

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA SOBRE LA  
ABUNDANCIA DE BACTERIAS DE LA MICROBIOTA IMPLICADAS CON LA  
HOMEOSTASIS INTESTINAL EN RATONES BALB/c SOMETIDOS A ESTRÉS”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Daniel Efrain Molotla Torres

2192800438

COMITÉ TUTORIAL

Cotutor: Dra. Maria Elisa Drago Serrano

Cotutor: Dr. José Félix Aguirre Garrido

Asesor: Dr. Alberto Ortega Vázquez

Enero 2022


EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA SOBRE LA  
ABUNDANCIA DE BACTERIAS DE LA MICROBIOTA IMPLICADAS CON LA  
HOMEOSTASIS INTESTINAL EN RATONES BALB/c SOMETIDOS A ESTRÉS

COMITÉ TUTORAL


Cotutor: Dra. María Elisa Drago Serrano

  
Vo.Bo.

Cotutor: Dr. José Félix Aguirre Garrido

  
Vo.Bo.

Asesor: Dr. Alberto Ortega Vázquez

  
Vo.Bo.

  
Daniel Efrain Molotla Torres  
2192800438

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LACTOFERRINA BOVINA SOBRE LA  
ABUNDANCIA DE BACTERIAS DE LA MICROBIOTA IMPLICADAS CON LA  
HOMEOSTASIS INTESTINAL EN RATONES BALB/c SOMETIDOS A ESTRÉS

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO


Presidente: Dra. Marycarmen Godínez Victoria

  
Vo.Bo.

Vocal: Dra. Fabiola Guzmán Mejía

  
Vo.Bo.

Secretario: Dr. José Félix Aguirre Garrido

  
Vo.Bo.

## RESUMEN

**Introducción.** La microbiota tiene un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal pero puede ser perturbada por el estrés. El estrés altera la colonización y proliferación normal de la microbiota (disbiosis) que conlleva a inflamación y daño tisular. La lactoferrina bovina (bLf) es una glucoproteína que estimula o inhibe la proliferación de algunos componentes de la microbiota intestinal, pero en condiciones de estrés se desconoce su efecto. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la bLf sobre la microbiota intestinal de ratones estresados. **Métodos.** Ratones BALB/c hembra de 7 semanas de edad (n=12), fueron tratados oralmente por 7 días con bLf al 0.1 %. Del 4° al 7° día de tratamiento, un grupo se estresó por inmovilización 2 h/día (Str bLf n=6) y otro grupo no se estresó (bLf n=6). Como controles se incluyeron 2 grupos de ratones sin tratamiento con estrés (Str n=6) y sin estrés (Ctrl n=6). Al final del periodo de estrés (7° día), se recolectaron las heces y se disecó el colon para cultivar aerobios en caldo tioglicolato, en agar TSA y lactobacilos en medio MRS; así como, para la extracción del DNA para la secuenciación masiva de la región V4-V5 del gen 16S rRNA. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de Kruskal Wallis o ANOVA y las pruebas post hoc para estimar las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) **Resultados.** En comparación con el grupo Ctrl sin estrés, la cuenta bacteriana de aerobios en heces, aumentó significativamente en el grupo Str bLf y en colon del grupo bLf. La secuenciación masiva en heces señaló que en relación al grupo Ctrl, hubo un aumento de la abundancia relativa de los taxones: *Bacteroides*, *Parasutterella* y *Sutterellaceae* en el grupo bLf y de los taxones *Baernesella*, *Parasutterella* y *Sutterellaceae* en el grupo Str bLf, así como una disminución en los taxones *Rikenella*, *Ruminococcaceae* y *Clostridiales* en el grupo bLf, con respecto al grupo Ctrl. **Conclusión.** Los datos sugieren que tanto el estrés como la bLf, favorecen la proliferación de aerobios en heces y colon e inducen el aumento o la reducción de la abundancia relativa en heces de algunos componentes de la microbiota.

## ABSTRACT

**Introduction.** The microbiota plays a critical role in maintaining intestinal homeostasis but can be disturbed by stress. Stress alters the normal colonization and proliferation of the microbiota (dysbiosis) leading to inflammation and tissue damage. Bovine lactoferrin (bLf) is a glycoprotein that stimulates or inhibits the proliferation of some components of the intestinal microbiota, but its effect under stress conditions is unknown. **Aim.** To evaluate the effect of bLf on the gut microbiota of stressed mice. **Methods.** 7-week-old female BALB / c mice (n = 12) were treated orally for 7 days with 0.1% bLf. From the 4th to the 7th day of treatment, one group was stressed by immobilization 2 h / day (Str bLf n = 6) and another group was not stressed (bLf n = 6). Two groups of mice without stress treatment (Str n = 6) and without stress (Ctrl n = 6) were included as controls. At the end of the stress period (7th day), the feces were collected and the colon was dissected to culture aerobes in thioglycollate broth, on TSA agar and lactobacilli in MRS medium; as well as, for DNA extraction for massive sequencing of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene. For the statistical analysis, the Kruskal Wallis test or ANOVA and the post hoc tests were applied to estimate the significant differences ( $p < 0.05$ ). **Results.** In comparison with the Ctrl group without stress, the bacterial count of aerobes in stool increased significantly in the Str bLf group and in the colon of the bLf group. The massive sequencing in feces indicated that in relation to the Ctrl group, there was an increase in the relative abundance of the taxa: *Bacteroides*, *Parasutterella* and *Sutterellaceae* in the bLf group and of the *Baernesella*, *Parasutterella* and *Sutterellaceae* taxa in the Str bLf group, as well as a decrease in the taxa *Rikenella*, *Ruminococcaceae* and *Clostridiales* in the bLf group, with respect to the Ctrl group. **Conclusion.** The data suggested that both stress and bLf favor the proliferation of aerobes in feces and colon and induce an increase or decrease in the relative abundance in feces of some components of the microbiota.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco a mi honorable casa de estudio, la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco (UAM Xochimilco) y a su excelente personal académico por su estímulo, apoyo y motivación durante mi desarrollo profesional.

Mi reconocimiento y gratitud al Dr. Martin Gómez Hernández, coordinador de la Maestría y Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, a la Dra. María Angélica Gutiérrez Nava de la comisión académica de la Maestría y Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, al Dr. Juan Esteban Barranco Florido, jefe del Departamento de Sistemas Biológicos y a la Dra. Yvonne M. Heuze de Icaza, responsable de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Bioterio), por haberme brindado las facilidades esenciales para desarrollar el trabajo experimental de mi tesis dentro de las condiciones limitantes y restrictivas de la contingencia causada por la pandemia COVID 2020.

Doy las gracias al Dr. José Félix Aguirre Garrido del Departamento de Ciencias Ambientales de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Lerma por haberme provisto el espacio, recursos, asesoría metodológica y técnica necesarios para llevar a cabo el análisis metagenómico incluido dentro de los objetivos de mi tesis.

Mi gratitud a la Dra. Maria Elisa Drago Serrano, del Departamento de Sistemas Biológicos por brindarme los recursos económicos, así como el apoyo metodológico y técnico a fin de realizar los cultivos microbiológicos incluidos en los objetivos del proyecto de mi tesis.

Mi reconocimiento al Dr. Alberto Ortega Vázquez del Departamento de Sistemas Biológicos por su apoyo metodológico y asesoría durante la elaboración de la tesis. Finalmente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme los recursos económicos para solventar mi estancia en el posgrado (No. Beca No. 754671)

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi tutor, Dr. Félix Aguirre Garrido, por su valioso y constante asesoramiento, sin su conocimiento y tutoría no hubiera sido posible lograr este proyecto con la misma calidad. A mi tutora, Dra. Maria Elisa Drago Serrano, por su apoyo constante, paciencia, acompañamiento y perseverancia durante todo el posgrado, sus consejos siempre fueron útiles para mi crecimiento profesional. A mi asesor, Dr. Alberto Ortega Vázquez, por sus consejos y experiencia que me aportó para solucionar problemas que no podía visualizar. A mis sinodales, Dra. Marycarmen Godínez Victoria y Dra. Fabiola Guzmán Mejía por su valiosas críticas y comentarios durante su desempeño como sinodales del examen de grado

A mis docentes y compañeros de la UAM-Xochimilco que me acompañaron e instruyeron para forjar emprendimiento. A los compañeros del laboratorio de microbiología y biotecnología ambiental de la UAM Lerma que me ayudaron en muchas ocasiones durante mi estancia en Lerma.

A mis padres que siempre me alentaron a perseguir mis ideales con su apoyo y afecto incondicional.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
MARCO DE REFERENCIA .....	10
MARCO TEÓRICO.....	14
Microbiota intestinal.....	14
Estudio de la microbiota intestinal: Cultivos bacterianos y análisis molecular.....	16
Gen 16S rRNA.....	17
Secuenciación masiva del gen 16S rRNA.....	17
Análisis basado en OTUs.....	18
Estrés .....	20
Lactoferrina bovina .....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	28
OBJETIVOS PARTICULARES .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Animales y condiciones ambientales de alojamiento.....	29
Preparación y administración de lactoferrina bovina al 0.1%.....	29
Modelo de estrés por inmovilización sobre tablero .....	30
Recolección de muestras de heces y colon.....	31
Cultivo y conteo de UFCs en agar TSA y MRS .....	31
Secuenciación masiva de la región V4-V5 del gen 16S rRNA.....	32
Extracción de DNA metagenómico de las comunidades microbianas .....	32
Electroforesis en gel agarosa al 1% p/v.....	33
Amplificación del gen 16S rRNA.....	33
Confirmación de la ampliación del gen 16S rRNA.....	34
Análisis bioinformático.....	35
Reducción de errores de secuenciación.....	35
Análisis basado en OTUs.....	35
Análisis de diversidad beta.....	36
Análisis estadístico para el estudio microbiológico y molecular.....	36
Cuenta bacteriana de lactobacilos y aerobios en heces .....	38
Cuenta bacteriana de lactobacilos en colon .....	39



Cuenta bacteriana de aerobios en colon .....	39
Resumen de resultados de UFC/g .....	40
Diversidad y estructura de las comunidades bacterianas .....	41
Índices de diversidad alfa .....	41
Análisis de componente principal .....	43
Abundancia relativa de comunidades bacterianas.....	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	53
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS .....	59
ANEXOS .....	73
1) Material y reactivos .....	73
2) Equipo.....	73
3) Protocolo de extracción de mgDNA (kits).....	73
4) Concentración y pureza del mgDNA secuenciado.....	74
5) Gel de las muestras de mgDNA secuenciado.....	75
6) Primers para amplificar el gen 16S rRNA.....	75
7) Curva de rarefacción.....	76
8) Gráficos de Krona de bacterias identificadas en las muestras de heces .....	77
9) Presentación de avances en el Congreso COIFFA-2020.....	83

## INTRODUCCIÓN

El estrés se define como la respuesta del sistema nervioso central (SNC) a los estímulos ambientales percibidos como una amenaza para la supervivencia (Dhabhar, 2009). Algunos estudios experimentales revelan la comunicación bilateral entre el SNC y el intestino a través de vías neuroendocrinas del eje intestino cerebro mejor conocido “*Gut Brain Axis*” (Campos *et al.*, 2013). El estrés afecta diferencialmente al tracto intestinal debido a su regionalización estructural, funcional, inmunológica y neuroendocrina. En términos de regionalización, la abundancia de la microbiota y del *mucus* aumenta de la región proximal a la distal del intestino delgado y alcanzan su máximo nivel en el colon (Bowcutt *et al.*, 2014). La microbiota y el *mucus* tienen un papel clave en la homeostasis intestinal al contribuir a la función de la barrera intestinal (Cornick *et al.*, 2015); esta última, se refiere a la capacidad del epitelio intestinal de permitir o bloquear el transporte de moléculas inocuas o agentes nocivos, respectivamente (Cornick *et al.*, 2015). Algunas bacterias como *Akkermansia muciniphila* degradan el *mucus*; los lactobacilos y bifidobacterias liberan “*short-chain fatty acids*” (SCFA) usados como fuentes de energía para las células del epitelio intestinal (Zhai *et al.*, 2018); otras bacterias conocidas como *segmented filamentous bacteria* (SFB), favorecen la generación de la inmunoglobulina A (IgA) con un papel en la defensa contra bacterias y en la homeostasis (Fransen *et al.*, 2015). La lactoferrina bovina (bLf) es una glucoproteína multifuncional de unión a iones férricos ( $Fe^{3+}$ ) que favorece o reduce la proliferación de algunos componentes de la microbiota intestinal (Baker & Baker, 2009; Vega *et al.*, 2019). Debido a su actividad moduladora sobre los componentes de la microbiota, estudios experimentales están evaluando la capacidad de la bLf para contrarrestar las alteraciones causadas por el estrés sobre la homeostasis intestinal. Este abordaje podría aportar conocimiento sobre futuras estrategias que puedan prevenir alteraciones en la microbiota que conlleven a potenciales disfunciones inflamatorias en el tracto intestinal, como lo es incluida la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Honneffer *et al.*, 2014), síndrome metabólico (Ley *et al.*, 2006), cáncer colorectal (Nakatsu *et al.*, 2015), entre otras.

Las evidencias aportadas por nuestro grupo de trabajo basadas en el modelo murino por inmovilización en tablero, muestran que el estrés redujo la concentración de mucopolisacáridos en colon y dicho efecto fue contrarrestado por la bLf administrada por vía oral (**Vega et al., 2019 Symposium**). Sin embargo, el efecto del estrés sobre la cuenta de lactobacilos y aerobios fecales en ratones tratados con bLf es poco clara (**Sánchez et al., 2019**). Con base en lo anterior, en este proyecto evaluamos el efecto modulador de la bLf sobre los componentes de la microbiota mencionados anteriormente. Para lograr lo anterior se trabajó con ratones sometidos a estrés y tratados con bLf con el fin de evaluar la abundancia y diversidad de bacterias relacionadas con la homeostasis intestinal (*Akkermansia muciniphila*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* y SFB). Estas últimas se evaluaron por medio de conteo en placa de muestras de heces y colon y por secuenciación masiva del gen 16S rRNA en muestras de heces.

