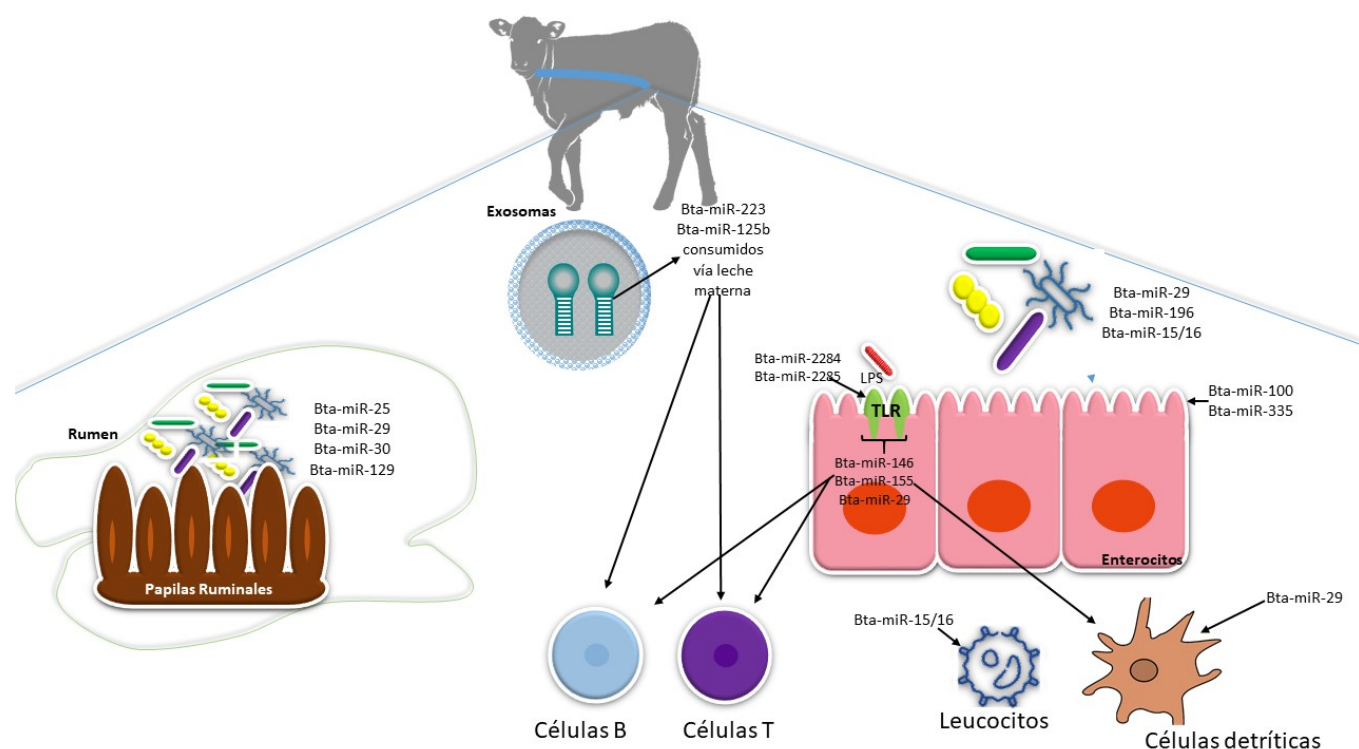


Figura 1. Interacción de los microRNA en el tracto gastrointestinal. Los microRNA secretados fuera de las células se liberan en exosomas. Los microRNA son capaces de modular crecimiento y la composición de la microbiota. El microbioma también puede verse influenciado por los microRNA externos derivados de la dieta (figura diseñada por los autores).

Cuadro 1. miRNA reportados en diferentes tejidos de bovinos y sus funciones

miRNA	Tejido u origen	mRNA blanco o función	Referencia
miR-19; miR-196; miR-146	Tejido ileal, leche	Genes involucrados con la respuesta inmune e inflamatoria, así como la proliferación de tejido linfóide.	Liang et al., 2014; Miretti et al., 2020
miR-149; miR-146	Glándula mamaria, sangre (monocitos CD 14)	Vías de señalización de los receptores NOD-like y Toll-like	Lawless 2014; Miretti et al., 2020
miR-144; miR-125; miR-200	Sangre periférica	Genes involucrados con la señalización quimiotáctica, señalización de MAPK, vías de señalización de los TLR. Mucosa gástrica.	Eulalio et al., 2012; Miretti et al., 2020; Sarshar et al., 2020
miR-378	Rumen	OS9, PDE1B, THY1, ARAP3, CCDC150, FBLN5, FZD1, Bt.28572, GYPC, HOXB3, JOSD1, LEPREL1, MXRA8, PEA15, PID1, PPP1R16B, RHBDD1, S1PR1, SCARA3, SCRN1	Wang et al., 2016
miR-27a/b; miR-146;	Rumen	Genes CR2, FANCI, LAMC1, Genes involucrados con la diferenciación de los tejidos, cambios asociados a la edad y el desarrollo.	Liang et al., 2014; Miretti et al., 2020; Wang et al., 2016.
miR-99	Glándula mamaria	SSR1, LAMP3, SGTA, SSR3, SLMAP, Diferenciación, celular, diferenciación de linfocitos T.	Wang et al., 2016
miR-29	Plasma	Disminución de AKT y Fosforilación de ERK, Células natural killer, desarrollo de linfocitos T, proliferación de fibroblastos, diferenciación de células epiteliales.	Eulalio et al., 2012; Liang et al., 2014; Miretti et al. 2020; Wang et al., 2016

### Conclusiones

Comprender la colonización microbiana a lo largo del tubo digestivo de los becerros es esencial, ya que influye en el desarrollo y la maduración del intestino del huésped, el sistema inmunológico y la salud. Aunado a esto, el papel de los miRNA y su correlación con la abundancia de bacterias intestinales sugieren que los miRNA pueden proporcionar un mecanismo para regular el desarrollo del sistema inmunológico de la mucosa del huésped. Si bien la función de los miRNA en la respuesta del huésped a las bacterias es cada vez más reconocida, es necesario profundizar en este tipo de interacciones. Son necesarios más estudios para correlacionar la expresión de miRNA y el transcriptoma para proporcionar evidencias directas sobre cómo las expresiones de miRNA y RNAm se integran.

Estas correlaciones permitirán conocer las interacciones huésped-microbioma y como estos cambios están directamente influenciados por factores como la microbiota, la edad y la dieta. Además, una de las incógnitas que aún es necesario responder es si la

disbiosis del microbioma durante la colonización en los recién nacidos tiene efectos a largo plazo y si impacta la salud y producción de animales.

A pesar de que las investigaciones de los miRNA de ganado muestran un gran potencial como una nueva clase de biomarcadores relacionados con el estrés, la salud y representan un campo nuevo para evaluar el manejo y el bienestar de los animales, aún quedan muchos retos asociados a la utilización de este tipo de tecnologías como lo es un protocolo tanto para el procesamiento como para la comparación de los perfiles obtenidos. Con esto también podrían establecerse criterios de utilización de los miRNA como desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos contra las bacterias patógenas.

De tal forma que en un futuro se podría contar con información a partir de la cual se pueda predecir la respuesta celular de los animales y/o proponer terapias con base en el conocimiento de los mecanismos moleculares de acción.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)-UNAM a través del proyecto IN211518.

**Financiamiento:** El estudio fue financiado por el PAPIIT-UNAM (IN211518).

**Conflicto de interés:** Ningún conflicto de interés por declarar.

### Literatura Citada

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and S. Pillai. 1999. *Inmunología básica: funciones y trastornos del sistema inmunitario*. Barcelona. España Elsevier.
- Alarcón, P., M. González, and C. Castro, E. 2016. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista Médica de Chile*, 144: 910-916.  
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000700013>
- Amin, N., and J. Seifert. 2021. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19: 989-1001.  
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.035>
- Bautista-Garfias, C., and M. Gualito. 2005. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Veterinaria México*, 36: 453-468.
- Beltrán, L. 2011. Inmunidad del becerro recién nacido. (Tesis de grado). Universidad de Cuenca.  
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3061>
- Bushati, N., and M. Cohen. 2007. microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23: 175-205.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406>
- Chase, C. 2018. Enteric Immunity: Happy Gut, Healthy Animal. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34: 1-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.006>
- Chokeshaiusaha, K., T. Sananmuang, D. Puthier, and C. Nguyen. 2018. An innovative approach to predict immune-associated genes mutually targeted by cow and human milk microRNAs expression profiles. *Veterinary world*, 11: 1203-1209.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1203-1209>
- Concha, C. 2007. La inmunidad en la vaca lechera como factor relevante en la lucha contra la mastitis. Departamento de producción animal. Universidad de Chile. Santiago. Chile.



- Dalmasso, G., T. Nguyen, Y. Yan, H. Laroui, M. A. Charania, S. Ayyadurai, and V. Sitaraman. 2011. Microbiota modulate host gene expression via microRNAs. *PLoS One* 6: e19293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019293>
- Delgado, R. 2013. La producción de leche: Un reto actual para empresas del mañana 2° Pre Congreso IASA, 13 Congreso Internacional AMVEB Laguna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Coahuila, México. Recuperado de <https://www.ganaderia.com/destacado/Inmunidad-e-inmunesupresion-en-bovinos-lecheros>
- Do, D. N., P. L. Dudemaine, B. E. Fomenky, and E. M. Ibeagha-Awemu. 2018. Integration of miRNA and mRNA co-expression reveals potential regulatory roles of miRNAs in developmental and immunological processes in calf ileum during early growth. *Cells*, 7: 134. <https://doi.org/10.3390/cells7090134>
- Do, D. N., Dudemaine, P. L., Mathur, M., Suravajhala, P., Zhao, X., & Ibeagha-Awemu, E. M. 2021. MiRNA regulatory functions in farm animal diseases, and biomarker potentials for effective therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 3080.
- Eulalio, A., L. Schulte, and J. Vogel. 2012. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biology*, 9: 742-750. <https://doi.org/10.4161/rna.20018>
- Flores, F., M. A. Martínez, C. Arenas, A. Covarrubias, and J. L. Reyes. 2007. ¡Silencio mensajeros! Qué son y cómo actúan los microRNAs. *Revista de Educación Bioquímica*, 26: 135-141.
- Gómez, M., y M. Morales. 2017. Comunicación bidireccional de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema nervioso central y en la enfermedad de Parkinson. *Archivos de Neurociencias*, 22: 53-71.
- Gómez, M., J. L. Ramon, L. Pérez, y J. R. Blanco. 2019. El eje microbiota- intestino- cerebro y sus grandes proyecciones. *Revista de Neurología*, 68: 111-117. <https://doi.org/10.33588/rn.6803.2018223>
- González-Rascón, A., and V. Mata-Haro. 2015. MicroRNAs: Regulators of TLR2-Mediated Probiotic Immune Responses. *MicroRNA*, 4: 168-174. <https://doi.org/10.2174/2211536605666151208123209>
- Griffiths, S. 2004. The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*, 32: 109-111. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj023>
- Hooper, L. V., D. R. Littman, and A. J. Macpherson. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336: 1268-1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Klein, D., N. M. Quijada, M. Dzieciol, B. Feldbacher, M. Wagner, M. Drillich, S. Schimtz, and E. Mann. 2019. Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PLoS One*, 14: e0220554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220554>
- Lawless, N., P. Vegh, C. O'Farrelly, and D. J. Lynn. 2014. The Role of microRNAs in Bovine Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 5: 611. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00611>
- Li, M., Chen, W. D., Wang, Y. D. (2020). The roles of the gut microbiota-miRNA interaction in the host pathophysiology. *Molecular Medicine*, 26(1), 1-9.
- Liang, G., N. Malmuthuge, H. Bao, P. Stothard, P. J. Griebel, and L. L. Guan. 2016. Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system development in the small intestine of neonatal calves. *BMC Genomics*, 17: 602. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2957-y>
- Liang, G., N. Malmuthuge, T. B. McFadden, H. Bao, P. J. Griebel, P. Stothard, and L. L. Guan. 2014. Potential regulatory role of microRNAs in the development of bovine gastrointestinal tract during early life. *PLoS One*, 9: e92592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092592>
- Lugo, A. y Trujillo, K. 2009. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria*, 11: 187-192.
- Malmuthuge, N. 2016. Role of gut microbiota in Mneonatal calf gut development. (Tesis doctoral). University of Alberta, Edmonton, Canadá.
- Malmuthuge, N., and L. L. Guan. 2017. Understanding the gut microbiome of dairy calves: opportunities to improve early-life gut health. *Journal of Dairy Science*, 100: 5996-6005. <https://doi.org/10.3158/jds.2016-12239>
- Malmuthuge, N., Griebel, P., Guan, L. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Frontiers in Veterinary Science*, 2: 36. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00036>
- Manzullo, A. 1982. Protección inmunitaria del ternero recién nacido. *Jornada Académica 9 y 10 de diciembre*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, p 46-57.
- Mayer, M., A. Abenthuma, J. M. Matthes, D. Kleeberger, M. J. Ege, C. Holzel, J. Bauer, and K. Schwaiger. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Veterinary Microbiology*, 161:179-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.023>