## MARCO DE REFERENCIA

Estudios en modelos de experimentación se han enfocado en evaluar el efecto del estrés o de la bLf sobre la proliferación de componentes de la microbiota mediante el uso de cultivos, análisis molecular a base del ensayo PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o la secuenciación de regiones variables del gen 16S rRNA (**Tabla 1**). Estudios previos en ratas Wistar sometidas a estrés crónico por inmovilización (2 h/4 días), observaron una disminución de la cuenta bacteriana de lactobacilos y bifidobacterias en colon (**Svishcheva et al., 2020**); así mismo, en ratas Wistar con inmovilización (15 a 60 min), el estrés agudo redujo el tránsito intestinal en colon e intestino delgado (**Muraoka et al., 1998**) en tanto que en ratas Sprague Dawley bajo inmovilización (3 h/21 días), el estrés crónico modificó la abundancia de filos, familias y géneros (**Tabla 1**) (**Zhu et al., 2019**). En otros estudios en ratas Sprague Dawley bajo restricción de movimiento se observó que el estrés aumento la diversidad filogenética y la generación de ácido aspártico, lactato, ornitina y N-acetilglucosamina en ratas adolescentes respecto a las ratas adolescentes y adultas sin estrés y ratas adultas con estrés (**Tabla 1**) (**Xu et al., 2020**).

En un estudio experimental en ratones C57BL/6 bajo restricción de movimiento 12 h/2 días, se demostró que el estrés incrementó la abundancia de los filos *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* y redujo *Firmicutes* (Han *et al.*, 2019); en este mismo modelo por restricción de movimiento en ratones C57BL/6 (2 h/10 días) el estrés modificó la abundancia de filos, familias y géneros como se muestra en la **Tabla 1** (Jang *et al.*, 2018); aplicando el mismo modelo, el estrés por restricción de movimiento (2 h/7 días) aumentó la abundancia de las familias descritas en la **Tabla 1** (Rengarajan *et al.*, 2020).

En relación a la bLf, el análisis metagenómico en heces de ratas con y sin disbiosis causada por antibióticos, mostró que la bLf tuvo un impacto significativo en la estructura de la microbiota (Wen *et al.*, 2017). Por último, la administración de bLf al 5% adicionada en leche incrementó la proliferación fecal de la familia *Enterobacteriaceae* en ratones BALB/c de 4 semanas (Teraguchi *et al.*, 1993).

Los estudios antes descritos, son los antecedentes directos de este trabajo que se enfocó a evaluar el efecto de la bLf sobre la microbiota en condiciones de estrés que a la fecha se desconoce. Es importante recalcar que la originalidad de este trabajo radica en que por vez primera explora el impacto modulador de la bLf sobre la microbiota en condiciones de estrés. Lo anterior podría ser útil para reducir o reemplazar el uso de antibióticos prescritos convencionalmente para el control de disbiosis causada por el estrés.

**Tabla 1. Efecto del estrés crónico y de la lactoferrina bovina, sobre la microbiota intestinal en roedores.**

<b>Modelo de estrés</b>	<b>Hallazgos</b>	<b>Referencia</b>
Estrés por inmovilización en cajas de plástico herméticas 2 h/14 días ratas Wistar.	↓UFC/g lactobacilos y bifidobacterias en colon.	<b>Svishcheva et al., 2020</b>
Análisis qPCR en ratones C57BL/c machos con restricción de movimiento 12 h/2 días	↑ <i>Bacteroidetes</i> y <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Firmicutes</i>	<b>Han et al., 2019</b>
Secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA de muestras fecales en ratones C57BL/c machos con restricción movimiento 2 h/10 días.	( <i>Phylum</i> )↑ <i>Proteobacteria</i> , ↓ <i>Bacteroidetes</i> ; ( <i>Family</i> )↑ <i>Helicobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , ↓ <i>Lactobacillus</i> ; ( <i>genus</i> ) ↑ <i>Klebsiella</i> <i>Helicobacter</i> En cultivos ↑ <i>Escherichia coli</i> y ↓ <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacteria</i>	<b>Jang et al., 2018</b>
Secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA de muestras fecales en ratones C57BL/6J SPF sometidos a estrés por restricción de movimiento 2h/7d.	↑ <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Burkordeliaceae</i> , ↓ <i>Clostridiaceae</i> , <i>Corynebacteriaceae</i> y <i>Ruminococaceae</i>	<b>Rengarajan et al., 2020</b>
Caracterización del metaboloma y secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA en muestras fecales de ratas macho Sprague Dawley con restricción de movimiento 1 h/44 día postnatal (PD) ( <i>S groups adolescence</i> ) y 1h/64 PD ( <i>L groups adulthood</i> )	Con relación a los S-no Str, L-no Str y L-Str, en el grupo S-str↑diversidad filogenética de acuerdo al análisis de Faith En el grupo S-Str ↑ácido aspártico, lactato, ornitina y N-acetilglucosamina	<b>Xu et al., 2020</b>
Secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA de muestras fecales en ratas macho Sprague Dawley con inmovilización 3h/21 d	(nivel <i>Phylum</i> )↑ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Firmicutes</i> (nivel <i>Genus</i> ) ↑ <i>Alloprevotella</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Desulfovibrio</i> , ↓ <i>Ruminiclostridium</i> , <i>Ruminococaceae</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Anaerotruncus</i>	<b>Zhu et al., 2019</b>

Administración de bLf	Hallazgos	Referencia
Metagenómica fecal en ratas con y sin disbiosis causada por antibióticos con y sin bLf	Ratas sin disbiosis: ↑ perfil citocinas Th1 Ratas con bLf: ↑(genus) <i>Lactobacillus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Barnesiella</i> , <i>Clostridium</i> , y <i>Oscillibacter</i> ; ↑(specie) <i>Lactobacillus animalis</i> , <i>Prevotella copri</i> , <i>Barnesiella intestinihominis</i> (a 19 y/o 33 días) En relación las ratas sin bLf las ratas con disbiosis con bLf: ↑ (nivel genus) <i>Prevotella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Barnesiella</i> , <i>Akkermansia</i> ; ↑(specie) <i>Prevotella copri</i> , <i>Lactobacillus animalis</i> , <i>Barnesiella intestinihominis</i> y <i>Akkermansia muciniphila</i> (a 19 y/o 33 días).	<b>Wen et al., 2017</b>
Ratones hembra BALB/c de 4 semanas de edad, alimentados con leche o leche suplementada con bLf 5% durante 30 días.	↓ <i>Enterobacteriaceae</i> en heces de ratones alimentados con leche bovina suplementada con bLf.	<b>Teraguchi et al., 1993</b>

↓ disminución; ↑ aumento; ↔ sin cambios.

## MARCO TEÓRICO

### Microbiota intestinal

La microbiota es una comunidad de billones de microorganismos que habitan en el intestino, su composición y diversidad aumenta de la región proximal hacia la distal del intestino delgado y alcanza su máximo nivel en el colon (**Mowat et al., 2014**). Lo anterior obedece a que el metabolismo de los colonocitos genera una atmósfera anoxigénica que favorece la proliferación de bacterias anaerobias (**Litvak et al., 2018**). La microbiota puede afectar algunos componentes de la barrera intestinal como el *mucus* y la inmunoglobulina A (IgA).

El *mucus* es una matriz gelatinosa secretada por las células calciformes que recubre la superficie de la monocapa de las células epiteliales del intestino (**Sicard et al., 2017**). El *mucus* consiste en glucoproteínas de alto peso molecular llamadas mucinas formadas por proteínas centrales con forma de hilo unidas a cadenas de oligosacáridos (**Bansil & Turner, 2006**). En el *mucus* se secretan péptidos antimicrobianos y anticuerpos como la inmunoglobulina A secretora (SIgA) (**McGuckin et al., 2011**). El *mucus* tiene un papel antiinflamatorio al reducir y/o evitar el contacto directo de la microbiota con la superficie del epitelio intestinal, además de permitir la entrada de componentes inocuos e impedir el ingreso de moléculas tóxicas y patógenos al medio interno (**Cornick et al., 2015**). La microbiota puede interactuar con el epitelio a través de receptores de membrana que contribuyen en la defensa innata del hospedero, por ejemplo, los receptores tipo toll (TLRs) involucrados en la respuesta inflamatoria (**Grondin et al., 2020**).

El *mucus* y la microbiota establecen una relación de beneficio mutuo, debido a que el *mucus* es rico en mucinas que sirven como fuente de energía para algunos comensales de la microbiota, en tanto que algunos otros, liberan metabolitos que contribuyen a reforzar la integridad funcional y estructural del *mucus*. Algunas bacterias de la microbiota intestinal poseen la capacidad de degradar la mucina debido que producen glucosidasas, las especies más representativas son: *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides fragilis* y *Ruminococcus gnavus*, entre otras (**Sicard et al., 2017**).

Ciertos componentes de la microbiota intestinal como las bifidobacterias y los lactobacilos tienen la capacidad de utilizar como fuente de energía carbohidratos complejos y fibra dietética para generar SCFA (*short chain fatty acids*), el ácido butírico, ácido acético, ácido propiónico y ácido valérico, son algunos de ellos (**Schwartz et al., 2010**). La abundancia y proporción de estos metabolitos es influenciada por el tipo y cantidad de fibra consumida por el hospedador (**Birkeland et al., 2020; Bunešová et al., 2016**), sin embargo, depende principalmente de la prevalencia de ciertos grupos bacterianos (**Schwartz et al., 2010**), por ejemplo, los géneros *Bacteroides* y *Prevotella* son productores de ácido propiónico, los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* grupo *XIVa* y *IVa*, son productores de ácido butírico (**Castillo & Marzo, 2015**) y las especies *Bifidobacterium spp*, *Blautia hydrogentrophica*, *Prevotella spp* y *Streptococcus spp*, son productoras de ácido acético (**Markowiak & Śliżewska, 2020**), entre otros. Los SCFA cumplen con múltiples funciones benéficas para el hospedador, en particular el ácido butírico, el cual es una de las principales fuentes de energía para los colonocitos (**Hemalatha et al., 2017**), también mejora la respuesta inmunitaria ante estímulos antigénicos (**Sun et al., 2017**). Mediante los efectos anteriores, el ácido butírico colabora en la función de la barrera epitelial, lo cual ayuda a mantener la integridad intestinal y prevenir la translocación de moléculas proinflamatorias (**Chambers et al., 2018**). Además de las familias *Bifidobacteriaceae* y *Lactobacillaceae*, hay otras familias y géneros menos estudiados, asociados a la producción de SCFA, como lo son las familias *Lachnospiraceae* (**Quraishi et al., 2017**), y *Ruminococcaceae*, y los géneros *Bacteroides*, *Fecalibacterium* y *Blautia* (**Birkeland et al., 2020**).

La IgA es un anticuerpo de la respuesta adaptativa de defensa que forma parte de la barrera intestinal (**Wells et al., 2017**). La IgA lleva a cabo un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen la capacidad de aglutinación y eliminación luminal de patógenos, la neutralización de toxinas y virus, y la tolerancia antigénica, siendo un anticuerpo eminentemente anti-inflamatorio (**Li et al., 2020**). En condiciones de inflamación, aumenta significativamente el recubrimiento de la microbiota con IgA (**Pietrzak et al., 2020**). Al formar complejos IgA-bacteria, la IgA



atenúa la capacidad de la microbiota para interactuar y activar la respuesta inmune innata y adaptativa, por ende, tiene un efecto antiinflamatorio (**Liu et al., 2020**). En la microbiota, las bacterias filamentosas segmentadas (SFB) estimulan la producción de inmunoglobulina A secretora (SIgA) (**Chen et al., 2018**).

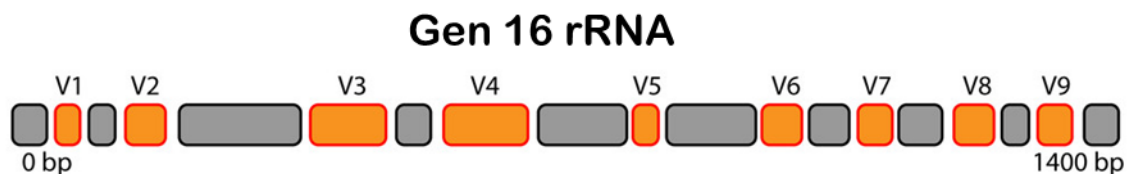
### **Estudio de la microbiota intestinal: Cultivos bacterianos y análisis molecular**

Desde hace ya más de 130 años se llevan a cabo estudios de microorganismos basados en cultivos, teniendo una referencia de más de 1000 especies distintas que se han aislado del tracto gastrointestinal humano (**Rajilić & de Vos, 2014**). Los cultivos microbiológicos tienen como principal ventaja que permiten estudiar la estructura y morfología de las colonias cultivadas, sus características bioquímicas y metabólicas, y facilitan la caracterización de compuestos bioactivos microbianos (**Plovier et al., 2016**). La gran desventaja de los cultivos microbiológicos, es que solo un 35% al 65% de las especies microbianas, son cultivables como lo demuestra el análisis molecular del gen 16S rRNA (**Lagkouvardos et al., 2017**).

Con la llegada de los métodos independientes de cultivo basados en DNA, los investigadores recibieron una herramienta fundamental para el análisis de la composición taxonómica y metagenómica (**Hiergeist et al., 2015**). El análisis de la microbiota intestinal basado en técnicas moleculares permite la caracterización de microorganismos no cultivables (**Clavel et al., 2017**). Para comprender mejor la estructura de la microbiota intestinal, se emplea el análisis de la región variable de las secuencias del gen 16S rRNA como la herramienta más empleada para este tipo de estudios (**Ibal et al., 2019**). La secuencia dicho gen, proporciona información muy útil para la identificación y clasificación de formas de vida procariotas, debido a que todos estos microorganismos poseen dicho gen y su estructura presenta regiones conservadas y variables (**Coenye et al., 2003**).

## Gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA consiste de aproximadamente 1500 pb que incluyen regiones conservadas esenciales para el funcionamiento del rRNA. El gen 16S rRNA contiene 9 regiones variables de menor relevancia funcional, pero de gran importancia en los análisis moleculares **Figura 1**. Las regiones variables pueden tener diferencias o similitudes entre distintas especies bacterianas y esta es la cualidad que se aprovecha para identificar o diferenciar entre especies (**Takayasu et al., 2019**).



**Figura 1** Estructura del gen 16S rRNA y sus regiones variables, tomada y modificada de **Angell et al. (2020)**.

Con el análisis de las regiones variables del gen 16S rRNA se pueden establecer relaciones taxonómicas entre cepas procariontas hasta con una similitud del 98.65% (**Kim & Chun, 2014**); dicho análisis de secuencias aporta valores numéricos de similitudes que pueden usarse como límites de circunscripción para taxones (**Roselló & Amann, 2001**).

Es ampliamente aceptado que el análisis de las secuencias de las regiones variables del gen 16S rRNA proporciona un marco estable y satisfactorio para la clasificación de procariontas, desafortunadamente, la capacidad de resolución de dicha técnica es insuficiente para garantizar una delimitación correcta de las especies bacterianas, siendo el género la categoría taxonómica más específica que se puede delimitar (**Fox et al., 1992; Fadeev et al., 2021**).

## Secuenciación masiva del gen 16S rRNA

Los ensayos de secuenciación masiva suelen realizarse mediante plataformas de nueva generación, como *Ion Torrent* e *Illumina*, sin embargo, la plataforma *Illumina*

brinda una menor tasa de error promedio por 100 bases (0.9/100) que Ion *Torrent* (1.5/100) (**Onyvera et al., 2020**).

La secuenciación con la tecnología de *Illumina* mediante el sistema *MiSeq* se puede resumir en 4 pasos esenciales descritos en la sección “Soporte técnico” de la página oficial (illumina.com) y consisten en:

i) Preparación de bibliotecas: Se amplifica el gen 16S rRNA y se realiza una cuantificación de la aportación genómica para realizar la fragmentación y la adhesión de adaptadores. Posteriormente se realiza una cuantificación de las bibliotecas finales, con base en los adaptadores empleados.

ii) Generación de grupos: se produce en la celda de flujo, en donde cada fragmento de una biblioteca se amplifica en miles de copias idénticas, para esto las bibliotecas se hibridan en la celda de flujo, se amplifican y se forman los grupos.

iii) Secuenciación: la tecnología de secuenciación de *Illumina* se llama secuenciación por síntesis (SBS), en donde se añaden nucleótidos marcados con fluorescencia que polimerizan la cadena de los grupos, de esta manera cada una de las bases emite una intensidad de longitud de onda identificable.

iv) Análisis de datos: primero el análisis principal en tiempo real da como resultado imágenes e intensidades de onda, lo cual se traduce a las secuencias de nucleótidos obtenidas. El análisis secundario consta en realizar alineaciones y detección de variantes indeseables, mediante diferentes tipos de software bioinformáticos adicionales.

### **Análisis basado en OTUs**

Los estudios de secuenciación de nueva generación del 16S rRNA permiten estimar la composición, diversidad y riqueza de las comunidades microbianas mediante el análisis de secuencias basadas en sus similitudes mejor conocidas como “OTUs” por sus siglas en inglés (*Operative Taxonomic Units*) (**Chen et al., 2013**). En el análisis basado en OTUs es necesario procesar conjuntos de datos de secuenciación a gran escala, con una serie de algoritmos para clasificar las secuencias en agrupaciones jerárquicas. Estas últimas, permiten la posterior asignación de las categorías del primer al último nivel taxonómico correspondientes

a: Dominio, Reino, Filo o División, Clase, Orden, Familia, Género y Especie (**Schloss et al., 2009**). Para el análisis de las comunidades microbianas se aplica el software MOTHUR; con este paquete es factible recortar, trazar y alinear secuencias, calcular distancias, asignar secuencias a OTUs y describir la diversidad alfa y beta (**Schloss et al., 2009**). A fin de comparar el número de especies entre comunidades, es necesario rarificar el conjunto de secuencias obtenidas, ya que no siempre el tamaño de las muestras es igual (**Monge & Moreno, 2001**). La rarefacción se refiere al proceso de generación de la relación entre el número de especies, Variantes de Secuencia de Amplicones (ASVs), OTUs, etc., contra el número de secuencias; lo anterior permite visualizar que se ha alcanzado la suficiente profundidad en la secuenciación para identificar aquellos taxones minoritarios en una muestra (**Hernández et al., 2020**).

La diversidad alfa se refiere al número de especies que conviven en un hábitat homogéneo (**Sonco et al., 2013**), también se relaciona con las interacciones poblacionales, dando como resultado una perspectiva sobre la competición, dominancia e inmigración de otras localidades (**Llorente & Morrone, 2001**). La diversidad alfa se puede estudiar con el índice de diversidad Shannon-Weiner, índice de dominancia Simpson e índice de riqueza Chao. El uso de cada uno de ellos depende de las variables que se pretenden analizar, como el número de especies, índice de riqueza específica, o índices de abundancia entre todas las especies (para equidad) (**Moreno et al., 2011**).

La medida de diversidad Sobs, representa la riqueza de especies observadas en el número de secuencias (**Jan & Wolfgang, 2010**). El índice de Simpson es un índice de dominancia y representa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar pertenezcan a la misma especie (**López et al., 2017**). El índice de Simpson puede tomar valores que van de 0 a 1, entre más cercano a 1 indica una mayor dominancia y menor biodiversidad (**Sonco, 2013**). Es importante señalar que el inverso del índice de Simpson funciona mejor para comparar grupos en términos de diversidad biológica; un valor alto del inverso de Simpson indica mayor biodiversidad, es decir,

menor dominancia en tanto que, un valor bajo del inverso de Simpson indica menor biodiversidad y por ende mayor dominancia (**Kozich et al., 2013**).

El índice Shannon es uno de los más empleados para determinar diversidad de especies en un determinado hábitat (**Mostacedo & Fredericksen, 2000**). Un valor del índice de Shannon cercano a cero, indica muy poca diversidad de especies, un valor entre 2 y 3 señala una diversidad normal y mayor a 3 denota una gran diversidad (**Sonco, 2013**).

El índice Chao se usa para estimar riqueza mediante un análisis no paramétrico (**Bo-Ra et al., 2017**). El índice de Chao considera la abundancia de las OTUs en las muestras; cuanto mayor sea el índice Chao, mayor será la riqueza esperada de especies de la microbiota (**Li et al., 2018**).

La diversidad beta ha sido conceptualizada por distintos autores y de acuerdo a la definición de **Sugg (1996)** “Es el recambio de especies en una región heterogénea” en tanto que **MARN (2002)** la define como “Una medida del recambio de especies entre diferentes tipos de comunidades o hábitats”. La diversidad beta, mide entonces, el grado de reemplazamiento de especies a través de gradientes ambientales (**Sonco et al., 2013**). Por medio de los análisis de diversidad beta se puede estudiar la diferencia entre comunidades microbianas de diferentes entornos, mediante el análisis de los perfiles de abundancia taxonómica de diferentes muestras.

Con todo lo anterior descrito, fue factible analizar los resultados de la secuenciación masiva de la región V4-V5 de gen 16S rRNA en las muestras heces de ratones tratados con bLf sometidos a estrés.

## **Estrés**

El estrés se refiere a la captación sensorial y cognitiva de un estímulo ambiental (estresor), percibida como una señal de alarma por el sistema nervioso central (percepción) que, a su vez, desencadena una reacción fisiológica de lucha y huida (respuesta) en el organismo (**Dhabhar, 2009**). De acuerdo con la frecuencia, el estrés puede ser agudo o crónico. En el estrés agudo ocurre un único evento de

exposición al estrés en tanto que el estrés crónico consiste en eventos repetidos de exposición. La duración a la exposición del estresor en el estrés agudo puede ser de minutos, horas y en el estrés crónico puede ser de días. La intensidad del estrés se mide en términos cuantitativos mediante la estimación de parámetros neuroendocrinos, como hormonas de estrés (glucocorticoides y catecolaminas), neurotransmisores y valores fisiológicos, como el ritmo cardiaco (**Dhabhar, 2009**).

El estrés ejerce sus efectos mediante la activación de vías neuroendocrinas del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y los componentes del Sistema Nervioso Autónomo como el Sistema Nervioso Simpático, Sistema Nervioso Parasimpático y Sistema Nervioso Entérico (**de Jonge et al., 2013; Eskandari et al., 2003**). Los nervios del sistema autónomo (extrínsecos) interaccionan con los nervios del sistema nervioso entérico (intrínsecos) para formar el denominado eje cerebro-intestino (**de Jonge et al., 2013; Eskandari et al., 2003**).

Estudios basados en modelos de estrés en ratas y ratones como animales de experimentación, han permitido analizar con detalle el impacto del estrés sobre la composición y proliferación de la microbiota intestinal. Como se aprecia en la **Tabla 2**, los efectos más relevantes del estrés son: disbiosis, inflamación, daño tisular y pérdida de la diversidad microbiana, que en última instancia resulta en la pérdida de la homeostasis intestinal.

**Tabla 2.** Impacto del estrés sobre la microbiota intestinal en ratones y ratas

<b>Modelo animal</b>	<b>Hallazgo</b>	<b>Referencia</b>
WAS 1 hora (h)/7 días (d) en ratones C57BL/6 tratados con antibióticos.	↑ cort, ↑ disbiosis ↑ adherencia luminal bacteriana ↑ <i>Clostridium</i> spp ↓ <i>Verrucobacteria</i>	<b>Aguilera et al., 2013</b>
sCSDS 10 d en ratones.	↓ IgA cecal, correlación entre IgA cecal y sCSDS, ↑ disbiosis en ciego.	<b>Aoki et al., 2016</b>
NEC en camadas de ratones hembra neonatos de madres sometidas a estrés prenatal.	↓ IgA fecal, ↑ IgA unida a microbiota ↑ disbiosis ↑ daño tisular	<b>Brawner et al., 2020</b>
Estrés por separación materna en ratas neonatas 3 h/d por 35 d (PND 35).	↓ mucina intestinal ↑ disbiosis	<b>García et al., 2006</b>
Estrés por Inmovilización en tablero 2h/4d en ratones BALB/c macho de 8 semanas.	↑ bacterias aerobias fecales	<b>Machorro et al., 2019</b>
WAS 1h/10 d en ratas ws/ws deficientes de células cebadas y ratas silvestres +/- (wild type (wt)) control.	Ratas wt ↑ cort, ↑ adherencia bacteriana y penetración de bacterias dentro de enterocitos. Estos efectos no fueron observados en ratas ws/ws	<b>Söderholm et al., 2002</b>
WAS 1h/d o 1h/5d por 12 semanas en Ratones deficientes de cadena α del receptor de linfocitos T (Tcra <sup>-/-</sup> knock out (ko)).	↑ IgA contra microbiota ↓ diversidad de microbiota, ↑ colitis ↑ disbiosis solo en ratones Tcra <sup>-/-</sup> ko C57BL/6 no en Tcra <sup>-/-</sup> ko BALB/c	<b>Watanabe et al., 2016</b>

↓ disminución; ↑ aumento; ↔ sin cambios; estrés por evitación de agua (*Water avoidance stress*): WAS; Libres de patógenos específicos (*Specific pathogen free*): SPF; Día postnatal 35 (*Postnatal day 35*): PND35; Enterocolitis necrosante (*Necrotizing Enterocolitis*): NEC; estrés subcrónico por interacción social (*subchronic defeat stress*): sCSDS; *heath-shock protein 70* (proteína de choque térmico 70): HSP70

Los modelos antes descritos son referentes experimentales del impacto del estrés sobre la susceptibilidad de algunas enfermedades de importancia clínica como inflamación intestinal, como ocurre con IBS (*Intestinal Bowel Syndrome*) e IBD (*Intestinal Bowel Disease*) (**Sun et al., 2019**).

Como se describe brevemente en la **Tabla 2**, en la investigación realizada por **Machorro et al. (2019)**, se evaluaron los efectos del estrés por inmovilización en tablero durante 2h/4d en ratones BALB/c hembras. Los hallazgos indican que el estrés favoreció el incremento de bacterias aerobias fecales, indujo la expresión de mRNA de las citocinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en la mucosa colónica, y redujo el número de células caliciformes. En consecuencia, podría disminuir el grosor de la capa de *mucus*, aumentando el contacto entre las bacterias lumbinales y la superficie epitelial (**Kim & Khan, 2013**). Lo anterior podría tener asociación con el incremento de bacterias degradadoras de mucus o con la disminución de comensales que contribuyen a la homeostasis intestinal.

Con base a lo anterior, a fin de reducir o controlar las afectaciones del estrés sobre la homeostasis intestinal, se ha evaluado el efecto de la bLf sobre la modulación intestinal en condiciones de estrés como se describe a continuación.