- Menzies, M., and A. Ingham. 2006. Identification and expression of Toll-like receptors 1–10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109: 23-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.06.014>
- Miretti, S., C. Lecchi, F. Ceciliani, and M. Baratta. 2020. MicroRNAs as Biomarkers for Animal Health and Welfare in Livestock. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 578793.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.578193>
- Olguin, A. 2019. Síndrome Diarreico Neonatal. *Clinica de Bovinos I. Universidad Nacional Autónoma de México*.  
[http://www.ammveb.net/clinica/sindrome\\_diarreico\\_neonatal.pdf](http://www.ammveb.net/clinica/sindrome_diarreico_neonatal.pdf) Consultado el 22 de septiembre de 2021.
- Osorio, J. S. 2020. Gut health, stress, and immunity in neonatal dairy calves: The host side of host-pathogen interactions. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11: 1-15.  
<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00509-3>
- Pabón, Y. 2011. MicroRNAs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43: 289-297.
- Pejenaute, E., M. Ricote. 2018. Desde el intestino a la piel. Probióticos en la práctica clínica. Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria. Editorial IMC. Madrid. España.
- Reis de Souza, T. C., G. Mariscal Landín, and K. Escobar García. 2010. Algunos factores fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. *Veterinaria México*, 41: 275-288.
- Sarshar, M., Scribano, D., Ambrosi, C., Palamara, A., Masotti, A. 2020. Fecal microRNAs as innovative biomarkers of intestinal diseases and effective players in host-microbiome interactions. *Cancers*, 12: 2174. <https://doi.org/10.3390/cancers12082174>
- Sentandreu, R. 2017. El hombre y los microorganismos: el eje cerebro-intestino. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 83: 360-370.
- Taschuk, R., and J. Griebel. 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews*, 13: 129-141.  
<https://doi.org/10.1017/S1466252312000096>
- Wang, W. X., Springer, J. E. 2015. Role of mitochondria in regulating microRNA activity and its relevance to the central nervous system. *Neural regeneration research*, 10: 1026.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.160061>
- Wang, D., G. Liang, B. Wang, H. Sun, and J. Liu. 2016. Systematic microRNAome profiling reveals the roles of microRNAs in milk protein metabolism and quality: insights on low-quality forage utilization. *Scientific Reports*, 17: 21194.  
<https://doi.org/10.1038/srep21194>
- Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., Tiedje, J. M., Hashsham, S. A. 2017. MicroRNAs-based inter-domain communication between the host and members of the gut microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 27: 1896.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01896>
- Xiao, C., Rajewsky, K. 2009. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, 136: 26-36.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.027>
- Zhao, Y., Zeng, Y., Zeng, D., Wang, H., Zhou, M., Sun, N., Ni, X. 2021. Probiotics and MicroRNA: Their Roles in the Host-Microbe Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3363.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604462>

## ORIGINAL ARTICLE

## Ruminant Nutrition

# Isolation of bacterial consortia with probiotic potential from the rumen of tropical calves

Sarahí Rodríguez-González<sup>1</sup> | Laura González-Dávalos<sup>1</sup> |  
 Carolina Robles-Rodríguez<sup>1</sup> | Carlos Lozano-Flores<sup>2</sup> | Alfredo Varela-Echavarría<sup>2</sup> |  
 Armando Shimada<sup>1</sup> | Ofelia Mora-Izaguirre<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

<sup>2</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

**Correspondence**

Ofelia Mora-Izaguirre, Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Juriquilla 76230 Querétaro, Mexico.  
 Email: [ofemora66@unam.mx](mailto:ofemora66@unam.mx)

**Funding information**

PAPIIT-UNAM, Grant/Award Number: IN211518

**Abstract**

Probiotics are live microorganisms that confer health benefits to their animal host by balancing the composition of its gastrointestinal microbiota and modulating its immune response. In this work, we studied bacterial consortia isolated from the rumen of 28- and 42-day-old calves to select those showing probiotic capacity. Consortia were characterized and their growth dynamics were determined in several growth media. The number of viable bacteria was larger in the Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS) than in nutritive medium A (MNA) and the largest was for A3D42. Antibiotic susceptibility of bacterial consortia in MRS was higher than in MNA and the most susceptible samples were A1D28 and A3D42. In turn, A3D42 showed the highest tolerance to bile salts in MRS and MNA. Moreover, all bacterial consortia showed optimal growth at pH 5, 5.5, 6 and 7 in both media, while their temperature tolerance was higher in MRS. The antagonistic activity of bacterial consortia in MNA was higher than in MRS with A2D42 showing the best antagonistic activity for *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 9027) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in MNA. Additionally, A1D42 and A2D42 in MRS and A3D42 in MNA had significant adhesion to mucins, and A1D42 in MRS had the highest. Regarding their species composition, all bacterial consortia in MRS belonged to the phylum *Firmicutes*, and the class *Bacilli* and bacterial consortia in MNA belonged to three phyla; *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus johnsonii* were identified in all bacterial consortia in MRS broth. Based on these results, A1D42 and A3D42 grown in MRS showed the best potential as probiotics for calves, which could result in health benefits and improve their production.

**KEYWORDS**

bacterial consortia, calves, probiotics, rumen

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* published by Wiley-VCH GmbH.

## 1 | INTRODUCTION

Probiotics are microorganisms that confer health benefits to their host animal when administered in adequate doses owing to their nutritional, immunological, bacteriostatic and bactericide effects (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization FAO/WHO, 2002; Guarner et al., 2005; Pineiro & Stanton, 2007). Microorganisms with probiotic capacity are an alternative for the prevention and treatment of some calf pathologies, as well as to improve their productivity (Uyeno et al., 2015). Calf weaning and changes in feeding cause stress, which inhibit the colonization of the gastrointestinal tract (GIT) by beneficial microbiota and increase the risk of its colonization by pathogens. This results in common problems in cattle production such as disease (Signorini et al., 2012; Ventura et al., 2013) and the subsequent economic losses due to the cost of treatment, calf mortality and calf morbidity (Ok et al., 2009).

There is evidence that GIT microbiota stimulates the host immune function (Hooper et al., 2012; Olszak et al., 2012; Rosmini et al., 2004). Moreover, probiotics may also prevent the colonization of the digestive tract of young animals by pathogens that cause gastrointestinal affections (Rosmini et al., 2004). The mechanism used by these beneficial bacteria is colonization resistance or barrier effect (Isolauri et al., 2001), which prevents colonization pathogens intestinal sites. Some lactic acid bacteria (LAB) have been reported to have immunomodulatory and protective effects and may prevent infectious pathologies (Hooper et al., 2012; Isolauri et al., 2001).

Hence, the ideal microbial characteristics for probiotic candidates are being a normal inhabitant of the target species, non-toxic, non-pathogenic, resistant to the GIT pH, temperature, and bile salts, antagonist to pathogenic bacteria, adherent to the intestinal mucosa, with the potential of modulating the immune response, and genetically stable (Hernández-Peñaranda, 2003). Therefore, when searching for wild-type probiotic candidates, the best strategy is to obtain the bacterial strains or consortia (BC) from the familiar environment of the microorganism in the GIT of the host. Those used in the food industry are LAB, mainly *Streptococcus termophilus* and *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, and *Escherichia coli* strain Nissle (Adams & Marteau, 1995; Pineiro & Stanton, 2007; Weimer, 2015).

In this work, we isolated and characterized bacterial communities from the rumen of 28- and 42-day-old calves from the Mexican tropic that show probiotic properties, which could be used to develop calf-specific probiotics and improve their health conditions increasing their productive performance.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Isolation of bacterial consortia and culture conditions

A total of six ruminal fluid samples were collected through an orogastric probe from clinically healthy F1 Holstein × Zebu calves raised at the

Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT, FMVZ-UNAM) of 28 (A1D28, A2D28, A3D28) and 42 days of age (A1D42, A2D42, A3D42) and stored in sterile tubes. Experimental protocols were approved by the internal committee for the care and use of experimental animals (CICUAE-DC-2019/4-2, UNAM) according to the NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001). At birth, the calves were fed colostrum and were with their mothers until weaning. They began to eat forage after the first week of age. All the animals were sacrificed at CEIEGT and rumen fluid samples were frozen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until further analysis (Liang et al., 2014, 2016). All rumen fluid samples were cultured in Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, DIFCO™, USA; Sigma-Aldrich), thioglycolate broth (TG, Becton, Dickinson, and Company Sparks), and nutritive medium A (MNA) (Aguilar-González & Mora-Izaguirre, 2016) at  $37^{\circ}\text{C}$  under anaerobic conditions until they reached 0.5–0.6 optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) measured with an HP/Agilent 8453UV-Vis spectrophotometer (SpectraLab Scientific). From each culture, a 1 ml sample was frozen in MRS, TG, and MNA medium containing 80% of glycerol and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  to evaluate probiotic properties, and *Propionibacterium acidipropionici* (ATCC 4965) was used as positive control.

The growth rate of all BC cultured in MRS, TG, and MNA broths was determined by measuring their  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  every 2 h until an OD of 0.5–0.6 was reached. The data were expressed as a time and OD growth rate curve.

### 2.2 | Quantification of viable bacteria

BC were grown in MRS, TG, and MNA broths to an  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.5–0.6 and diluted to a ratio of  $1:1 \times 10^9$  (v/v) by serial 10-fold dilutions in sterile water, seeded on MRS and MNA agar plates, and incubated anaerobically at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Colonies were counted and CFU/ml were determined. MNA was used to maintain the stability of bacterial populations as a non-specific broth.