### **Lactoferrina bovina**

La lactoferrina es una glucoproteína de unión al hierro de 80 kDa de masa molecular, perteneciente a la familia de las transferrinas, es producida y liberada por las células epiteliales de la mucosa y los neutrófilos en varias especies de mamíferos, incluidos humanos y bovinos (**Giansanti et al., 2016**). La bLf se encuentra en la leche y el calostro bovino en una concentración de 7 g/L y es la segunda proteína más abundante en ella después de las caseínas (**Conneely, 2001**). La bLf participa en el transporte de Fe<sup>3+</sup> mediante la formación de complejos metálicos, por lo tanto, la podemos encontrar en su forma saturada (holobLf) e insaturada (apobLf) (**Majka et al., 2020**). Posee un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (**Rodríguez et al., 2005**), el cual cumple mediante distintos mecanismos, algunos de ellos son:

En su forma insaturada (apobLf): 1) Captura los iones Fe<sup>3+</sup>, los cuales son indispensables para la proliferación bacteriana. 2) Interacciona con moléculas estructurales de la membrana bacteriana, dando como resultado la pérdida de



permeabilidad selectiva y la subsecuente lisis celular. 3) Interfiere con las señales bacterianas para la formación de biopelículas (**León et al., 2009**).

En ambas formas (holobLf) y (apobLf): 1) Actividad bactericida de un fragmento producto de la degradación de la bLf mediante pepsinas presentes en el tracto digestivo (**Bellamy et al., 1992**). 2) Actúa en sinergismo con la IgA y lisozimas en la respuesta inmunológica (**León et al., 2006; Arciniega et al., 2016**).

A pesar de que la bLf posee una gran diversidad de mecanismos bactericidas, algunos microorganismos patógenos y comensales de la microbiota intestinal poseen mecanismos no sólo para evadir la lisis celular, sino para beneficiarse de la misma bLf, asimilando el hierro de la holobLf. Es por eso que la bLf presenta un efecto dual en el incremento y disminución de la proliferación de distintos microorganismos (**León et al., 2009**).

Estudios en modelos animales y estudios en voluntarios humanos, muestran que la bLf es capaz de regular la proliferación de algunos componentes de la microbiota intestinal, como se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Impacto de la lactoferrina sobre la microbiota intestinal**

<b>Modelo animal</b>	<b>Hallazgo</b>	<b>Referencia</b>
Metagenómica fecal en voluntarios humanos tratados con dos dosis de 200 o 600 mg Inferrin™ (bLf microcápsulas de gel).	Inferrin ↑ <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Euryarcheota</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Nitrospirae</i>	<b>Dix &amp; Wright, 2018</b>
Modelo de enfermedad EHEC 0157:H7 en ratones C57/BL6 machos 6 sem, tratados vía oral con bLfcin bovina.	bLfcin ↓ crecimiento cecal de bacteriodes causado por EHEC ↓ índice infiltración inflamatoria	<b>Haiwen et al., 2019</b>
Modelo murino de colitis ulcerativa causado por DSS tratados por vía oral con LL-LFCA).	LL-LFCA ↓ disbiosis ↓ índice infiltración inflamatoria ↓ pérdida de peso corporal	<b>Song et al., 2019</b>
Ratones machos C57BL/6J obesos tratados 12 sem por vía oral con bLf (100 mg/kg).	bLf ↓ obesidad, ↓ aparente de enterobacterias fecales ↑ lactobacilos fecales	<b>Sun et al., 2016</b>
Ratones BALB/c hembras de 4 semanas tratados oralmente con leche bovina adicionada con bLf o con bLfh.	↑ bifidobacterias fecales	<b>Teraguchi et al., 1995</b>
Modelo murino de colitis ulcerativa causado por DSS tratados por vía oral bLf.	bLf indujo: ↓ disbiosis ↓ índice infiltración inflamatoria ↓ pérdida de peso corporal	<b>Wang et al., 2021</b>

↓ disminución; ↑ aumento; ↔ sin cambios Lactoferricina bovina (bovine lactoferricina): bLfcin; *Lactococcus lactics* secretora de lactoferricina-lactoferrampina: LL-LFCA; sulfato sódico de dextran (*dextran sulfate sodium*): DSS; tabletas con capa entérica formuladas con lactoferrina bovina (100 mg tableta) y *Lactobacillus brevis* (6x10<sup>9</sup> UFC/tableta) inactivadas por calentamiento: bLf-L; hidrolizado de bLf con por pepsina: bLfh.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente se reconoce que el estrés ejerce efectos sobre la microbiota intestinal, generando disbiosis, como se ha demostrado en pacientes y modelos animales de experimentación. La disbiosis de la microbiota intestinal ha sido asociada tanto a la generación como al agravamiento de diversas enfermedades a nivel local (en el propio intestino), como a nivel sistémico (sistema cardiovascular, endócrino y sistema nervioso central), condicionando enfermedades como la EII, cáncer, obesidad, diabetes, hipertensión, depresión y esquizofrenia, entre otras innumerables patologías que actualmente se han convertido en serios problemas de salud a nivel nacional e internacional.

Por lo anterior, es de suma importancia contar con estrategias terapéuticas que permitan mantener una homeostasis intestinal.

El tratamiento en algunos casos requiere de antibióticos para controlar dichas alteraciones, sin embargo, esto a su vez causa una serie de efectos adversos sobre la microbiota. Por lo anterior se están proponiendo estrategias para reducir el consumo de antibióticos mediante la aplicación de agentes inmunomoduladores como la bLf. Esta última es una glucoproteína con propiedades sobre componentes de la inmunidad intestinal y la microbiota y por ende podría proveer beneficios para la homeostasis intestinal, lo que nos permite establecer la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la bLf sobre la abundancia y diversidad de bacterias de la microbiota en ratones sometidos a estrés?

## **HIPÓTESIS**

La lactoferrina bovina administrada *ad libitum* a ratones BALB/c sometidos a estrés, tendrá un efecto tanto positivo como negativo sobre la abundancia y diversidad de bacterias de la microbiota intestinal.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto modulador de la lactoferrina bovina, sobre la abundancia de bacterias de la microbiota implicadas con la homeostasis intestinal en ratones BALB/c sometidos a estrés.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la cuenta de lactobacilos y aerobios totales en heces y colon de ratones BALB/c control y tratados con lactoferrina, sometidos a estrés, mediante la cuenta bacteriana en placa.
2. Evaluar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas asociadas con degradación de *mucus* (*Akkermansia*) mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA.
3. Evaluar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas asociadas con generación de SCFA (*Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae*) mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA.
4. Evaluar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas asociadas con la generación de IgA (*Clostridaceae*) mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y condiciones ambientales de alojamiento**

Se emplearon ratones hembra de la cepa singénica BALB/c de 6 semanas de edad, los cuales fueron brindados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la UAM-Xochimilco. Se realizaron dos ensayos y para cada uno de ellos se dispusieron 12 ratones divididos en 2 grupos de 6 por jaula y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura a 20°C, humedad relativa de 55% y ciclo de luz/oscuridad 12/12 h con la luz encendida de 7:00 am a 7:00 pm. Los ratones fueron provistos con alimento comercial (*Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet Saint Louis, MO, USA*) y agua a libre demanda durante el periodo de adaptación (2 semanas) antes de los ensayos, los cuales se realizaron durante la octava semana de vida. Las intervenciones experimentales se llevaron a cabo de 9:00 am a 1:00 pm, para atenuar la influencia del ciclo circadiano sobre fluctuaciones de la hormona de estrés ACTH. Este protocolo (No. 176) fue aprobado el 15 de marzo de 2017, con vigencia de cinco años por el Comité Interno para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio CICUAL UAM-Xochimilco (DCBS.CICUAL.007.17). El manejo de los ratones se apegó a los procedimientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-1999, Secretaría de Agricultura, México, siguiendo las consideraciones éticas para el manejo de animales de laboratorio.

### **Preparación y administración de lactoferrina bovina al 0.1%**

Se empleó bLf con 12% de saturación de hierro, a partir de la cual, se preparó una solución al 10% p/v empleando como disolvente agua del bioterio previamente esterilizada en autoclave. Por otra parte, la bLf también fue previamente esterilizada con un filtro de membrana de 0.45 µm. Se prepararon soluciones en el mismo diluyente de bLf al 0.1% p/v que se envasaron en bebederos previamente esterilizados en autoclave. Para el ensayo experimental los ratones fueron provistos con bLf al 0.1% p/v durante 7 días consecutivos *ad libitum*, desde el viernes de la semana 7 hasta el jueves de la semana 8 de vida. El grupo control fue provisto con agua envasada en el bebedero en condiciones estériles.

### **Modelo de estrés por inmovilización sobre tablero**

El modelo de estrés por inmovilización (**Figura 2**) se llevó a cabo sobre un tablero de poliestireno de 20 x 25 cm forrado con plástico adherente (para facilitar su limpieza) de acuerdo a lo siguiente. Los ratones se colocaron en posición prona (boca abajo), luego se estiraron suavemente las extremidades y se colocó cinta de baja adhesividad directamente sobre la piel (patas delanteras y cola) y sobre los cojinetes (patas traseras). La cinta de baja adhesividad se aplicó con el fin de reducir lesiones en el momento de retirarla y sobre la cual se colocó cinta de mayor adherencia para reforzar la inmovilización. El orden de inmovilización fue: 1) patas delanteras 2) patas traseras 3) cola. Se colocó una “mordedera” de cartón sobre las patas delanteras para evitar que los ratones se autolesionen y al finalizar el periodo de inmovilización, se retiraron las cintas en el orden inverso al de fijación.



**Figura 2** Se muestra el modelo de estrés por inmovilización sobre tablero, siguiendo con todas las consideraciones éticas para el manejo de animales.

Este protocolo de inmovilización se aplicó 2 horas diarias durante 4 días seguidos (del lunes al jueves de la semana 8 de vida). Los grupos control fueron mantenidos sin agua ni alimento durante las 2 horas que duró el protocolo de estrés. En la **Tabla 4** se muestran los grupos experimentales del ensayo de estrés y los grupos control, cada uno con n=6 ratones.

**Tabla 4** Se muestran las condiciones de los 4 grupos experimentales, en donde n=6 por grupo

	Sin estrés	Con estrés
Agua	Ctrl	Str
bLf 0.1% p/v	bLf	Str bLf

### **Recolección de muestras de heces y colon**

Una vez concluido el ensayo y antes de la eutanasia se recolectaron las muestras de heces de cada ratón, utilizando pinzas desinfectadas con etanol al 70%. Posteriormente se procedió a la eutanasia con isoflurano y se tomó un segmento de 2 cm de colon por cada ratón. Para el cultivo bacteriano, las heces y el colon se colocaron en tubos estériles de 2 mL previamente pesados con 500 µL de caldo tioglicolato estéril. Para el ensayo de secuenciación masiva, las muestras se colocaron en tubos estériles vacíos. Todas las muestras se mantuvieron en hielo y se determinó su peso antes de ser congeladas a -20°C.

### **Cultivo y conteo de UFCs en agar TSA y MRS**

Las muestras de heces y colon para conteo (almacenadas en caldo tioglicolato) se cultivaron para realizar la cuenta bacteriana de lactobacilos en agar MRS y de aerobios totales en agar tripticaseína de soya (TSA). El procedimiento empleado fue el siguiente: 1) maceración de la muestra con ayuda de un homogeneizador estéril. 2) preparación de las diluciones 10x de las muestras de heces (sin diluir,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ) y colon (sin diluir,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ), empleando caldo tioglicolato como diluyente. 3) siembra de las muestras por estría cruzada en los medios MRS y TSA. 4) incubación a 36°C de las placas TSA durante 24h en condiciones de aerobiosis y del agar MRS durante 48h en condiciones anaeróbicas mediante el sistema GasPak BD *EZ ANAEROBE CONTAINER SYSTEM SACHETS-260678*. 5) conteo de las colonias y cuantificación de las UFC/g mediante la siguiente ecuación.

$$\text{UFC/g} = \frac{(\text{UFC/mL})(\text{Factor de dilución})}{(\text{g de muestra})(\text{mL sembrados})}$$



Los datos se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias por cada gramo de muestra (UFC/g) (**Da silva et al., 2013**)

### **Secuenciación masiva de la región V4-V5 del gen 16S rRNA**

Para la secuenciación masiva se siguieron los siguientes pasos consecutivos: 1) extracción de DNA metagenómico bacteriano (mgDNA), 2) electroforesis del mgDNA en gel de agarosa al 1% p/v, 3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del mgDNA del gen 16S ribosomal bacteriano, 4) electroforesis de amplicones 16S en gel de agarosa al 1% p/v, 5) secuenciación masiva *Illumina*.

### **Extracción de DNA metagenómico de las comunidades microbianas**

La extracción de DNA metagenómico de las muestras de colon se realizó con el kit *ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep* y para las heces con el kit *DNeasy® PowerSoil*. El procedimiento para la extracción de mgDNA fue el siguiente. 1) Las muestras de heces y colon se transfirieron a los tubos *bead beating*, en condiciones de esterilidad. 2) Para las muestras de colon, el tejido se abrió con ayuda de un bisturí en condiciones de esterilidad, esto con la finalidad de exponer el interior del colon y mejorar la extracción del mgDNA. 3) Las muestras se procesaron conforme al protocolo de extracción correspondiente para heces y colon, el cual se puede encontrar en el **Anexo 3**.

Posterior a la extracción se evaluó la concentración y pureza del mgDNA mediante la determinación de la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 230, 260 y 280 nm. Se aplicaron las siguientes relaciones: 260/230 para impurezas de solventes y 260/280 para impurezas de proteínas para cada una de las muestras a secuenciar (**Lucena et al., 2016**), cuyos valores se pueden encontrar en el **Anexo 4**. Los valores óptimos de pureza para el DNA genómico resultado de las relaciones 260/280 y 260/230 de un DNA puro son de 1.8-2.0 y 2.0-2.2 respectivamente (**Lucena et al., 2016**).

### Electroforesis en gel agarosa al 1% p/v

La integridad del material genético se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v como lo describe **Lee et al., (2012)** y con las siguientes condiciones; buffer TAE a pH 8 y un voltaje de 100 V durante 35 minutos. Se empleó el marcador de peso molecular *Hin dIII-digested bacteriophage lambda DNA* (**New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.**) y tras concluir la corrida, el gel se tiñó con Gelred (**GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in DMSO**) al 10% durante 40 minutos. Posteriormente, el gel se visualizó en un fotodocumentador para verificar la integridad de las bandas del material genético (**Anexo 5**).

### Amplificación del gen 16S rRNA

La PCR se realizó con los oligonucleótidos 27F y 1492R (**Anexo 6**), los cuales, son cebadores universales que abarcan casi toda la longitud del gen 16S rRNA con un amplicón esperado de 1465 pb (**dos Santos et al., 2019**). La mezcla de reacción (mix) se preparó en el PCR Chamber con los reactivos y volúmenes indicados en la **Tabla 5**. Es importante mencionar que la PCR del gen 16S rRNA se realizó para cada una de las muestras, con la única finalidad de asegurar que el material genético extraído era apto para el ensayo de secuenciación masiva.

**Tabla 5** Reactivos y cantidades para la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA.

Reactivo	Cantidad (µL)
H <sub>2</sub> O MQ (libre de DNasa)	14.8
Taq buffer	2.5
MgCl <sub>2</sub>	3.5
27F (10 µM)	1
1492R (10 µM)	1
dNTP	1
Polimerasa	0.2
mgDNA	1
Total= 25 µL	

Las muestras se colocaron en tubos de 0.2mL los cuales se sometieron a un spin para eliminar las burbujas antes de colocarlas en el termociclador. Las condiciones del programa para la amplificación del gen 16S se presentan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6** Consideraciones de amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA.

<b>Paso</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	35
Hibridación	1	55	
Elongación	1	72	
Elongación final	5	72	1

### **Confirmación de la ampliación del gen 16S rRNA**

Una vez concluido el programa, las muestras se conservaron a 4°C en el termociclador hasta el momento de ser cargadas en el gel de agarosa, para posteriormente realizar otra electroforesis en las mismas condiciones que el procedimiento anterior “**electroforesis en gel agarosa al 1% p/v**”, pero el marcador de peso molecular empleado fue *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (© 2018 *Thermo Fisher Scientific Inc.*). Por último, se verificó la presencia de las bandas del gen 16S rRNA de 1465 pb.

### **Secuenciación *illumina* de las regiones V4-V5 del gen 16S rRNA**

Se seleccionaron las 32 muestras de mgDNA (16 de heces y 16 de colon) de mayor calidad (**Anexo 4**) y se almacenaron en una placa de 96 pozos de 0.2 mL, posteriormente, se enviaron al *Integrated Microbiome Resource* (IMR) (**Room 5-D Tupper Medical Building 5850 College Street Dalhousie University**) para la realización del ensayo de secuenciación masiva. Dicha empresa envió los datos crudos para realizar el análisis bioinformático.

### **Análisis bioinformático**

Se empleó el software MOTHUR (**Schloss et al., 2009**) empleando el SOP (procedimiento operativo estándar) de *Illumina MiSeq* (**Kozich et al., 2013**). El procedimiento se resume en los siguientes pasos.

### **Reducción de errores de secuenciación**

1) Combinar todos los conjuntos de lecturas por cada muestra y después combinar todos los datos de las muestras 2) alinear todas las secuencias 3) remover secuencias ambiguas y superiores a 275 pb 4) fusionar todas las secuencias duplicadas para reducir el número de secuencias 5) alinear las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia 6) pre-agrupar las secuencias permitiendo hasta 2 bases de diferencia, 7) detección y remoción de secuencias quiméricas mediante el programa VSEARCH (**Rognes et al., 2016**) 8) Remoción de secuencias indeseables (18S rRNA, 16S rRNA de Archaea, cloroplastos y mitocondrias).

### **Análisis basado en OTUs**

Para clasificar y evaluar la abundancia relativa de las entidades bacterianas, se analizaron las secuencias mediante Unidades Taxonómicas Operativas mejor conocidas como “OTUs” por sus siglas en inglés. Así mismo, se determinó la composición de las comunidades bacterianas con el clasificador Bayesiano *RDP Trainset* (**Wang et al., 2007**). Este clasificador se aplicó para hacer una correlación de la biodiversidad de poblaciones de la microbiota de los grupos Ctrl, Str, bLf y Str bLf. Con base en las OTUs se evaluó la riqueza y diversidad de las especies presentes en las muestras de heces, considerando el análisis de la diversidad alfa, diversidad beta y la curva de rarefacción (ver **anexo 7**).

El procedimiento empleado para el análisis basado en OTUs se resume en los siguientes pasos: 1) agrupación de secuencias en OTUs, 2) cuantificación de secuencias por cada OTU, 3) asignación de taxones a las OTUs, 4) elaboración de curvas de rarefacción por cada muestra (**Anexo 7**), 5) elaboración de la tabla de índices de diversidad alfa como se muestra en la sección de resultados (**Tabla 9**).

### **Análisis de diversidad beta**

Para el análisis de la diversidad beta se empleó el software STAMP (**Parks et al., 2014**) con el cual, se hizo un análisis estadístico de los perfiles taxonómicos y funcionales mediante un ANOVA con un intervalo de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ) para determinar la abundancia relativa de secuencias, y con un análisis de componentes principales, por medio de la elaboración de una matriz de coeficientes de correlación. Dicho software proporcionó las gráficas de la beta diversidad para evaluar el efecto del estrés y la bLf sobre la abundancia y diversidad de bacterias de la microbiota intestinal. Las gráficas apiladas de abundancia relativa se obtuvieron mediante el programa Excel a partir del archivo *stability.groups.ave-std* generado en MOTHUR.

### **Análisis estadístico para el estudio microbiológico y molecular**

Se trabajaron 4 grupos, cada uno con 6 ratones, por ende, el número total de muestras analizadas fue de 24 de heces y 24 de colon. Considerando que el experimento se realizó por duplicado, el número de muestras totales por analizar fue de 48 de heces y 48 de colon (N=96). La comparación de datos de las UFC/g de lactobacilos y aerobios entre dos grupos independientes se realizó con la prueba t de *Student* ó con la prueba U de Mann-Whitney. La comparación de más de dos grupos independientes se realizó con ANOVA (paramétrica) o con la prueba de Kruskal-Wallis. Sólo se contemplaron valores significativamente estadísticos aquellos con una  $p \leq 0.05$ . Los caracteres equivalen a: \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

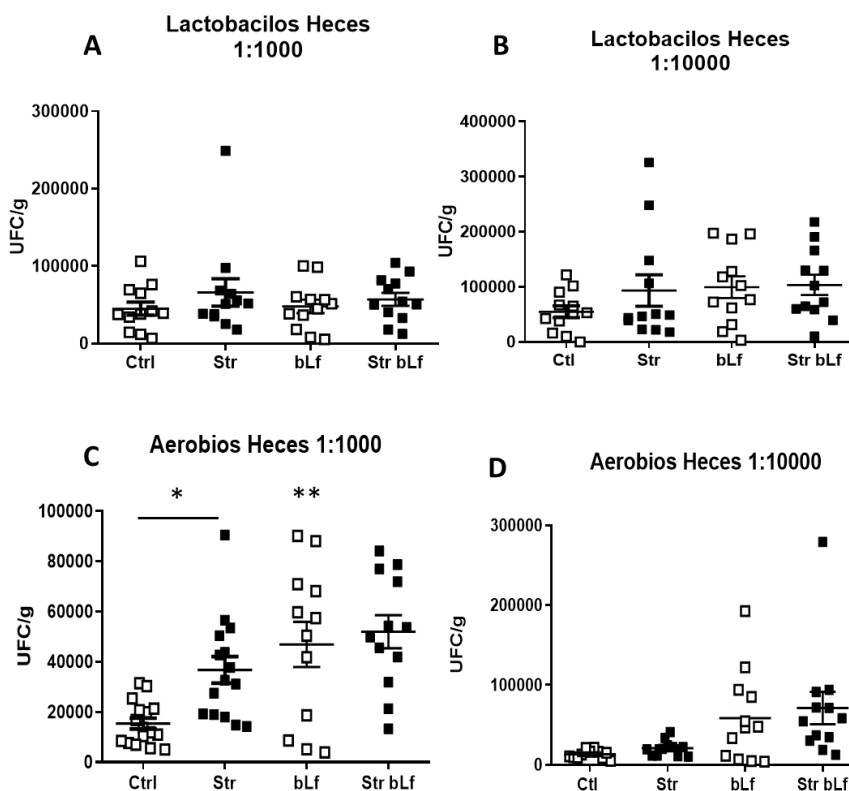
El análisis bioinformático de las secuencias de las comunidades bacterianas se analizó mediante el software MOTHUR (**Schloss et al., 2009**) y STAMP (**Parks et al., 2014**). Dichos softwares transforman una cantidad de variables posiblemente correlacionadas en una cantidad limitada de variables no correlacionadas llamadas componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales (**Sánchez et al., 2017**). De igual manera, sólo se contemplaron valores significativamente estadísticos aquellos con una  $p \leq 0.05$ .

Mediante el software STAMP se realizó el análisis de componente principal, el cual es un método estadístico que permite estimar similitudes entre muestras cuando hay una gran cantidad de características, por medio de la selección de variables latentes, denominadas componente principal, que capturan la mayor información posible (**Pérez & Arco, 2016**).

## RESULTADOS

### Cuenta bacteriana de lactobacilos y aerobios en heces

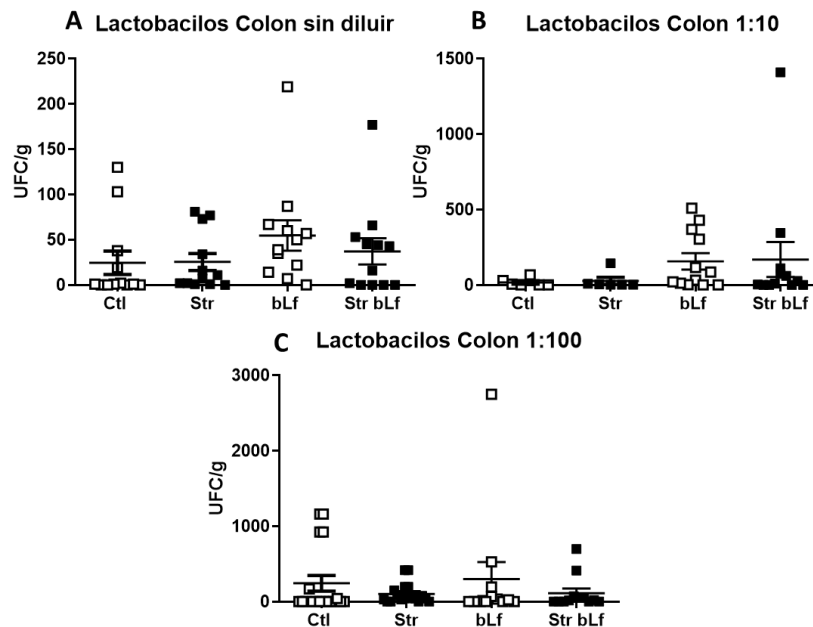
En la **Figura 3**, se muestra la cuenta bacteriana de lactobacilos y aerobios en heces, expresada en UFC/g, de los 4 grupos de estudio. En comparación con el grupo Ctrl (**Figura 3C**), la cuenta de aerobios en heces de la dilución  $10^{-3}$  en el grupo Str ( $P=0.038$ ) y en el grupo bLf ( $P=0.002$ ) fue más alta. No se apreciaron otras diferencias significativas en heces a la dilución  $10^{-4}$  (**Figura 3D**) ni tampoco en la cuenta de lactobacilos en ambas diluciones de heces (**Figuras 3A y 3B**).



**Figura 3** Cuenta bacteriana (UFC/g) en heces a la dilución  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  de lactobacilos en (A) y (B) y de aerobios (C) y (D). \*  $P<0.05$  ( $P=0.037$ ), \*  $P<0.01$  ( $P=0.015$ ) con respecto al grupo control (Ctrl).

### Cuenta bacteriana de lactobacilos en colon

En la **Figura 4** se muestran las gráficas de la cuenta bacteriana (UFC/g) en colon de lactobacilos de los 4 grupos de estudio. No se apreciaron diferencias significativas en la cuenta de lactobacilos en colon sin diluir y con las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .

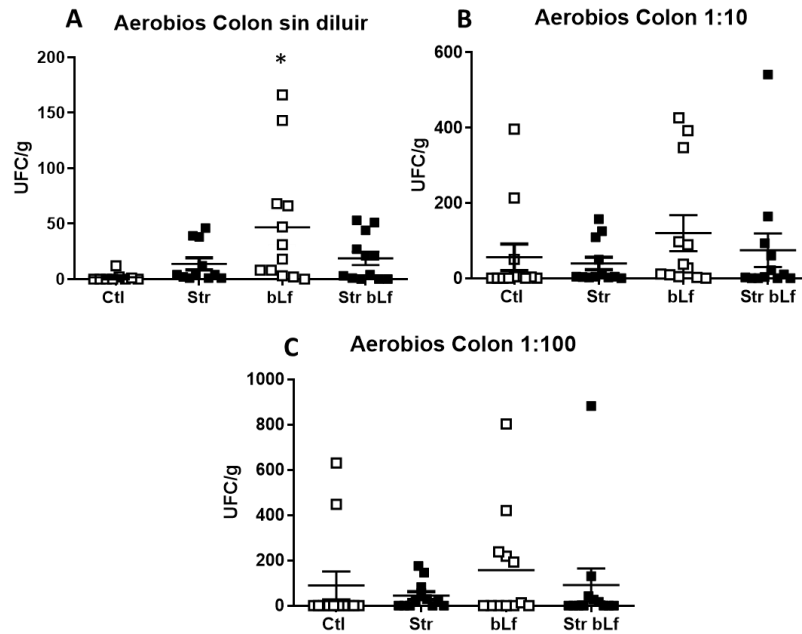


**Figura 4** Cuenta bacteriana (UFC/g) de lactobacilos en colon sin diluir (A),  $10^{-1}$  (B) y  $10^{-2}$  (C). No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

### Cuenta bacteriana de aerobios en colon

En la **Figura 5** se muestra la cuenta bacteriana (UFC/g) de aerobios en los cultivos de colon de los 4 grupos de estudio. En la **Figura 5A**, en comparación con el grupo control, la cuenta de aerobios en colon sin diluir fue mayor en el grupo sin estrés tratado con bLf ( $P = 0.0166$ ). No se apreciaron diferencias significativas en la cuenta de lactobacilos en colon sin diluir y con las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .





**Figura 5** Cuenta bacteriana (UFC/g) de aerobios en colon sin diluir (A),  $10^{-1}$  (B) y  $10^{-2}$  (C). \*\* $P < 0.05$  ( $P = 0.002$ ) vs el grupo Ctrl.

### Resumen de resultados de UFC/g

En la **Tabla 7** se muestra el resumen de resultados sobre las comparaciones de las UFC/g de aerobios y lactobacilos en heces entre los grupos pareados (Str vs Ctrl; Str bLf vs bLf) y con sus respectivos grupos control (bLf vs Ctrl; bLf Str vs Str). Como podemos observar, sólo hubo diferencias significativas con respecto al grupo Ctrl: los grupos Str y bLf incrementaron la cuenta de aerobios en muestras de heces en la dilución  $10^{-3}$ .

**Tabla 7** Resumen de resultados sobre las comparaciones de las UFC/g de aerobios y lactobacilos en heces, en donde los valores numéricos corresponden al valor P calculado.

Comparación	Aerobios		Lactobacilos	
	Heces $10^{-3}$	Heces $10^{-4}$	Heces $10^{-3}$	Heces $10^{-4}$
bLf vs Ctrl	<b>0.002</b>	0.110	0.997	0.417
Str bLf vs Str	0.273	0.061	0.945	0.984
Str bLf vs bLf	0.938	0.911	0.945	0.999
Str vs Ctrl	<b>0.038</b>	0.982	0.576	0.547

En la **Tabla 8** se muestra el resumen de resultados sobre las comparaciones de las UFC/g de aerobios y lactobacilos en colon entre los grupos pareados (Str vs Ctrl; Str bLf vs bLf) y con sus respectivos grupos control (bLf vs Ctrl; bLf Str vs Str). Sólo se presentaron diferencias significativas en aerobios, en donde el grupo Str incrementó la cuenta bacteriana con respecto al grupo Ctrl en las muestras de colon sin diluir.

**Tabla 8** Resumen de resultados sobre las comparaciones de las UFC/g de aerobios y lactobacilos en colon, en donde, los valores numéricos corresponden al valor P calculado.

Comparación	Aerobios			Lactobacilos		
	Colon sin diluir	Colon 10 <sup>-1</sup>	Colon 10 <sup>-2</sup>	Colon sin diluir	Colon 10 <sup>-1</sup>	Colon 10 <sup>-2</sup>
bLf vs Ctrl	<b>0.017</b>	0.637	0.857	0.411	0.713	0.986
Str bLf vs Str	0.983	0.914	0.944	0.929	0.698	0.999
Str bLf vs bLf	0.171	0.833	0.866	0.799	0.999	0.722
Str vs Ctrl	0.840	0.990	0.950	0.999	0.999	0.769

### **Diversidad y estructura de las comunidades bacterianas**

Para realizar el estudio de las comunidades bacterianas, se calcularon los índices de diversidad alfa de las muestras (diversidad, dominancia y riqueza), se realizó una curva de rarefacción, un análisis de componente principal y se analizó la abundancia relativa de las comunidades bacterianas.

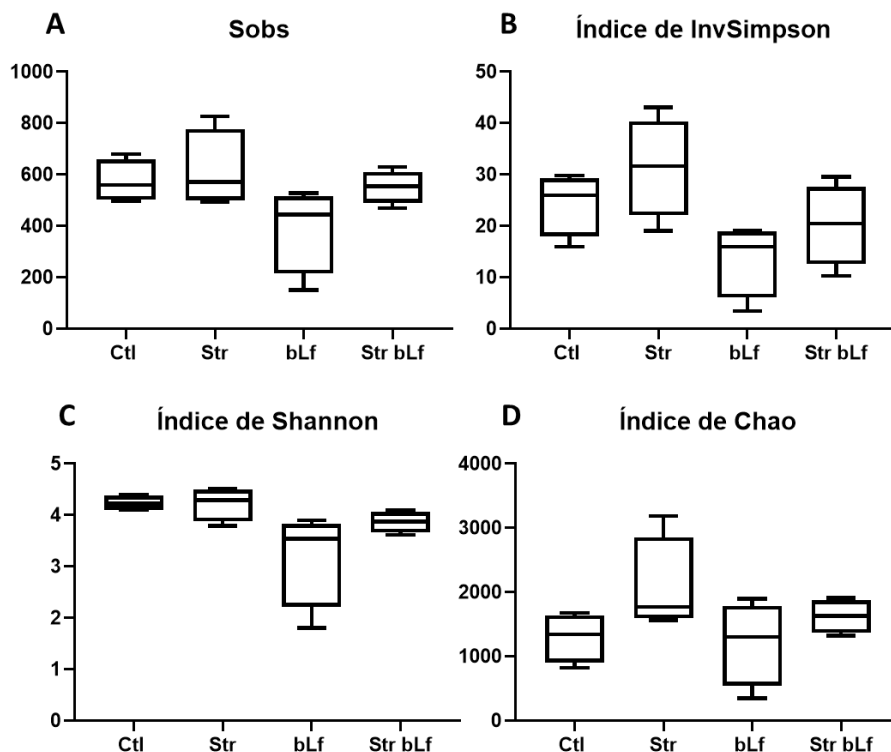
### **Índices de diversidad alfa**

En la **Tabla 9** se resumen los índices de diversidad alfa para cada muestra, en donde se pueden apreciar los índices de diversidad (Shannon), dominancia (Inverso del índice de Simpson), riqueza (Chao) y el estimador de riqueza (Sobs). El número de secuencias de todas las muestras se normalizó con base a la muestra con el menor número de secuencias, que fue de 9476; es importante señalar que algunos índices de diversidad son sensibles al tamaño de la muestra. Las muestras tuvieron una buena cobertura, con respecto al número de OTUs asignadas (entre 96% y 99%).

**Tabla 9** Índices de diversidad alfa para cada muestra, así como el número de secuencias y la cobertura.

Muestra	Número de secuencias	Cobertura	Sobs	InvSimpson (hci-lci)	Shannon (hci-lci)	Chao (hci-lci)
Ctrl 1	9476	0.96	678	24.06 (22.95-25.29)	4.39 (4.35-4.43)	1679.66 (1407.74-2053.05)
Ctrl 2	9476	0.97	496	27.86 (26.84-28.95)	4.11 (4.08-4.14)	1157.48 (959.28-1440.52)
Ctrl 3	9476	0.96	596	15.98 (15.19-16.85)	4.10 (4.06-4.14)	1525.84 (1257.40-1903.41)
Ctrl 4	9476	0.98	521	29.75 (28.58-31.02)	4.34 (4.31-4.38)	822.59 (730.50-955.23)
Str 1	9476	0.96	629	43.08 (41.51-44.76)	4.52 (4.49-4.55)	1851.10 (1507.42-2329.44)
Str 2	9476	0.94	827	31.04 (29.75-32.45)	4.43 (4.39-4.47)	3184.50 (2598.63-3964.10)
Str 3	9476	0.97	495	32.20(31.13-33.34)	4.15 (4.11-4.18)	1563.91 (1235.16-2038.85)
Str 4	9476	0.96	514	19.05 (18.36-19.78)	3.79 (3.75-3.82)	1684.18 (1336.73-2178.56)
bLf 1	9476	0.96	473	18.14 (17.48-18.85)	3.60 (3.56-3.63)	1897.39 (1452.30-2545.17)
bLf 2	9476	0.97	415	13.74 (13.16-14.38)	3.47 (3.43-3.50)	1138.03 (912.07-1466.80)
bLf 3	9476	0.97	528	19.15 (18.44-19.92)	3.90 (3.86-3.94)	1464.88 (1187.42-1859.06)
bLf 4	9476	0.99	149	3.44 (3.37-3.51)	1.80 (1.76-1.83)	347.91 (255.33-521.71)
Str bLf 1	9476	0.96	629	19.37 (18.62-20.17)	3.94 (3.90-3.98)	1910.96 (1563.52-2387.58)
Str bLf 2	9476	0.96	554	10.32 (9.87-10.81)	3.61 (3.56-3.65)	1500.97 (1234.59-1871.66)
Str bLf 3	9476	0.97	468	29.58 (28.50-30.75)	4.10 (4.07-4.14)	1321.77 (1057.88-1703.96)
Str bLf 4	9476	0.96	555	21.51 (20.79-22.28)	3.81 (3.78-3.85)	1757.21 (1417.33-2231.12)

Por otra parte, la **Figura 6**, muestra los índices: InvSimpson, Shannon, Chao y la riqueza observada (Sobs). Los valores de P para este análisis no muestran significancia estadística, pero representan de una manera más gráfica la diferencia entre las diversidades microbianas de cada grupo. Los valores de Sobs mostraron un aparente aumento de riqueza en el grupo Str en comparación con los demás grupos (ver **Figura 6A**). Adicionalmente, el índice Chao mostró un aparente aumento de riqueza en el grupo Str en comparación con el resto (ver **Figura 6D**), recordemos que, a mayor valor de Chao, mayor riqueza (**Li et al., 2018**). Al analizar los valores del índice de InvSimpson e índice de Shannon (**Figuras 6B y 6C** respectivamente), se puede apreciar una tendencia de menor diversidad en los grupos tratados con bLf en comparación con los grupos Ctrl y Str. Lo cual sugiere que aparentemente, la bLf por si sola disminuye la biodiversidad al incrementar la dominancia de ciertas especies.



**Figura 6** Prueba de comparación de medianas de Kruskal-Wallis entre los índices de alfa diversidad estimados. El gráfico A corresponde al estimador de especies observadas Sobs, el gráfico B al índice de diversidad Shannon, el gráfico C al Índice de dominancia InvSimpson y el D para índice de riqueza Chao.

### Análisis de componente principal

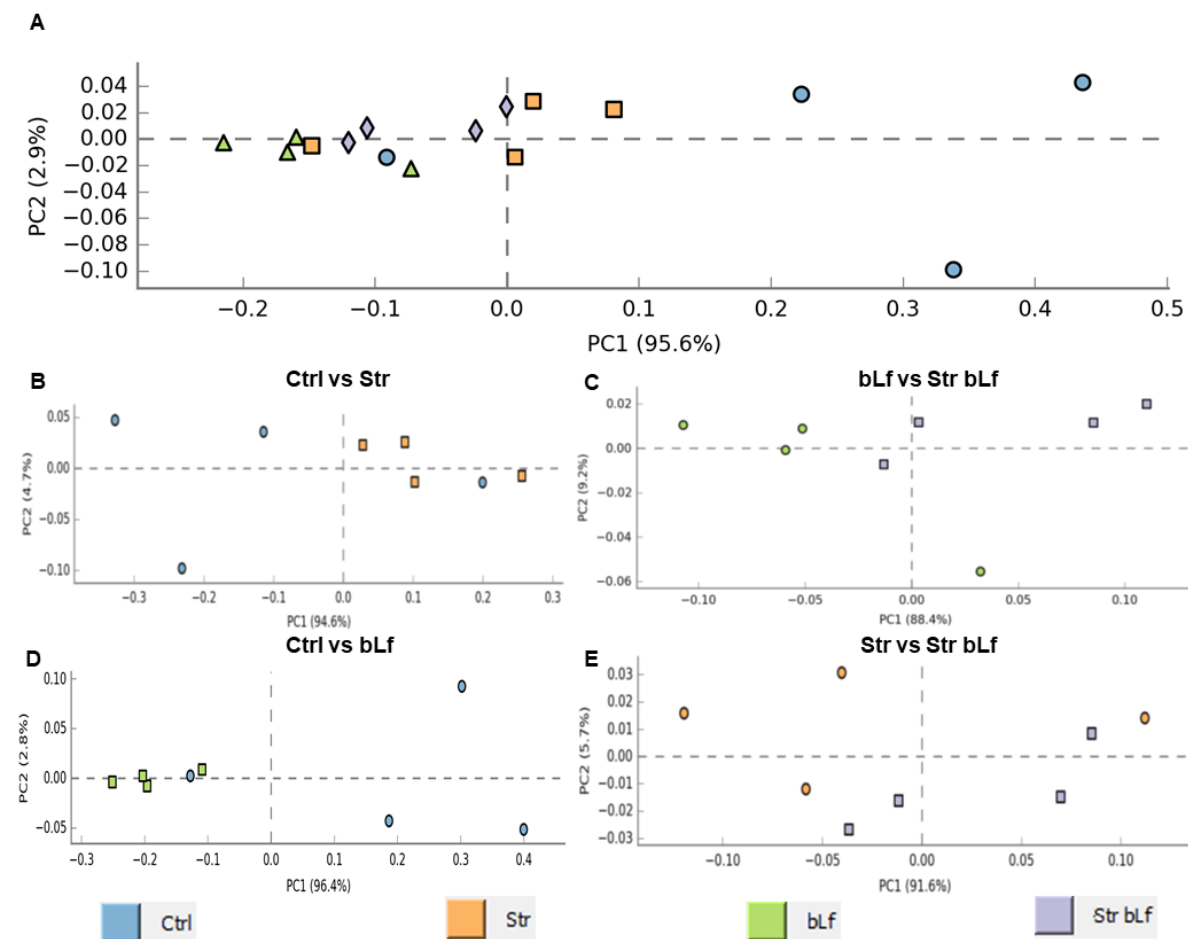
Mediante la interpretación del análisis de componente principal se pueden ver similitudes entre muestras cuando hay una gran cantidad de características, por medio de la selección de variables latentes, denominadas componente principal, que capturan la mayor información posible (**Pérez & Arco, 2016**).