### 2.3 | Probiotic tests

#### 2.3.1 | Susceptibility to antibiotics

One hundred microliters of BC culture ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5\text{--}0.6$ ) was seeded on MRS and MNA agar plates. Multidisc with antibiotics Gram (–)-specific: AK, amikacin (30  $\mu\text{g}$ ); AM, ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ); CB, carbenicillin (100  $\mu\text{g}$ ); CL, chloramphenicol (30  $\mu\text{g}$ ); NET, netilmicin (30  $\mu\text{g}$ ); NF, nitrofurantoin (300  $\mu\text{g}$ ); NOF, norfloxacin (10  $\mu\text{g}$ ). Gram (+)-specific: DC, dicloxacillin (1  $\mu\text{g}$ ); CLM, clindamicin (30  $\mu\text{g}$ ); E, erythromycin (15  $\mu\text{g}$ ); PE, penicillin (10 U); VA, vancomycin (30  $\mu\text{g}$ ); TE, tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ). Gram (–) and (+)-specific: AM, ampicillin (30 and 10  $\mu\text{g}$  respectively); CF, cephalothin (30  $\mu\text{g}$ ); CFX, cefotaxime (30  $\mu\text{g}$ ); CPF, ciprofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ); GE, gentamicin (10  $\mu\text{g}$ ); SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim (25  $\mu\text{g}$ ) (MULTIBAC-ID, Investigación Diagnóstica) were placed on the inoculated plates and incubated anaerobically at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The diameter of the inhibition

zone (mm) was measured and the results were expressed as resistant (R), intermediate (I) and susceptible (S) according to the manufacturer's instructions. *Propionibacterium acidipropionici* (ATCC 4965) was grown on MRS agar plates.

### 2.3.2 | Resistance to bile salts

Based on the antibiotic susceptibility results, the resistance to bile salts was determined only for samples from 42-day-old calves.

One hundred microliters of BC culture ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.5\text{--}0.6$ ) was inoculated in MRS and MNA broths at pH 7.5 with or without 0.3% ox-bile salt and grown anaerobically at 37°C. The growth curve of each BC culture was monitored by measuring  $OD_{600\text{ nm}}$  every 2 h up to 6 h. The cultures were then diluted by 10-fold serial dilutions to  $1:1 \times 10^8$  and  $1:1 \times 10^9$  (v/v, ratio), plated on MRS and MNA agar, and incubated anaerobically at 37°C for 24 h. The survival rate was expressed as percentage of CFU/ml.

### 2.3.3 | Resistance to pH

One hundred microliters of BC culture ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.5\text{--}0.6$ ) was inoculated in MRS and MNA broths at pHs 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 7 and control (pH = 6.5) and incubated anaerobically at 37°C for 24 and 48 h. The growth curve of each BC culture was monitored by measuring  $OD_{600\text{ nm}}$  and six 10-fold serial dilutions (v/v, ratio) starting at  $1:1 \times 10^1$  (v/v, ratio) were plated on MRS and MNA agar and grown anaerobically at 37°C for 24 h. Results were expressed as survival in percentage of CFU/ml.

### 2.3.4 | Tolerance to temperature

One hundred microliters of BC culture ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.5\text{--}0.6$ ) was inoculated in MRS and MNA broths and incubated anaerobically at 30°C, 37°C, and 45°C, with  $OD_{600\text{ nm}}$  measured at 24 and 48 h. The cultures were diluted to  $1:1 \times 10^6$ ,  $1:1 \times 10^7$ ,  $1:1 \times 10^8$ , and  $1:1 \times 10^9$  (v/v, ratio) and plated on MRS and MNA agar at 37°C for 24 h. Survival results were expressed as percentage of CFU/ml.

### 2.3.5 | Antagonistic activity

Bacterial antagonism was evaluated by disc diffusion method (Bhunia et al., 1988) with modifications, employing two pathogenic strains (*Salmonella typhimurium* ATCC 19028 and *E. coli* ATCC 11229, donated by the Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro). The BC cultures were incubated anaerobically in MRS and MNA broths, and the pathogenic strains in LB broth at 37°C overnight. One hundred microliters of pathogens was spread on Müller–Hinton agar plates. BC cultures were

centrifugated at 1006 g for 5 min; after that, BC cultures supernatants were added to sterile paper discs and placed on the Müller–Hinton agar plates. After incubation at 37°C for 24 h, the growth inhibition zone (mm) was measured. The antagonistic activity was considered positive when the average growth inhibition zone diameter was  $\geq 10$  mm.

### 2.3.6 | Adhesion to mucus

According to all the previous results, it was decided to continue working with that BC that showed better results in MRS. Sheep small intestinal mucin was prepared according to the methods described by Vélez et al. (2010) and used to assess the adhesion of BC. Briefly, BC were labelled by incubation with 250  $\mu\text{l}$  of 4,6-dichlorotriazinyl aminofluorescein in 500  $\mu\text{l}$  of PBS at 60°C for 2 h and washed three times by resuspension in PBS and collected by centrifugation at 10,000g 10 min at 4°C. Ten microliters of labelled BC was mixed with 200  $\mu\text{l}$  of ovine mucin and incubated at 37°C for 2 h, washed three times with PBS and diluted 1:1000 and 1:100,000, and fixed with paraformaldehyde (4%) on microscope slides. Adherence was expressed as CFU/ml. Viable bacteria that adhered to the mucus were observed under a microscope. ImageJ was used to quantitate viable bacteria. For microscopic analysis, the MosaiX module for the APOTOME system with the  $\times 40/1.30$  DIC (UV) VIS-IR M27 Plan-Apochromat oil immersion objective was used to obtain a full mosaic image (1 mm<sup>2</sup>). Three individual image stacks were collected and assembled by the MosaiX system (Carl Zeiss) for each histological slide. ImageJ64 and FIJI were used for the analysis of the 2D images. Quantitation of particles was performed using Yen's image thresholding method (Yen et al., 1995).

## 2.4 | Genomic characterization of the rumen microbiome of 42-day-old calves

Genomic DNA of the BC rumen microbiota was used to determine the bacterial diversity. Rumen DNA extraction of BC A1D42, A1D42 and A3D42 in MRS was performed according to the RBB + C method (Yu & Morrison, 2004). DNA concentration was measured with a Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies), and DNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis (1%). The purified DNA was subject to partial 16S DNA gene sequencing to confirm bacteria identity. Sequencing of the rumen microbiome was performed by Research and Testing Laboratory (RTL) Genomics with Illumina Myseq sequencer. Illumina produces FASTQ files with a phred offset of +33. FASTQ files contain all the raw sequence data generated by the sequencer; they may contain information regarding the primer for amplicon sequencing. To allow for more run flexibility, RTL genomics used a two-step PCR process for Illumina sequencing that uses universal adapters and sequences the forward and reverse primers. FASTQ files generated by Illumina sequencer come in two forms

depending on the method used: paired or single end; in this case, we use pair-end sequence.

Results were expressed as relative abundance (%). Data quality control and analyses were mostly performed using the USEARCH V.11 pipeline. The FASTQ forward and reverse files were merged into a single FASTQ file per sample; quality control and processing included removing adapters and cutting the sequences to length-based filtering of 400 bp (reads smaller than 200 bp were excluded from the analysis). The resulting read files were then aligned to RDP V.16 to define operational taxonomic units (OTUs) for taxonomy assignment; the OTU table was generated at 97% identity. The Uclust method was used to cluster the reads into OTUs (Edgar, 2010).

## 2.5 | Relative quantification of *Lactobacilli* and *Enterobacteria*

Rumen DNA extraction was performed as described above. A total of 50 ng of DNA measured in a Nanodrop 1000 spectrophotometer was analysed in a StepOne Real-Time PCR System. The primers used were: Universal primers: BACT1369 F: CGGTGAATACGTTTCYCGG, PROK1492 R: GGWTACCTTGTTACGACTT (Suzuki et al., 2000); *Lactobacillus* F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA, *Lactobacillus* R: CACCG CTACACATGGAG (Rinttila et al., 2004) and *Enterobacteria* F: ATGT TACAACCAAAGCGTACA, *Enterobacteria* R: TTACCYTGACGCTTA ACTGC (Takahashi et al., 2017). Conditions of PCR: 40 cycles; 95°C 10 min, 95°C 10 s, 56°C 15 s, 72°C 15 s. Melting curve: 56°C 1 min, increasing temperature 0.3°/s up to 95°C. Samples were analysed in duplicate. Relative abundance of the DNA target was calculated by the De Gregoris et al. (2011) method.

## 2.6 | Identification of *Lactobacilli*

The molecular identification of *Lactobacilli* in BC cultured in MRS broth was made only in BC A1D42 and A3D42, which showed better results and it was performed by PCR. The *Lactobacillus* tested were *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus ruminis*, and *Lactobacillus johnsonii*, using primers designed in this study (Table 1). PCR conditions were 95°C for 10 min, 35 cycles at 57°C 30 s for primer annealing and 72°C for 60 s for extension, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were analysed by gel electrophoresis (1%) and visualized under UV light using ImageMaster (Pharmacia Biotech). A 1 kb ladder (Invitrogen) was used to verify PCR size. Illumina MiSeq sequencing of the DNA samples was performed using primers covering the V4 region (357wF:3'-CCTACGGGNGGCWGCAG-5'; 785R:3'-GACTACHVG GGTATCTAATCC-5') obtaining 250 nucleotides paired reads. The obtained sequence data were compared with the Genbank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) for the final identification of the *Lactobacillus* spp.

## 2.7 | Statistical analysis

Data were measured in triplicate (antibiotic susceptibility, bile salts resistance, resistance to pH, temperature tolerance, and antagonistic activity) or duplicate (in vitro adhesion assay), and expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD); differences between samples were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey–Kramer tests, and the differences with  $p < 0.05$  were

**TABLE 1** PCR primers used to detect *Lactobacillus*

Target	Sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)
Bacterial primers <sup>a</sup>	357wF CCTACGGGNGGCWGCAG 785R GACTACHVGGGTATCTAATCC	–	–
<i>L. acidophilus</i>	LacidopF CAACCAGAAAGTCAGGCTA LacidopR CTAATCCTGTTTCGCTACCAT	57.5	302
<i>L. casei</i>	LcaseiF CGCAGCTAACGCATTAAGCA LcaseiR TTGCAGCCTACAGTCCGAA	57.9	462
<i>L. Rammus</i>	LrammuF CAACGCGAAGAACCTTACCAG LramnuR TTGCAGCCTACAGTCCGAAC	57	352
<i>L. fermentum</i>	LfermenF CGGTGTGCCTAATACATGCAA LfermenR TCAGTCTCTCAACTCGGCTA	56.5	300
<i>L. ruminis</i>	LruminisF TTTGTAACACCCCAAAGTCG LruminisR ATATCGCAGTTAGTCACGTC	52.7	414
<i>L. johnsonii</i>	LjohnsonF CACGGCCCAAACCTCCTACGG LjohnsonR TTCGCTACCCATGCTTTTCGAG	58	455

<sup>a</sup>Primers used by RTL genomics.



considered significant. Data were analysed using the GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software) and the JMP version 8.0 software (SAS Institute). Taxonomic assignment was performed using the RDP V.16 reference database with 97% identity. Data were analysed in the R platform (3.6) with the Phyloseq library.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Growth rate

There was no difference in the growth rate of the BC in MRS and TG broths. Nevertheless, sample A1D42 had the highest rate in both media (Figure 1a,b). A2D28 and A2D42 in MNA broth had the lowest growth, whereas A3D42 had the highest rate in MRS, MNA and TG, although it was not significant ( $p > 0.05$ ) (Figure 1c).