En la **Figura 7** se aprecia un análisis de componente principal a nivel taxonómico de orden, en el cual, se resumen las variables estadísticas (porcentaje de secuencias, taxones y varianzas, entre otras) en dos componentes: PC1 en el eje "X" y PC2 en el eje "Y", seguido del porcentaje que indica las variables capturadas en cada PC (**Dube et al., 2010**).

A primera instancia, en la **Figura 7A** que resume todos los grupos, se puede apreciar que con respecto al grupo Ctrl, el grupo Str es muy diferente, al igual que el grupo bLf (debido a que las distribuciones de las muestras de los grupos están

en posiciones opuestas del valor PC1), es decir, que el estrés y la lactoferrina (individualmente) modificaron notablemente la estructura de la microbiota intestinal. Dicho efecto también se puede corroborar en las **Figuras 7B y 7D**.

Al comparar únicamente los grupos bLf vs Str bLf (**Figura 7C**) o Str vs Str bLf (**Figura 7E**), se aprecia que existe cierta similitud en el grupo Str bLf, en comparación con el grupo bLf o con el grupo Str, lo anterior se interpreta como la interacción aditiva entre los efectos del estrés y la bLf, dicho de otra manera, la bLf en lugar de atenuar el impacto del estrés, suma sus efectos con los del estrés en la modificación de la estructura de la microbiota intestinal.

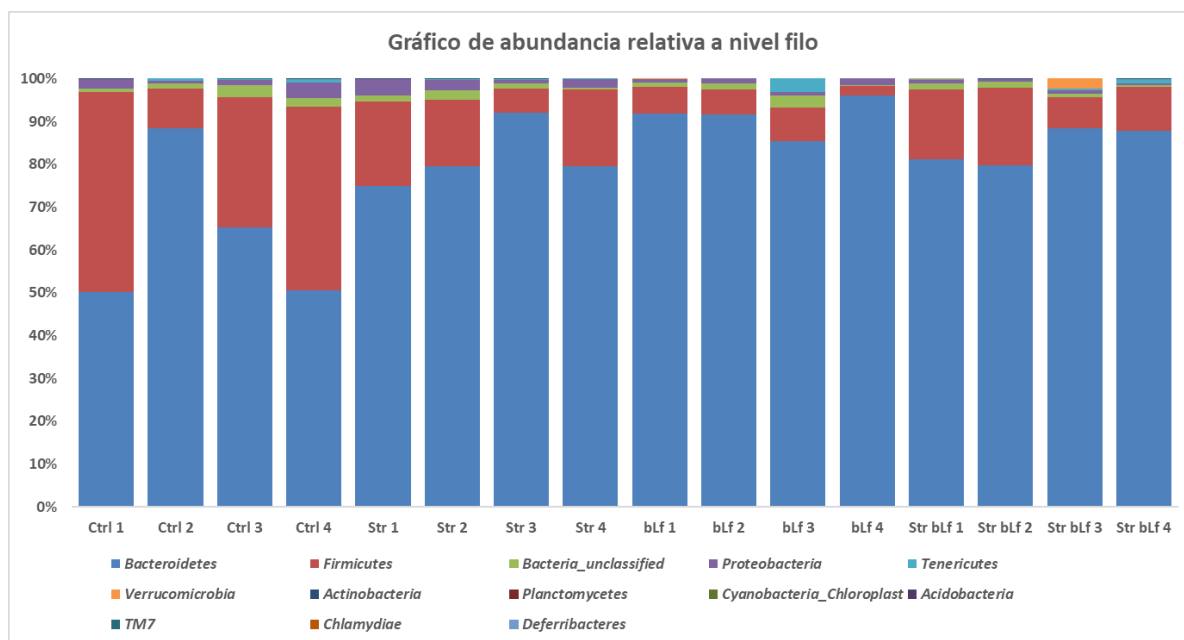


**Figura 7** Se aprecia un análisis de componente principal de la biodiversidad bacteriana a nivel filogenético de orden, los valores de PC1 y PC2 resumen el total de las variables agrupadas. El gráfico A corresponde al análisis de todos los grupos. Los gráficos B y C corresponden a los grupos pareados. Los gráficos D y E son los grupos comparados con su respectivo control basal (sin tratamiento).

## Abundancia relativa de comunidades bacterianas

En el análisis de componente principal se puede apreciar la similitud entre las variables de las muestras de cada grupo, sin embargo, para poder estudiar y comparar las diferencias entre las comunidades bacterianas se estimaron los perfiles de abundancia taxonómica para cada muestra.

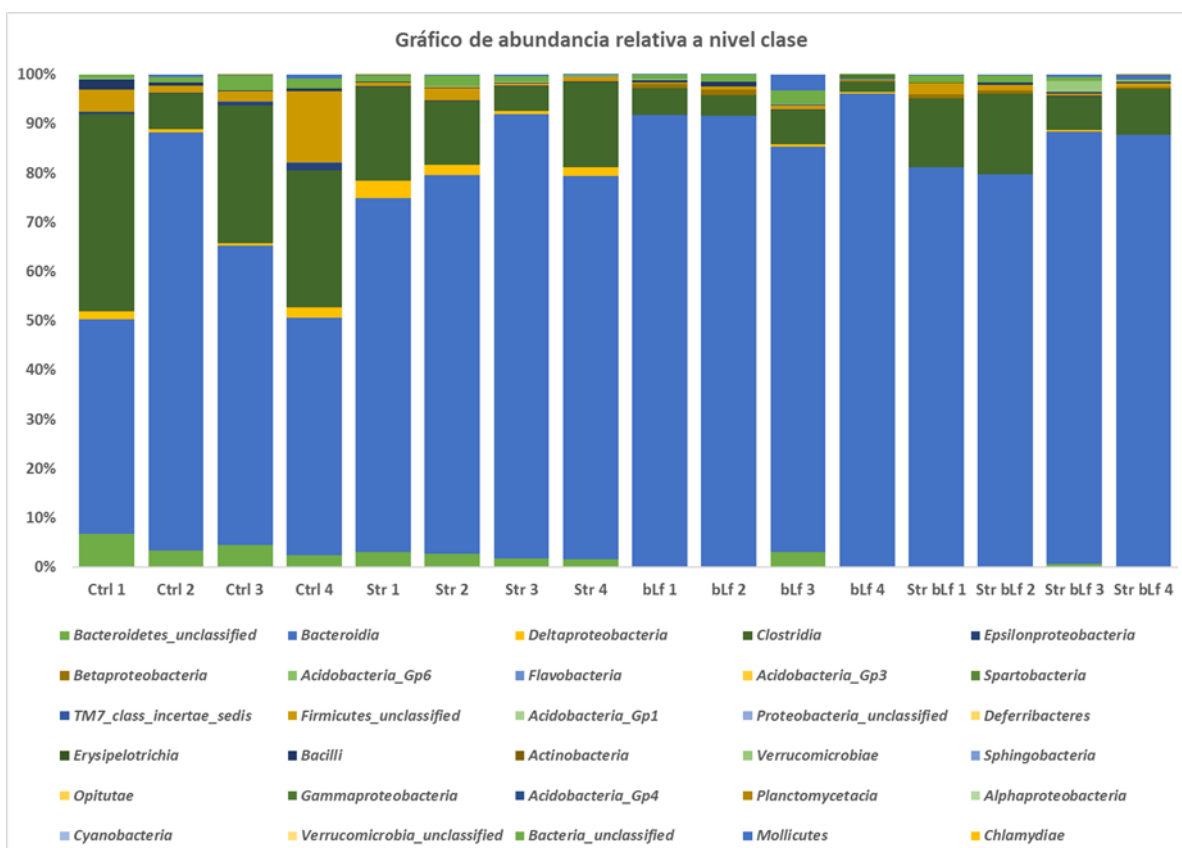
En la **Figura 8** se aprecia el gráfico de abundancia relativa para todas las muestras a nivel filo. Como podemos ver el filo *Bacteroidetes* (color azul) fue el más abundante en todas las muestras, se aprecia el efecto del estrés (Str), lactoferrina bovina (bLf) y estrés con bLf (Str bLf) sobre el incremento de la abundancia de *Bacteroidetes* con respecto al grupo control. El filo *Firmicutes* (color salmón) fue el segundo filo más abundante en las muestras después de *Bacteroidetes*, en este caso, los grupos Str, bLf y Str bLf, presentaron un decremento de la abundancia en comparación con el grupo control.



**Figura 8** Se muestra un gráfico de columnas apiladas que representa la abundancia relativa de todos filos encontrados en cada muestra.

En la **Figura 9** se aprecia el gráfico de abundancia relativa para cada muestra de cada grupo a nivel clase. En esta gráfica aparece un número mayor de taxones debido a que conforme incrementa la categoría taxonómica, incrementa el número de taxones. La clase más abundante encontrada fue *Bacteroidia* (color azul), se

aprecia un incremento de la abundancia relativa en el grupo bLf en comparación con el grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ) (ver valores de P en la **Tabla 10**). La clase *Clostridia* (Verde oscuro) fue la segunda clase más abundante, que como podemos ver, su abundancia fue disminuida en el grupo bLf con respecto al grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ) (ver valores de P en la **Tabla 10**).



**Figura 9** Se muestra un gráfico de columnas apiladas que representa la abundancia relativa de todas las clases encontrados en cada muestra.

La ventaja de las gráficas de abundancia relativa de las **Figuras 8 y 9** es que se puede identificar a primera instancia que taxones incrementaron o disminuyeron en cada grupo, sin embargo, si quisiéramos comparar esto entre taxones que tienen una abundancia muy pequeña es difícil visualizarlo en estas gráficas. Para aprovechar la información proporcionada de todos los taxones que no se presentaron en las figuras de esta tesis, se realizó una tabla que resume la influencia de los grupos sobre el incremento o decremento de la abundancia relativa de todos los taxones que tuvieron un valor de P significativo.

En la **Tabla 10** se resumen los taxones que incrementaron y disminuyeron en cada uno de los grupos (Str, bLf y Str bLf) con respecto al grupo control (Ctrl), únicamente se presentan aquellos que tuvieron un valor de P significativo. Como podemos apreciar, en el grupo Str no se apreciaron diferencias significativas en ninguno de los taxones analizados, a diferencia de los grupos bLf y Str bLf, esto puede deberse al número de muestras por grupo (n=4), a la mayor dispersión de las muestras en el grupo Str y a otros factores que se discutirán más adelante.

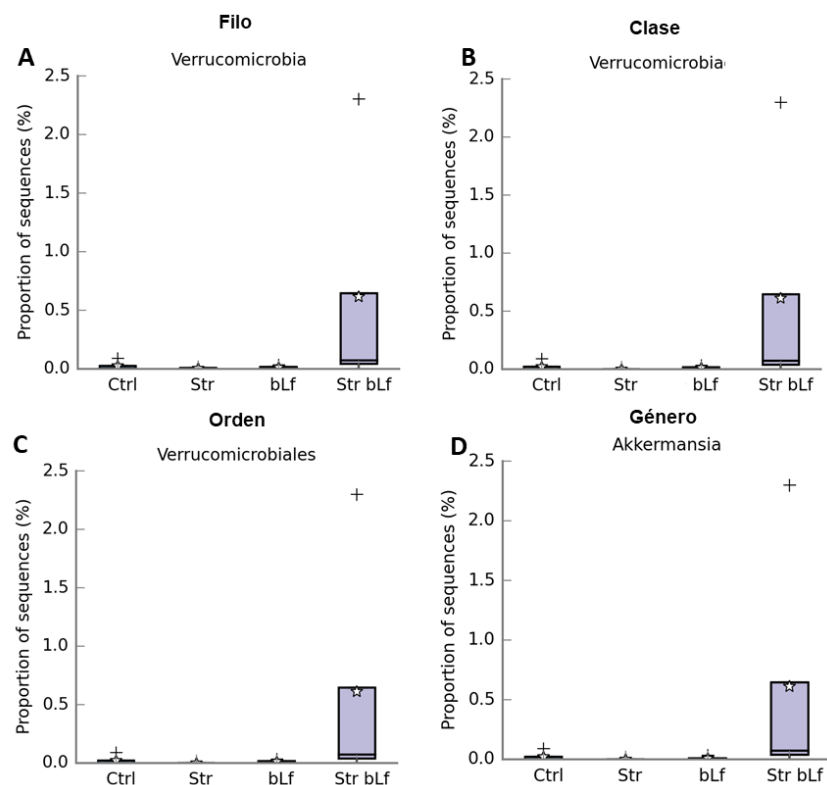
**Tabla 10** Se muestra el efecto del estrés, bLf y estrés con bLf sobre el incremento y decremento de la abundancia de los taxones bacterianos que fueron significativamente estadísticos. Los valores numéricos corresponden al valor de P, mientras que la asignación Ns significa que no fue significativa.