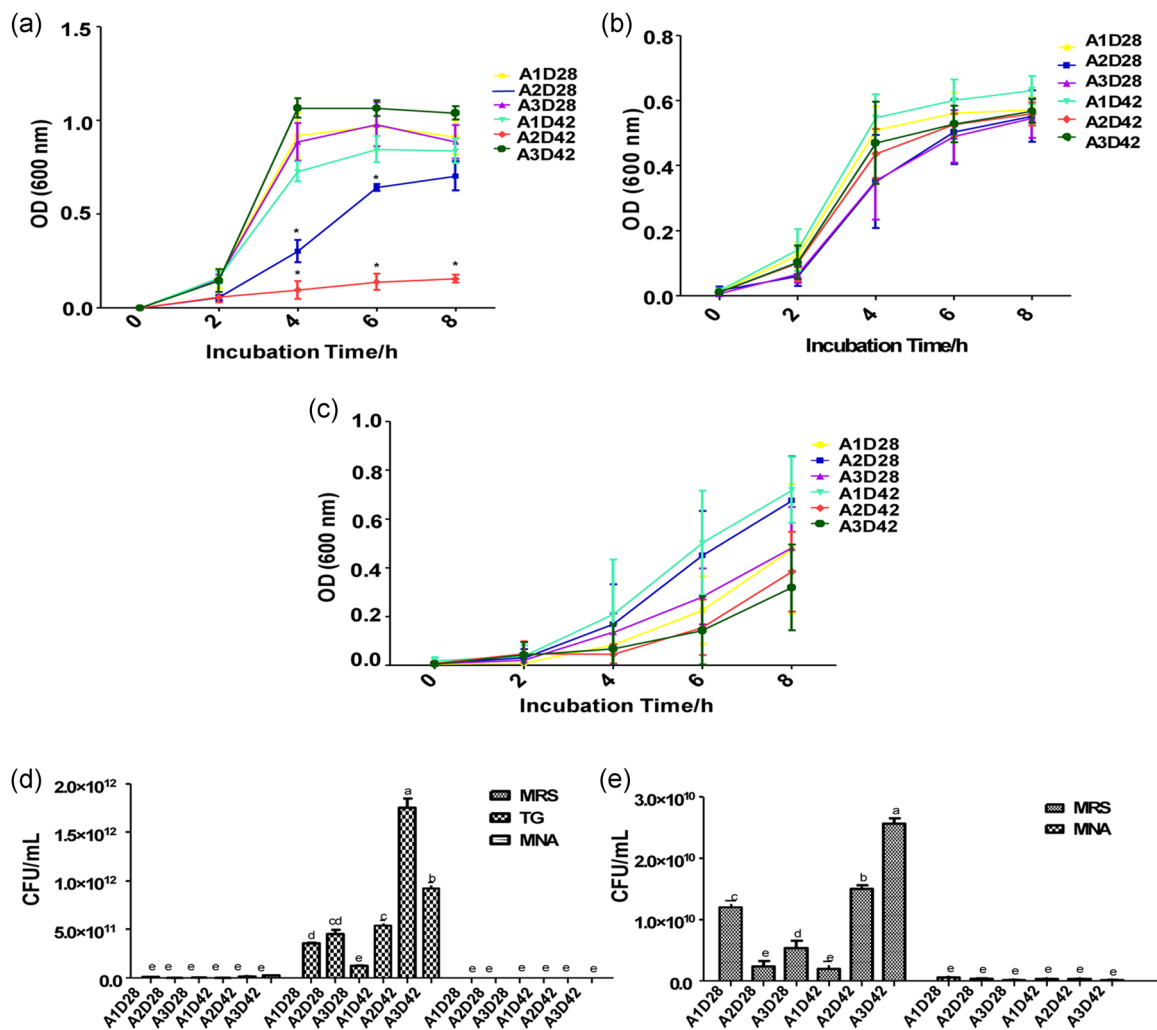
#### 3.2 | Quantitation of viable bacteria

Consortia in TG had the highest growth performance in terms of viable bacteria (CFU/ml) at both ages (28 and 42 days,  $p < 0.05$ ), except for A3D28, while A2D42 had the largest count in TG broth (Figure 1d). When only MRS and MNA were compared, larger counts were observed in the former (Figure 1e,  $p < 0.05$ ) with A3D42 showing the largest count in MRS.

#### 3.3 | Probiotic tests

##### 3.3.1 | Susceptibility to antibiotics

The susceptibility profile for antibiotics specific for Gram (-) and Gram (+) bacteria of BC isolates of 28- and 42-day-old calves and *P. acidipropinici* are shown in Tables 2 and 3 respectively. BC grown in MRS broth for



**FIGURE 1** Growth rate (OD/incubation time (h)) of BC (A1D28, A2D28, A3D28, A1D42, A2D42 and A3D42) inoculated in (a) MRS, (b) TG and (c) MNA broth. Colony formation units (CFU)/ml of BC inoculated in (d) MRS, TG and MNA broth, and (e) MRS and MNA. Data are mean  $\pm$  SD. Values with different letters are different between media; Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth, thioglycolate broth [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

**TABLE 2** Susceptibility profile to Gram (-) and (+) antibiotics of potential probiotic BC grown on MRS and MNA broths

Gram (-)						Gram (+)					
A1D28 <sup>a</sup>	MRS <sup>b</sup>	MNA <sup>b</sup>	A1D42 <sup>a</sup>	MRS <sup>b</sup>	MNA <sup>b</sup>	A1D28 <sup>a</sup>	MRS <sup>b</sup>	MNA <sup>b</sup>	A1D42 <sup>a</sup>	MRS <sup>b</sup>	MNA <sup>b</sup>
AK	R	R	AK	R	R	AM	R	R	AM	S	R
AM	R	R	AM	R	R	CF	S	R	CF	S	R
CB	I	R	CB	I	R	CFX	S	S	CFX	S	R
CF	S	I	CF	R	S	DC	R	R	DC	S	R
CFX	S	I	CFX	S	I	CPF	R	R	CPF	R	I
CPF	R	I	CPF	R	I	GE	S	R	GE	R	R
CL	S	R	CL	S	I	CLM	S	R	CLM	S	R
GE	S	I	GE	R	R	E	S	R	E	S	R
NET	R	R	NET	R	R	SXT	R	R	SXT	R	R
NF	S	S	NF	S	S	PE	S	R	PE	S	R
NOF	R	R	NOF	R	I	VA	S	R	VA	S	R
SXT	R	R	SXT	R	R	TE	R	R	TE	R	R
A2D28 <sup>a</sup>			A2D42 <sup>a</sup>			A2D28 <sup>a</sup>			A2D42 <sup>a</sup>		
AK	R	R	AK	R	R	AM	S	R	AM	S	R
AM	R	R	AM	R	R	CF	R	R	CF	S	R
CB	R	R	CB	S	R	CFX	I	R	CFX	S	R
CF	I	S	CF	S	I	DC	R	R	DC	S	R
CFX	I	R	CFX	S	I	CPF	R	S	CPF	I	S
CPF	R	I	CPF	R	R	GE	R	R	GE	R	R
CL	I	R	CL	S	R	CLM	S	R	CLM	S	R
GE	R	R	GE	R	R	E	I	R	E	S	R
NET	R	R	NET	R	R	SXT	R	R	SXT	I	R
NF	S	S	NF	R	S	PE	S	R	PE	S	R
NOF	R	S	NOF	R	R	VA	R	R	VA	S	R
SXT	R	R	SXT	R	R	TE	R	R	TE	R	R
A3D28 <sup>a</sup>			A3D42 <sup>a</sup>			A3D28 <sup>a</sup>			A3D42 <sup>a</sup>		
AK	R	R	AK	R	R	AM	R	R	AM	S	R
AM	R	R	AM	R	R	CF	I	R	CF	S	R
CB	R	R	CB	S	R	CFX	I	R	CFX	S	S
CF	I	I	CF	S	R	DC	R	R	DC	S	R
CFX	I	I	CFX	S	R	CPF	R	S	CPF	R	S
CPF	R	I	CPF	R	R	GE	R	R	GE	S	R
CL	S	I	CL	S	R	CLM	R	R	CLM	I	R
GE	R	R	GE	R	R	E	S	R	E	R	R
NET	R	R	NET	R	R	SXT	R	R	SXT	S	R
NF	I	S	NF	S	S	PE	S	R	PE	S	R
NOF	R	R	NOF	R	R	VA	R	R	VA	R	R
SXT	R	R	SXT	R	R	TE	R	R	TE	S	R

Abbreviations: MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth.

<sup>a</sup>BC, bacterial consortium, Gram (-)-specific: AK, Amikacin (30 µg); AM, Ampicillin (10 µg); CB, Carbenicillin (100 µg); CL, Chloramphenicol (30 µg); NET, Netilmicin (30 µg); NF, Nitrofurantoin (300 µg); NOF, Norfloxacin (10 µg). Gram (+)-specific: DC, Dicloxacillin (1 µg); CLM, Clindamicin (30 µg); E, Erythromycin (15 µg); PE, penicillin (10 U); VA, Vancomycin (30 µg); TE, Tetracycline (30 µg). Gram (-) and (+)-specific: AM, Ampicillin (30 and 10 µg respectively); CF, Cephalothin (30 µg); CFX, Cefotaxime (30 µg); CPF, Ciprofloxacin (5 µg); GE, Gentamicin (10 µg); SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim (25 µg).

<sup>b</sup>R, resistant; I, intermediate; S, susceptible, *n* = 3.

**TABLE 3** Gram (-) and (+) antibiotic susceptibility of *P. acidipropionici*

Gram (-) <sup>a</sup>	MNA <sup>b</sup>	Gram (+) <sup>a</sup>	MNA <sup>b</sup>
AK	S	AM	S
AM	S	CF	R
CB	R	CFX	I
CF	S	DC	R
CFX	I	CPF	I
CPF	I	GE	R
CL	S	CLM	R
GE	S	E	R
NET	S	SXT	I
NF	S	PE	R
NOF	R	VA	S
SXT	S	TE	R

Abbreviation: MNA, nutritive medium A.

<sup>a</sup>AK, Amikacin (30 µg); AM, Ampicillin (10 µg); CF, Cephalothin (30 µg); CL, Chloramphenicol (30 µg); CPF, Ciprofloxacin (5 µg); GE, Gentamicin (10 µg); NET, Netilmicin (30 µg); NF, Nitrofurantoin (300 µg); SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim (25 µg); VA, Vancomycin (30 µg); TE, Tetracycline (30 µg).

<sup>b</sup>R, resistant; I, intermediate; S, susceptible,  $n = 3$ .

both ages was more susceptible than in MNA broth for both antibiotic types. For Gram (-) antibiotics, BC from A1D28 and A3D42 were the most susceptible. For Gram (+), BC isolates from 42 days in MRS were more susceptible than those from Day 28. *Propionibacterium acidipropionici* was susceptible to all Gram (-) antibiotics tested, but was resistant to the Gram (+) antibiotics, gentamycin and tetracycline (Table 3).

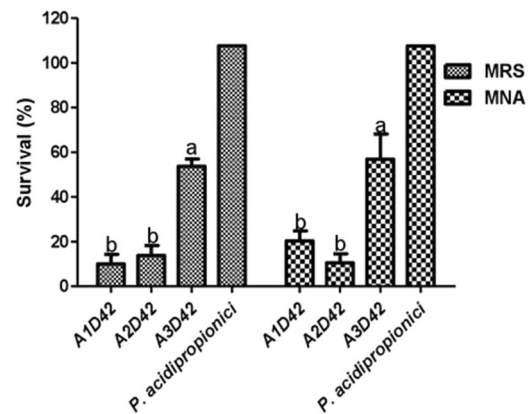
Since the 42-day-old animals were more susceptible to antibiotics than 28-day-old animals, the following probiotic tests were carried out only on the samples from 42-day-old animals.

### 3.3.2 | Resistance to bile salts

All BC isolates showed similar tolerance to 0.3% ox-bile salts in the broths tested (Figure 2), and A3D42 showed the highest survival (53.73% for MRS and 57.34% for MNA broth,  $p < 0.05$ , Figure 2).

### 3.3.3 | Tolerance to pH

Survival (%) of BC improved with the increasing pH in MNA broth. At 24 h (Figure 3a), there were differences ( $p < 0.05$ ) at pH 4 and 7, in which A1D42 and A3D42 had the highest survival. In contrast, at 48 h (Figure 4a), there were differences ( $p < 0.05$ ) between them, at pH 5.5, and A3D42 had the highest survival rate. Regarding the survival of BC in MRS at 24 h, the lowest rates were at pH 2, 3 and 4, which improved from pH 5 upwards (Figure 3b), and A3D42 had the highest rate. Similar survival results were obtained at 48 h (Figure 4b),

**FIGURE 2** Bile salts survival of BC (A1D42, A2D42 and A3D42) inoculated in MRS and MNA broth. Data are mean  $\pm$  SD. Values with different letters are different between bacterial consortia; Tukey–Kramer ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth

which were slightly higher than at 24 h. Moreover, there was a difference at pH 2, in which A2D42 had the highest rate. At pH 3 and 5, A1D42 had the highest survival and *P. acidipropionici* (ATCC 4965) also showed high survival.

### 3.3.4 | Tolerance to temperature

All BC isolates in MNA and MRS broths at 24 and 48 h had large numbers of viable bacteria (CFU/ml) at 37°C, and there were no differences between them (Table 4). In general, BC grown in MRS had larger counts than in MNA and were larger at 30°C than at 45°C. There were no differences between the BC in MRS at 24 h, except A1D42 at 45°C, which was lower than the others BC. The significant differences in BC in MNA were: A2D42 had the largest count at 30°C for 24 h, while A3D42 had the largest at 45°C in MNA. The CFU/ml was slightly lower in the BC at 48 h than 24 h.

### 3.3.5 | Antagonistic activity

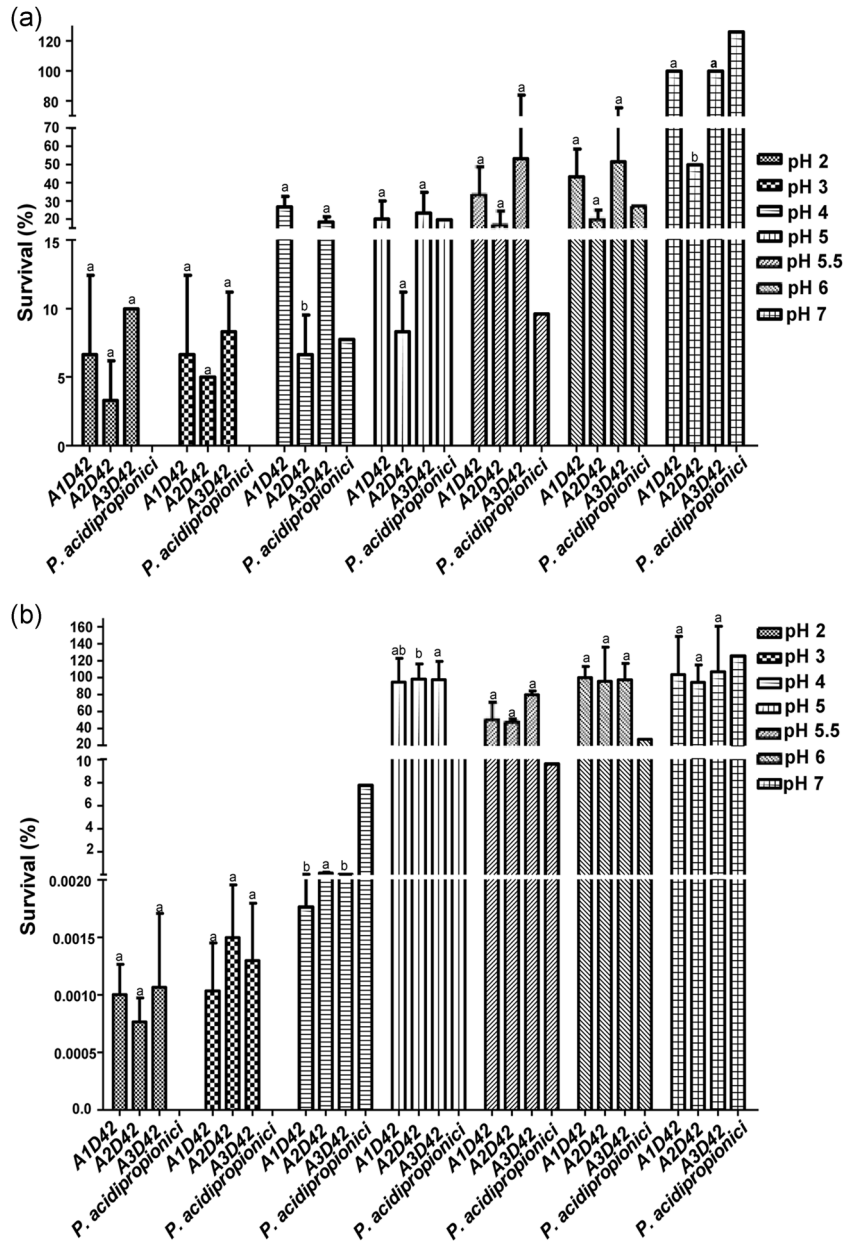
All the BC isolates showed positive inhibition against *S. typhimurium* and *E. coli* because they had a zone of inhibition bigger than 10 mm, except for A3D42 on MRS, which had no inhibition for *E. coli*, since it had an inhibition zone of 9.33 mm. Although no significant difference was shown, A1D42 in MRS had a bigger zone of inhibition for both pathogens. While A3D42 in MNA had a larger zone of inhibition for both pathogens as well (Table 5).

### 3.3.6 | Adhesion to mucus

Adhesion of BC to mucus was higher in MRS than in MNA (Figure 5). A1D42 and A2D42 in MRS had the highest adhesion in MRS ( $p < 0.05$ )



**FIGURE 3** pH survival of BC (A1D42, A2D42 and A3D42) inoculated in (a) MNA and (b) MRS broth for 24 h. Data are mean  $\pm$  SD. Values with different letters are different between bacterial consortia; Tukey–Kramer ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth

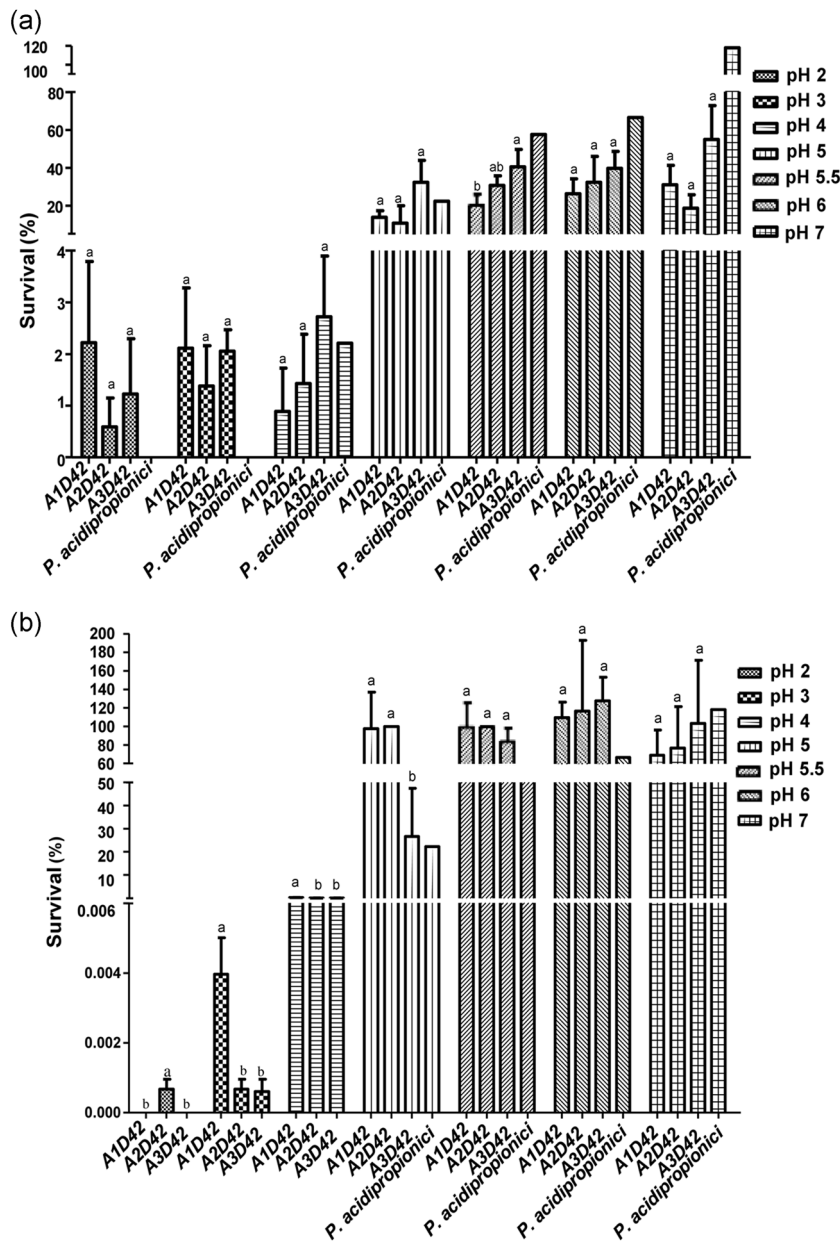


and A3D42 in MNA. A1D42 in MRS had the highest adhesion, which was even higher than the positive control (*P. acidipropionici*).

### 3.4 | Characterization of rumen microbiome of 42-day-old calves

Sequencing of the microbiome of the BC grown in MNA showed that they consist of species belonging to three phyla: Proteobacteria with the highest relative abundance (60%–95%), followed by Firmicutes (1%–31%), and Bacteroidetes with the lowest relative abundance (0%–8%). It is noteworthy that one sample (A2D42) had no Bacteroidetes, had a low relative abundance of Firmicutes (0% of Clostridia and 5% of Bacilli), and hence, had the highest relative abundance of Proteobacteria (95%). The phylum Firmicutes was represented by the

Classes Clostridia and Bacilli, Bacteroidetes had only Bacteroidia, while Proteobacteria had only Grammaproteobacteria. All BC had higher relative abundances of Clostridia (31%–24%) than Bacilli (1%, 5%, 2%), except A2D42 which had no Clostridia and had the highest relative abundance of Bacilli (5%). This BC also lacked Bacteroidia (Bacteroidetes), but most OTUs present belonged to the Class grammaproteobacteria (Proteobacteria) (95%). Moreover, the microbiomes of A1D42 and A3D42 were similar to each other (data are not shown). Regarding the order, A1D42 contained Clostridiales, Enterobacteriales and Bacteroidales with the highest relative abundances (37.6%, 36.2%, and 22.5% respectively) (Figure 6a). Also, the sample A2D42 contained 92.7% of Enterobacteriales (Figure 6a) while A3D42 had 57.1% of Enterobacteriales, 22.9% of Clostridiales and 11.4% of Bacteroidales (Figure 6a). Remarkably, the microbiomes of all samples grown in MRS were entirely composed of



**FIGURE 4** pH survival of potential BC (A1D42, A2D42 and A3D42) inoculated in (a) MNA and (b) MRS broth for 48 h. Data are mean  $\pm$  SD. Values with different letters are different between bacterial consortia; Tukey–Kramer ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth

**TABLE 4** Temperature tolerance of BC (A1D42, A2D42 and A3D42) grown on MRS and MNA broths<sup>†</sup>

BC	MRS 24 h			MNA 24 h		
	30°C	37°C	45°C	30°C	37°C	45°C
A1D42	1.92E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.52E <sup>+10a</sup>	2.10E <sup>+11</sup> $\pm$ 6.24E <sup>+10a</sup>	1.30E <sup>+11</sup> $\pm$ 1.00E <sup>+10b</sup>	1.67E <sup>+08</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+07b</sup>	5.40E <sup>+10</sup> $\pm$ 1.27E <sup>+10a</sup>	1.00E <sup>+09</sup> $\pm$ 0.00E <sup>+00b</sup>
A2D42	1.67E <sup>+11</sup> $\pm$ 6.00E <sup>+09a</sup>	2.07E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.52E <sup>+10a</sup>	1.63E <sup>+11</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+09a</sup>	1.03E <sup>+10</sup> $\pm$ 2.52E <sup>+09a</sup>	3.57E <sup>+10</sup> $\pm$ 7.02E <sup>+09a</sup>	1.33E <sup>+07</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+06b</sup>
A3D42	1.82E <sup>+11</sup> $\pm$ 9.07E <sup>+09a</sup>	2.30E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.00E <sup>+10a</sup>	1.60E <sup>+11</sup> $\pm$ 1.00E <sup>+10a</sup>	4.00E <sup>+08</sup> $\pm$ 1.00E <sup>+08b</sup>	4.47E <sup>+10</sup> $\pm$ 8.33E <sup>+09a</sup>	1.33E <sup>+10</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+09a</sup>
BC	MRS 48 h			MNA 48 h		
	30°C	37°C	45°C	30°C	37°C	45°C
A1D42	1.20E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.92E <sup>+10a</sup>	1.53E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.69E <sup>+10a</sup>	8.17E <sup>+10</sup> $\pm$ 2.65E <sup>+10a</sup>	6.33E <sup>+09</sup> $\pm$ 1.53E <sup>+09a</sup>	4.00E <sup>+10</sup> $\pm$ 1.00E <sup>+10a</sup>	1.33E <sup>+07</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+06b</sup>
A2D42	1.17E <sup>+11</sup> $\pm$ 3.16E <sup>+10a</sup>	1.77E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.56E <sup>+10a</sup>	5.67E <sup>+10</sup> $\pm$ 3.31E <sup>+10a</sup>	5.67E <sup>+09</sup> $\pm$ 1.53E <sup>+09a</sup>	5.00E <sup>+10</sup> $\pm$ 1.00E <sup>+10a</sup>	4.00E <sup>+08</sup> $\pm$ 1.00E <sup>+08a</sup>
A3D42	1.23E <sup>+11</sup> $\pm$ 4.73E <sup>+10a</sup>	1.80E <sup>+11</sup> $\pm$ 2.64E <sup>+10a</sup>	1.00E <sup>+11</sup> $\pm$ 2E <sup>+10a</sup>	4.67E <sup>+09</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+08a</sup>	4.33E <sup>+10</sup> $\pm$ 5.77E <sup>+09a</sup>	1.00E <sup>+08</sup> $\pm$ 0.00E <sup>+00b</sup>

Abbreviations: BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth.

<sup>†</sup>Data are presented as CFU/ml mean  $\pm$  standard deviation. Values with different letters are different between BC at the same temperature and time; Tukey–Kramer ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

the class Bacilli of the phylum Firmicutes (data not shown), all of which belonged to the Order Lactobacillales (Figure 6a).

### 3.5 | Relative quantification of *Lactobacilli* and *Enterobacteria*

The relative abundance of *Lactobacilli* in A3D42 in MRS was 5.64%, which was higher than in A1D42 in MRS (0.13%), whereas the relative abundance of Enterobacteriaceae was: 0.032% in A3D42 in

MRS and 0.018% in A1D42 in MRS. The Enterobacteriaceae species found were *Klebsiella oxytoca* (64%), *Klebsiella* sp (30%), and *E. coli* (5%) (data not shown).

### 3.6 | Identification of *Lactobacilli*

The presence of several species of *Lactobacilli* was assessed by PCR in BC cultured in MRS broth. All samples revealed the presence of *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, and *L. johnsonii* (Figure 6b,c).

**TABLE 5** Antagonistic activity of BC (A1D42, A2D42, and A3D42) grown on MRS and MNA broths<sup>†</sup>

BC	Zone of inhibition (mm) <sup>‡</sup>			
	MRS		MNA	
	<i>Salmonella</i> T. ATCC	<i>E. coli</i> ATCC	<i>Salmonella</i> T. ATCC	<i>E. coli</i> ATCC
A1D42	13.33 ± 0.57 <sup>a</sup>	13.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	12.0 ± 0 <sup>a</sup>	10.67 ± 2.0 <sup>a</sup>
A2D42	11.66 ± 1.15 <sup>a</sup>	11.0 ± 1.0 <sup>ab</sup>	11.67 ± 1.15 <sup>a</sup>	11.33 ± 1.15 <sup>a</sup>
A3D42	12.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	9.33 ± 0.57 <sup>b</sup>	13.0 ± 1 <sup>a</sup>	13.67 ± 1.52 <sup>a</sup>

Abbreviations: BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth.

<sup>†</sup>Data are presented as mean ± standard deviation, values with different letters are different between BC; Tukey–Kramer ( $p < 0.05$ ).

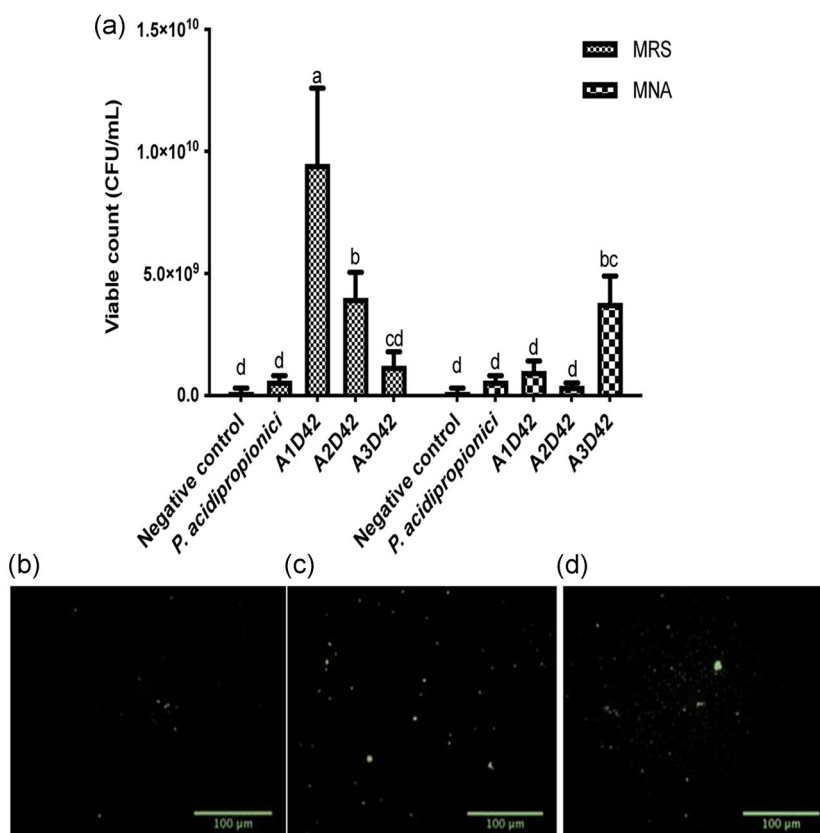
<sup>‡</sup>The antagonistic activity was considered positive when the average growth inhibition zone diameter was ≥10 mm.

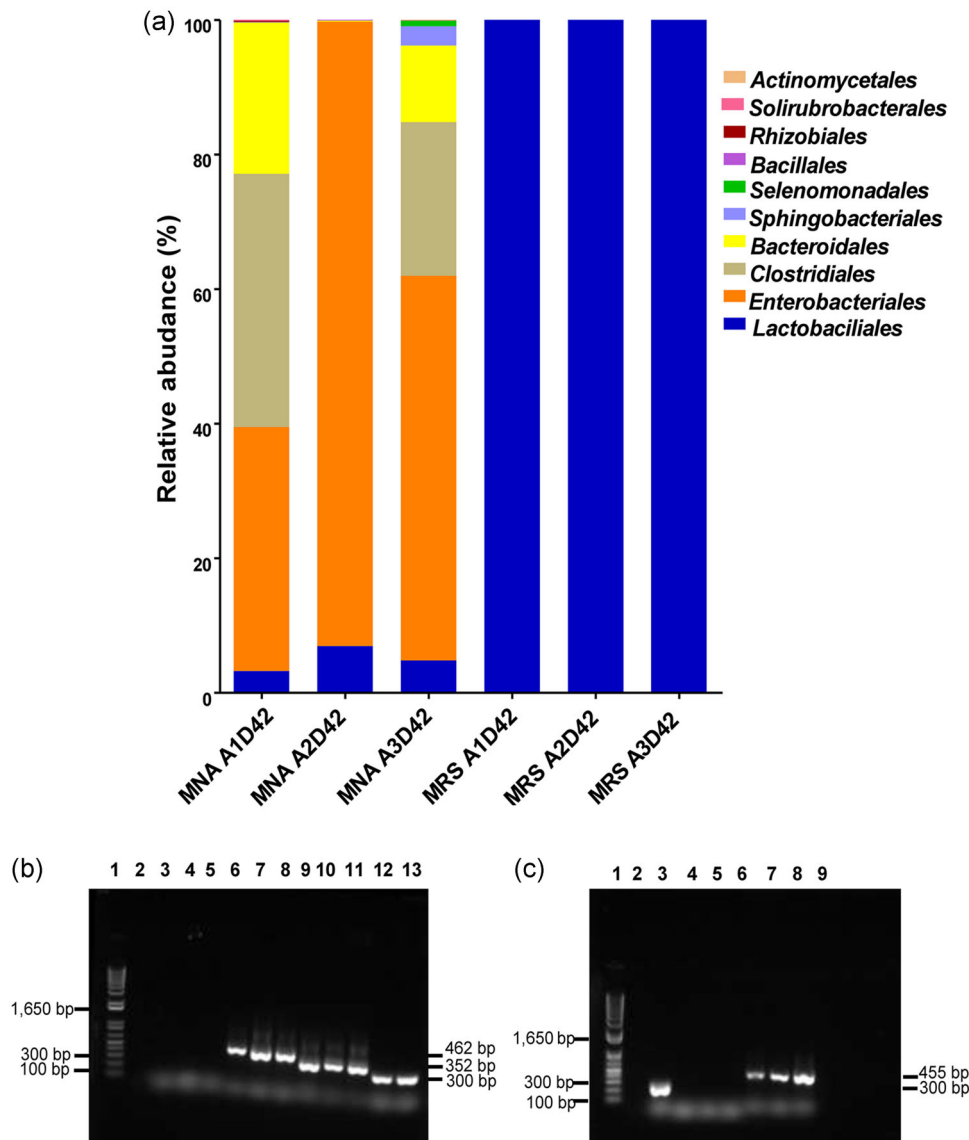
## 4 | DISCUSSION

The development of probiotics for calves as an alternative to antibiotics to improve their health and productivity has recently taken on great importance. A viable option is to isolate probiotic BC from their natural host due to their adaptation to proliferate in such environment, which increases their chances of survival and of exerting beneficial effects upon their administration to a similar host (Dowarah et al., 2018).

As in vitro analysis is an efficient means to select suitable BC with the highest potential and best probiotic properties for ruminants (Ridwan et al., 2018), we analysed cultured rumen liquid consortia from 28- and 42-day-old calves in different media and characterized them regarding various parameters. We observed robust growth of all samples in MRS broth which is highly selective for LAB bacterial isolates of the phylum

**FIGURE 5** Adhesion capacity of (a) BC (A1D42, A2D42 and A3D42) inoculated in MNA and MRS broth to intestinal mucus. Images of bacteria bound to intestinal mucus (b) negative control, (c) positive control, and (d) BC A1D42 inoculated in MRS. Each bar represents the mean of the viable count of six data sections of bound bacteria to intestinal mucus and, error bars are ±standard deviation. Strain *Propionibacterium acidipropionici* was used as a positive control for adhesion. Values with different letters are different between bacterial consortia; Tukey–Kramer ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ . BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]





**FIGURE 6** (a) Orders of rumen microbiome sequencing of BC (% relative abundance) inoculated in MRS and MNA broth. Agarose gel electrophoresis of PCR products after amplification of genomic DNA. (b) 1–1 kb Marker, 2–Negative control, 3–*Lactobacillus acidophilus* A1D42, 4–*L. acidophilus* A2D42, 5–*L. acidophilus* A3D42, 6–*Lactobacillus casei* A1D42, 7–*L. casei* A2D42, 8–*L. casei* A3D42, 9–*Lactobacillus rhamnosus* A1D42, 10–*L. rhamnosus* A2D42, 11–*L. rhamnosus* A3D42, 12–*Lactobacillus fermentum* A1D42 and 13–*L. fermentum* A2D42. (c) 1–1 kb Marker, 2–Negative control (without DNA), 3–*L. fermentum* A3D42, 4–*Lactobacillus ruminis* A1D42, 5–*L. ruminis* A2D42, 6–*L. ruminis* A3D42, 7–*Lactobacillus johnsonii* A1D42, 8–*L. johnsonii* A2D42, 9–*L. johnsonii* A3D42,  $n = 3$ . BC, bacterial consortium; MNA, nutritive medium A; MRS, Man, Rogosa and Sharpe broth [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

*Firmicutes*, such as *Lactobacilli*, common inhabitants of the rumen, and widely used as probiotics in livestock to improve the microbial balance of feed digestibility and animal's health (Food and Agriculture Organization FAO, 2016; Uyeno et al., 2015).

Antibiotic susceptibility is another important property for selecting a potential BC. Probiotics must not contribute to the spread of antibiotic resistance and should not carry transferable antibiotic resistance (Hernández-Peñaranda, 2003; Venkatasatyanarayana et al., 2017). The resistance of these organisms, however, may be intrinsic due to the absence of targets, low affinity to targets, low permeability, or to their efflux mechanisms. In some cases, however, this

resistance may be a desirable trait, as probiotics may help restore the host's intestinal homeostasis (Berebon et al., 2018; Ouwehand et al., 2016; Wong et al., 2015). We observed that the majority of BC in MNA showed more resistance than in MRS. LAB grows in MRS broth, suggesting that the LAB present in these BC in MRS may be more susceptible to antibiotics than the bacteria present in BC in MNA. LAB are reported to be susceptible to ampicillin, penicillin, chloramphenicol, ceftriaxone and novobiocin (Anandharaj & Sivasankari, 2014; Puniya et al., 2016; Rine et al., 2019) and resistant to oxacillin, vancomycin, ciprofloxacin, streptomycin, tetracycline and gentamicin (Jose et al., 2015; Rine et al., 2019).

A3D42 in MNA was resistant to the entire Gram (-) antibiotic, except to nitrofurantoin, and in MRS was susceptible to carbenicillin, cephalothin, cefotaxime, chloramphenicol and nitrofurantoin.

While A3D42 in MNA also was resistant to all the Gram (+) antibiotics, except to cefotaxime ciprofloxacin, and in A3D42 in MRS was susceptible to ampicillin, cephalothin, cefotaxime, dicloxacillin, gentamycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, penicillin and tetracycline. This resistance pattern indicates that they can also be used for the treatment and control of intestinal infections when administered with antibiotics (Kim et al., 2011). These findings also show that antibiotic resistance varies from study to study due to differences in experimental conditions like broth used. The lack of standard methods to test antibiotic susceptibility of candidate probiotic bacteria is the reason why some LAB strains reported to harbour tetracycline- or erythromycin-resistant patterns, as in our results, later turned out to be negative for the resistance tet (M) or erm (B) genes (Berebon et al., 2018; Bertel et al., 2019). This could occur because the microbial community of BC underwent different ecological succession processes in the tests carried out. This is the problem when working with BC.

The ability of the potential probiotic BC to survive intestinal bile salts and grow in the GIT is another important requirement for probiotic selection (Ehrmann et al., 2002). Exposure of probiotic bacteria to bile salts triggers alterations in cellular homeostasis leading to dissociation of the lipid bilayer and integral proteins of their cell membranes, resulting in leakage of bacterial contents and ultimately cell death. Stropfová and Lauková (2004) proposed that bile salt resistance is the second most important criterion for the colonization and metabolic activity of probiotic bacteria in the host small intestine. In the present study, all BC evaluated tolerated bile salts at 0.3%, and A3D42 had the highest survival, which could be due to its high relative abundance of LAB, that are reported to have good tolerance to bile salts at 0.3% (Yaneisy et al., 2016). Hence, these results suggest that when passing through the intestinal transit, there will be a selection of the most resistant BC strains that can survive the bile salts in the calf intestine, a desirable trait as stated above. These surviving strains will play their beneficial roles in the host if they are beneficial.

Potential probiotic BC must also tolerate the pH of the ruminant GIT environment (reticulum, rumen, omasum, abomasum, small intestine and colon), which ranges from pH 2 to 7.2, albeit it also varies with the diet (Gueimonde & Salminen, 2006; Kern et al., 1974). Our results show that all LAB in MNA survived at pH 2; although the percentage of survival was low, A3D42 had higher survival (%) at 24 h than the other LAB, but it was not significant ( $p > 0.05$ ). LAB has the property to tolerate acidic pH; a study evaluating the potential of probiotic LAB used in animals survived at acidic pH (Vizoso et al., 2006; Yaneisy et al., 2016). This could be the reason why our BCs survived at acidic pH. Although the percentage of survival of BC in MRS at pH 2, 3 and 4 was low, it increased and had the optimal development between pH 5 and pH 7.

In particular, the physiological pH range in the rumen has been reported to be between 5.5 and 6.9 (Choudhury et al., 2015). In keeping with this, all the BC we evaluated in MNA broth had the optimum development at a similar pH range of 6.5 and 7 at 24 and 48 h. This same pattern was also found in other works in which the

highest bacterial growth was shown to occur at pH close to 7 with a significant decrease at acidic pH (Ávila et al., 2010; Bertel et al., 2019; Castillo et al., 2018 and Landa-Salgado et al., 2019). Moreover, Marrero et al. (2010) evaluated different strains of bacilli and reported high growth of cellulolytic bacteria at pH at the rumen level of 6.6.

The change of temperature to 30°C and 45°C significantly affected the growth of BC in MNA broth, which could be because the rumen temperature is 38–41°C and the ideal temperature for the development of these bacteria is 37°C (Choudhury et al., 2015). On the other hand, the CFU/ml was not affected in MRS broth by the change in temperature, the optimum development was also at 37 °C, followed by 30 °C, and was lower at 45 °C. Then, it could be that all BC grown in MRS withstood GIT temperature better than in MNA. However, Bertel et al. (2019) showed that the highest growth for their rumen liquid samples occurred at 40°C. The work of Lara and Pineda (2013) showed that temperature affects growth depending on the strain, although the optimal growth temperatures were also found to lie between 37°C and 40°C. These results were expected since these microorganisms were isolated from the rumen, where the temperature is normally 40°C due to the enormous number of metabolic processes taking place (Ávila et al., 2010). Regarding the antagonistic activity of BC against *Salmonella T.* ATCC 19028 and *E. coli* ATCC 11229, A1D42 in MRS had a higher inhibition zone, and A3D42 in MNA had a bigger inhibition zone for both pathogens. This could be due to the different types of bacteria that grow in MRS and MNA present in the BC, which could be more aggressive to pathogens. *E. coli* has been reported to be sensitive to *L. casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus helveticus* (Çadirci & Çitak, 2005). Lara and Pineda (2013) and Gaitán and Pérez (2007) also reported that *Bacilli* strains inhibit the growth of *E. coli*, and Zamudio and Zavaleta (2003) reported large inhibition halos of *E. coli* and *L. monocytogenes*. Moreover, Sánchez et al. (2015) showed that LAB bacteria inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* sp. and *L. monocytogenes*. The same pattern was reflected in the study of Gámez et al. (2009) in which *L. plantarum* inhibited the growth of *E. coli*, *S. typhimurium*, *Clostridium perfringens* and *S. aureus*. The nature of the predominant inhibitory action was also related to the presence of organic acids, mostly lactic acid, which is the main product of carbohydrate catabolism and contributes to lower pH, creating a hostile environment for pathogenic microorganisms (Gámez et al., 2009; Sánchez et al., 2015), and the presence of other antimicrobial metabolites like acetic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins and bacteriocin-like substances (Juven et al., 1992).

Another important characteristic of a probiotic is its ability to promote bacterial colonization of the intestinal mucosa (Kolter & Greenberg, 2006). In general, we observed good adhesion of all BC which was higher in MRS than in MNA. A study with *Lactobacilli* spp. strains in dairy calves that reported high adhesion to mucus (Fernández et al., 2018) is consistent with our results. Moreover, Cueto-Vigil et al. (2010) showed LAB high adhesion to mucus while López and Espinoza (2017) found that *L. plantarum* can adhere and colonize intestinal cells in vitro. The ability of probiotics to reduce pathogenic microorganisms in the digestive tract may be due to the



production of bacteriocin and exclusion due to competition by adherence to the intestinal epithelium. Indeed, some strains of *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* have hydrophobic surface proteins that promote non-specific adhesion to animal cells, cover receptor binding sites and prevent pathogenic microorganisms from binding to intestinal epithelium (López & Espinoza, 2017; Molina, 2019).

Finally, the relative species abundance based on DNA sequences of potential probiotic BC showed that all of those cultured in MRS belong to the phylum *Firmicutes* and all of them to the class *Bacilli*, whereas the BC cultured in MNA broth belong mainly to the phylum *Proteobacteria* (class *Grammaproteobacteria*) (data not shown). Castillo et al. (2018) and Bertel et al. (2019), as in our study, identified *Enterococcus* and *Bacillus* in samples with the best results in the probiotic tests. Zhou et al. (2015) found that in ruminal populations the most abundant phyla always fell on *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Similarly, Tapio et al. (2017) reported that the main phylum is represented by *Firmicutes* (55.9%–86.8%) followed by *Bacteroidetes* (8%–24.4%) and *Proteobacteria* (0.9%–13.4%). Other rumen sequences, as in our study, report *Firmicutes* and *Bacteroidetes* as the phyla with the largest relative abundance in the rumen (Kim et al., 2011). The results of this study also confirmed that the species of BC grown in MRS all belong to the order *Lactobacillales*. *Lactobacilli* was more abundant in A3D42 than in A1D42, although both of them have *Enterobacteria*. *Lactobacilli* isolates from animal rumen contents have been reported to have potential use as probiotics (Neethu et al., 2015).

These results revealed that all BC tested have functional characteristics of a probiotic although some of them have higher potential.

## 5 | CONCLUSIONS

According to the results described herein, BC A1D42 and A3D42 cultured in MRS broth are good candidates to be used as probiotics in calves, which could improve their health and production. The potential found in these BC is related to their high concentration of *Lactobacilli* spp.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Sarahí Rodríguez-González gratefully acknowledges the postdoctoral scholarship from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM. We thank Diego Alfredo Cardoso Carmona for his technical assistance in the analysis of probiotics, and the technical staff of Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada LAVIS, UNAM (Luis Alberto Aguilar, Alejandro de León Cuevas, Carlos Sair Flores) for their support on the use of computational resources. We also thank Nydia Hernández-Ríos of the Confocal Microscopy Unit (INB UNAM). This work was supported by a grant from PAPIIT (IN211518)-UNAM.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## ORCID

Ofelia Mora-Izaguirre  <http://orcid.org/0000-0002-7073-7740>

## REFERENCES

- Adams, M. R., & Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 263–264. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00067-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00067-T)
- Aguilar-González, M., & Mora-Izaguirre, M. O. (2016). *Desarrollo de una celda electroquímica microbiana con bacterias propionogénicas para incrementar la concentración de propionato y disminuir la concentración de metano en líquido ruminal in vitro*. Universidad Nacional Autónoma de México, Queretaro, México. [https://repositorio.unam.mx/contenidos/desarrollo-de-una-celda-electroquimica-microbiana-con-bacterias-propionogenica-s-para-incrementar-la-concentracion-84203?c=pkRvWj%26d=false%26q=%2A%2A%26i=1%26v=1%26t=search\\_0%26as=0](https://repositorio.unam.mx/contenidos/desarrollo-de-una-celda-electroquimica-microbiana-con-bacterias-propionogenica-s-para-incrementar-la-concentracion-84203?c=pkRvWj%26d=false%26q=%2A%2A%26i=1%26v=1%26t=search_0%26as=0)
- Anandharaj, M., & Sivasankari, B. (2014). Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.015>
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, Y., & Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica*, 20, 161–170.
- Berebon, D. P., Ofokansi, K. C., Attama, A. A., Eze, C. O., Onwusoba, R. C., & Ugwoke, I. C. (2018). Preliminary studies on isolation, bile tolerance and antibiogram of potential probiotics (probiotics) from locally fermented food products at Beach Market, Nsukka Metropolis, Enugu State, Nigeria. *Biotechnology Journal International*, 22, 1–10. <https://doi.org/10.9734/bji/2018/v22i330060>
- Bertel, M. L. M., Hurtado, B. C. A., & Zumaque, O. L. (2019). Identificación de *Bacillus toyonensis* en heces de ganado cebú en el Departamento de Sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21, 12–21. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.69421>
- Bhunja, A. K., Johnson, M. C., & Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01893.x>
- Çadirci, B. H., & Çitak, S. (2005). A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, 237–241.
- Castillo, L., Betancur, A., & Pardo, E. (2018). Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29, 438–448. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14482>
- Choudhury, P. K., Salem, A. Z. M., Jena, R., Kumar, S., Singh, R., & Puniya, A. K. (2015). Rumen microbiology: An overview. In A. K. Puniya, R. Singh, & D. N. Kamra (Eds.), *Rumen microbiology: From evolution to revolution* (pp. 3–16). Springer.
- Cueto-Vigil, M. C., Acuña-Monsalve, Y., & Valenzuela-Riaño, J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades Biológicas*, 32, 129–138.
- De Gregoris T. B., Aldred N., Clare, A. S., & Burgess, J. G. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., & Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS ONE*, 13, e0192978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192978>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 966–975. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01608.x>
- Fernández, S., Fraga, M., Silveyra, E., Trombert, A. N. Rabaza, A., Pla, M., & Zunino P. (2018). Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves. *Beneficial Microbes*, 9, 613–624. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0131>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2016). In H. P. S. Makkar (Ed.). *Probiotics in animal nutrition—Production, impact and regulation by Bajagai, Y. S., Klieve, A. V. Dart, P. J. & Bryden, W. L.* FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome. <https://www.fao.org/3/i5933e/i5933e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
- Gaitán, D., & Pérez, L. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en composta generado en un cultivo de crisantemo*. (Undergraduate tesis, Pontificia Universidad Javeriana). Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8296>
- Gámez, H. J., Aguirre, D., & Ramírez, C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba*, 14, 1723–1735.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93, 783–786. <https://doi.org/10.1079/BJN20051428>
- Gueimonde, M., & Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38, S242–S247. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60003-6)
- Hernández-Peñaranda, A. (2003). *Microbiología industrial*. EUNED. <https://editorial.uned.ac.cr/book/U03142>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 444S–450S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.444s>
- Jose, N. M., Bunt, C. R., & Hussain, A. M. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3, 198–212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>
- Juven, B. J. F., Schved F., & Lindner P. (1992). Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*, 55, 157–161.
- Kern, D. L., Slyter, L. L., Leffel, E. C., Weaver, J. M., & Oltjen, R. R. (1974). Ponies vs. steers: Microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. *Journal of Animal Science*, 38, 559–564. <https://doi.org/10.2527/jas1974.383559x>
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, 49–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x>
- Kolter, R., & Greenberg, E. P. (2006). Microbial sciences: The superficial life of microbes. *Nature*, 441, 300–302. <https://doi.org/10.1038/441300a>
- Landa-Salgado, P., Caballero-Cervantes, Y., Ramírez-Bribiesca, E., Hernández-Anguiano, A. M., Ramírez-Hernández, L. M., Espinosa-Victoria, D., & Hernández-Sánchez, D. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10, 68–83. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4512>
- Lara, C., & Pineda, A. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista colombiana de biotecnología*, 15, 8–16.
- Liang, G., Malmuthuge, N., Bao, H., Stothard, P., Griebel, P. J., & Guan le L. (2016). Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system development in the small intestine of neonatal calves. *BMC Genomics*, 17, 602. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2957-y>
- Liang, G., Malmuthuge, N., McFadden, T. B., Bao, H., Griebel, P. J., Stothard, P., & Guan, le L. (2014). Potential regulatory role of microRNAs in the development of bovine gastrointestinal tract during early life. *PLoS ONE*, 28, e92592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092592>
- López, A., & Espinoza, E. (2017). *Evaluación del Efecto Probiótico (Pruebas de viabilidad y antagonismo in vitro) del L. Plantarum en queso crema de cabra* (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química). <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/22132>
- Marrero, Y., Martín, E., Rodríguez, D., & Galindo, J. (2010). Efecto de la inclusión de fracciones del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal in vitro de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44, 161–168.
- Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 30, 601–611. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>
- Neethu, M. J., Craig, R. B., & Malik, A. H. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of *Lactobacilli* isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3, 198–212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Diario Oficial de la Federación, 22 de Agosto de. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)
- Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, Ü., Şen, I., Gündüz, I. K., Birdane, M. F., & Güzelbekteş, H. (2009). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56, 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01156.x>
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 336, 489–493. <https://doi.org/10.1126/science.1219328>
- Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A., & Stahl, B. (2016). Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine*, 48, 246–255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
- Pineiro, M., & Stanton, C. (2007). Probiotic bacteria: legislative framework—Requirements to evidence basis. *The Journal of Nutrition*, 137, 850S–853S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.850S>
- Puniya, M., Ravinder, K. M., Panwar, H., Kumar, N., & Ramneek, R. (2016). Screening of lactic acid bacteria of different origin for their probiotic potential. *Journal of Food Processing & Technology*, 7, 545. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.011>
- Ridwan, R., Ariga, B. W., Dwi, A. W., Rohmatussolihat R., Fitri, S. N., Fidriyanto, R., Jayanegara, A., Wijayanti, I., & Widyastuti, Y. (2018). The use of lactic acid bacteria as ruminant probiotic candidates based on *in vitro* rumen fermentation characteristics. *Buletin Peternakan*, 42, 31–36. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v42i1.23317>
- Rine, C. R., Pravas, C. R., Shovon, L. S., Rubaayet-UI, A., & Iqbal, K. J. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19, 253. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>

- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1166–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>
- Rosmini, M., Sequeira, G., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., & Bonazza, J. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3, 181–191.
- Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M., & Ferreira, C. D. L. (2015). Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Revista de Salud Animal*, 37, 94–104. <https://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa04215.pdf>
- Signorini, M. L., Soto, L. P., Zbrun, M. V., Sequeira, G. J., Rosmini, M. R., & Frizzo, L. S. (2012). Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Research in Veterinary Science*, 93, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.001>
- Strompfová, V., & Lauková, A. (2004). Antibiotic resistance of acid lactic bacteria from canine faeces. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 48, 215–218.
- Suzuki, M. T., Beja, O., Taylor, L. T., & DeLong, E. F. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 4605–4614. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000>
- Takahashi, H., Saito, R., Miya, S., Tanaka, Y., Miyamura, N., Kuda, T., & Kimura, B. (2017). Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of Enterobacteriaceae. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.015>
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F., & Wallace, R. J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>
- Uyeno, Y., Shigemori, S., & Shimosato, T. (2015). Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, 30, 126–132. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14176>
- Vélez, M. P., Petrova, M. I., Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Claes, I., Lambrichts, I., Tynkkynen, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Characterization of Maba, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 386–398. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00680.x>
- Venkatasatyanarayana, N., Vishwanathan, S., & Kadirvelu, J. (2017). Molecular characterization of antimicrobial *Lactobacillus* isolates and evaluation of their probiotic characteristics in vitro for use in poultry. *Food Biotechnology*, 31, 20–41. <https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1269289>
- Ventura, B. A., Von Keyserlingk, M. A. G., Schuppli, C. A., & Weary, D. M. (2013). Views on contentious practices in dairy farming: The case of early cow-calf separation. *Journal of Dairy Science*, 96, 6105–6116. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6040>
- Vizoso, P., Franz, M. G., Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2006). *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029>
- Weimer, P. J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 6, 296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00296>
- Wong, A., Saint Ngu, D. Y., Dan, L., Ooi, A., & Lim, R. L. (2015). Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. *Nutrition Journal*, 14, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0084-2>
- Yaneisy, G. H., Tania, P. S., Ramón, B., José, L., Balcázar, J. R., Nicolí, J. M. S., Moreira-Silva, J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O., Albelo, N., & Halaihel, N. (2016). Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*, 108, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.009>
- Yen, J. C., Chang, F. J., & Chang, S. (1995). A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE Transactions on Image Processing*, 4, 370–378. <https://doi.org/10.1109/83.366472>
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36, 808–812. <https://doi.org/10.2144/04365ST04>
- Zamudio, K., & Zavaleta, A. (2003). Estudio del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Revista Ciencia e Investigación*, 6, 30–35.
- Zhou, M., Chen, Y., & Guan, L. (2015). Rumen Bacteria. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, 6, 79–95. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3\\_24](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_24)

**How to cite this article:** Rodríguez-González, S., González-Dávalos, L., Robles-Rodríguez, C., Lozano-Flores, C., Varela-Echavarría, A., Shimada, A., & Mora-Izguirre, O. (2023). Isolation of bacterial consortia with probiotic potential from the rumen of tropical calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 107, 62–76. <https://doi.org/10.1111/jpn.13699>