Nivel taxonómico	Taxón	Incremento			Decremento		
		Str	bLf	Str bLf	Str	bLf	Str bLf
Filo	<i>Firmicutes</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0286</b>	Ns
Clase	<i>Bacteroidetes_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.036</b>	Ns
	<i>Bacteroidia</i>	Ns	<b>0.0286</b>	Ns	Ns	Ns	Ns
	<i>Clostridia</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0227</b>	Ns
	<i>Betaproteobacteria</i>	Ns	<b>0.036</b>	<b>0.0451</b>	Ns	Ns	Ns
	<i>Firmicutes_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0451</b>	Ns
Orden	<i>Clostridiales</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0227</b>	Ns
	<i>Bacteroidetes_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.036</b>	Ns
	<i>Bacteroidales</i>	Ns	<b>0.0286</b>	Ns	Ns	Ns	Ns
	<i>Burkholderiales</i>	Ns	<b>0.0286</b>	<b>0.036</b>	Ns	Ns	Ns
	<i>Firmicutes_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0451</b>	Ns
Familia	<i>Ruminococcaceae</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.036</b>	Ns
	<i>Sutterellaceae</i>	Ns	<b>0.0286</b>	<b>0.036</b>	Ns	Ns	Ns
	<i>Bacteroidetes_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.036</b>	Ns
Género	<i>Bacteroides</i>	Ns	<b>0.0038</b>	Ns	Ns	Ns	Ns
	<i>Baernesiella</i>	Ns	Ns	<b>0.036</b>	Ns	Ns	Ns
	<i>Rikenellaceae_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0408</b>	<b>0.0156</b>
	<i>Bacteroidetes_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.036</b>
	<i>Parabacteroides</i>	Ns	Ns	<b>0.0065</b>	Ns	Ns	Ns
	<i>Rikenella</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0408</b>	Ns
	<i>Ruminococcaceae_unclassified</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0451</b>	Ns
	<i>Clostridium_XIVb</i>	Ns	Ns	Ns	Ns	<b>0.0068</b>	Ns
	<i>Parasutterella</i>	Ns	<b>0.0227</b>	<b>0.0286</b>	Ns	Ns	Ns



Para dar respuesta a los objetivos particulares, se determinó la abundancia relativa individual de cada taxón, para ello se analizaron las divisiones: filo, clase, orden, familia y género de las especies y familias planteadas. La categorización de los taxones, se realizó mediante la base de datos NCBI *Taxonomy* (Schoch *et al.*, 2020). Es importante mencionar, que algunos taxones de los linajes presentados no se detectaron en este estudio por lo cual sólo se puso la información de la que se dispone.

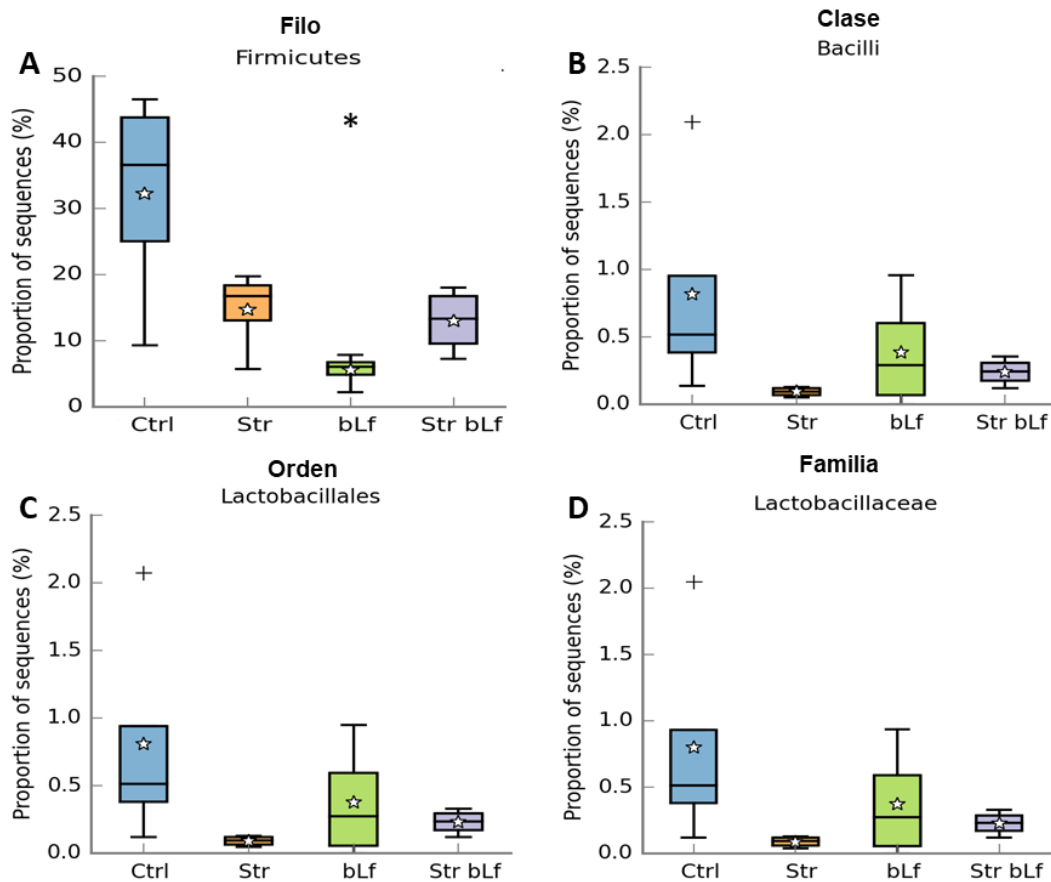
En la **Figura 10** se muestra el linaje del género asociado a la degradación de *mucus Akkermansia* (filo *Verrucomicrobia*, clase *Verrucomicrobiae*, orden *Verrucomicrobiales*, género *Akkermansia*), que fue incluido en los objetivos particulares. Se puede apreciar que los valores de P no fueron significativos para ningún taxón. La familia *Verrucomicrobiaceae* no se detectó en este estudio.



**Figura 10** Proporción de secuencias de los grupos, en donde los taxones A, B, C y D son filo, clase, orden, y género respectivamente.

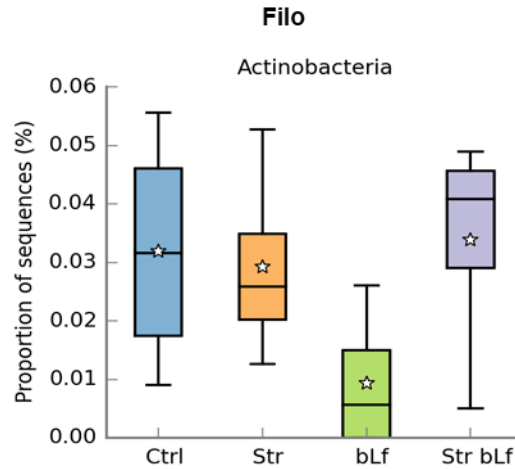
En la **Figura 11** se muestra el linaje bacterias asociadas a la producción de SCFA lactobacilos (filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia

*Lactobacillaceae*) que también fueron incluidos en los objetivos particulares. En el taxón filo, se puede ver que, la abundancia relativa del grupo bLf fue menor en comparación con el grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ).



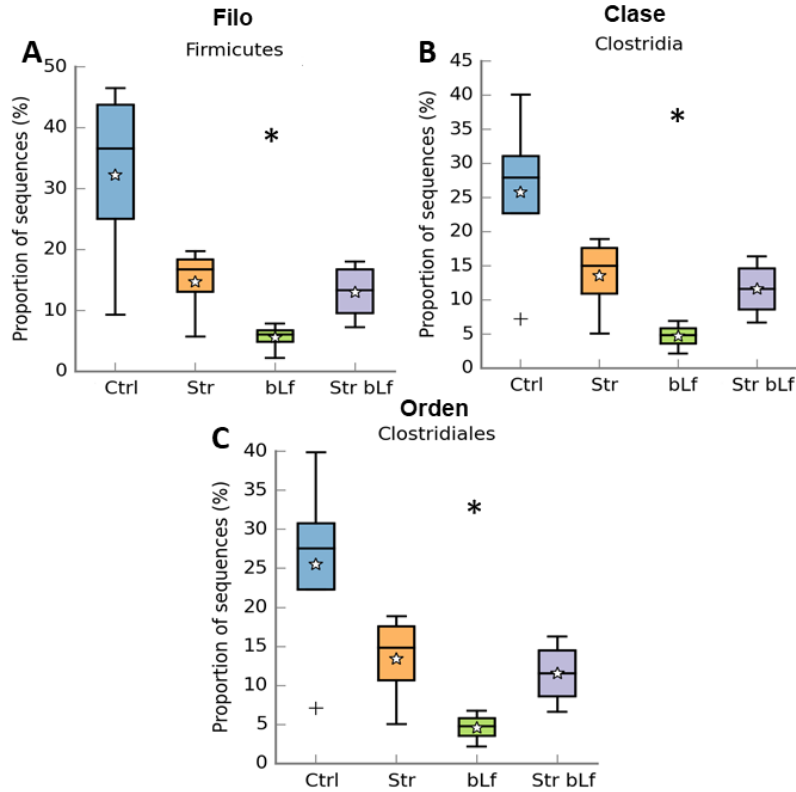
**Figura 11** Proporción de secuencias de los grupos, en donde los taxones A, B, C y D son filo, clase, orden, familia respectivamente. El símbolo \* representa que hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto su grupo control.

Las bacterias asociadas a la producción de SCFA como la familia *Bifidobacteriaceae* fueron incluidas como objetivo particular. A pesar de que no se lograron detectar bifidobacterias, sí se detectó su filo correspondiente a *Actinobacteria*, aunque el valor de P no fue significativo (**Figura 12**).



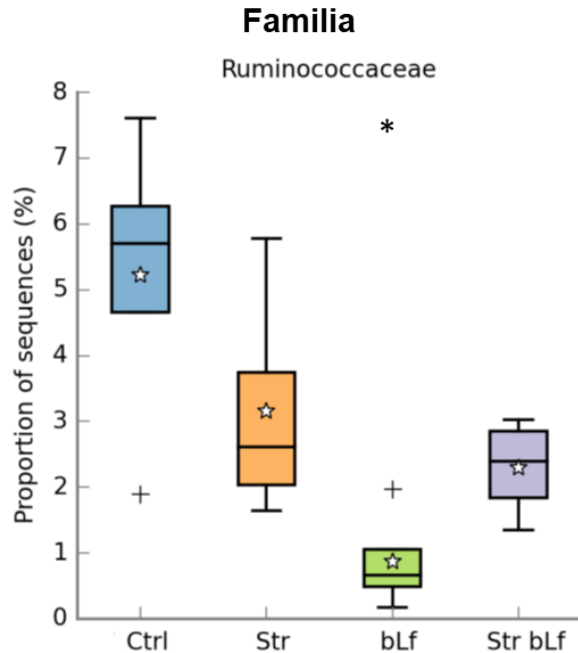
**Figura 12** Proporción de secuencias del filo *Actinobacteria*.

La **Figura 13** muestra el linaje de la familia asociada a generación de IgA *Clostridaceae* (filo *Firmicutes*, clase *Clostridia*, orden *Clostridiales*) que también se incluyó en los objetivos particulares. En los taxones filo, clase y orden, se puede ver que, el porcentaje de proporción de secuencias del grupo bLf fue menor en comparación con el grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ).



**Figura 13** Proporción de secuencias de los grupos, en donde los taxones A, B y C son filo, clase y orden respectivamente. El símbolo \* representa que hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo control.

Debido a que, al analizar el efecto de la bLf y el estrés sobre las familias asociadas con generación de SCFA (*Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae*) planteadas en los objetivos, no se presentaron diferencias significativas entre los distintos grupos, se analizó la familia *Ruminococcaceae* (**Figura 14**) la cual de igual manera se encuentra estrechamente relacionada con la generación de SCFA (**Quraishi et al., 2017; Birkeland et al., 2020**). Se puede ver que, el porcentaje de proporción de secuencias del grupo bLf fue menor en comparación con el grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ).



**Figura 14** Abundancia relativa de la familia *Ruminococcaceae*. El símbolo \* representa que hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto su grupo control.

En el **Anexo 7** se muestra la curva de rarefacción, podemos ver que la asíntota de las curvas no se presenció por completo debido al proceso de normalización de las curvas, pero podemos observar que el comportamiento de todas las curvas fue similar lo cual beneficia la fidelidad de nuestros resultados, pues esto indica que estamos haciendo comparaciones equitativas.

En el **Anexo 8** se muestran los gráficos de Krona de abundancia relativa de las secuencias para cada una de las muestras. Los gráficos de Krona muestran la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTU bacterianas más abundantes registradas en los conjuntos de datos (**Stefani et al., 2005**).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como ya se mencionó, la bLf posee una gran actividad biológica la cual puede modular los componentes de la microbiota intestinal por diversos mecanismos, entre los cuales destaca su actividad antimicrobiana, la cual deriva de diversos mecanismos directos como el secuestro de iones  $Fe^{3+}$ , la unión a LPS de bacterias impidiendo su crecimiento (**Appelmek et al., 1994**) y la intervención en la formación de biopelículas (**Jenssen & Hancock, 2009**). Así como mecanismos indirectos, por ejemplo, la modulación positiva de la actividad inmunológica (**Gopalakrishna & Hand, 2020**). Por otra parte, el estrés altera la colonización y proliferación normal de la microbiota intestinal mediante el eje HPA, lo cual conlleva a inflamación y daño tisular. La originalidad de este estudio radica en que por primera vez se estudió el efecto de la bLf en la modulación de los componentes de la microbiota intestinal en ratones sometidos a estrés. Lo anterior es un eslabón muy importante para comprender los posibles mecanismos por los cuales la bLf atenúa los efectos del estrés, por ejemplo, se sabe que la bLf puede modular de manera ascendente o descendente los corticosteroides suprarrenales a través de la activación del eje HPA, la generación de óxido nítrico (NO) y la activación de la vía del sistema nervioso opioide (**Guzmán et al., 2021**), pero actualmente no se conoce cuál es el efecto de la lactoferrina sobre la microbiota intestinal en condiciones de estrés.

En esta investigación, de manera adicional a los objetivos particulares, se obtuvieron resultados de relevancia para comprender el efecto modulador de la bLf y la influencia del estrés sobre la modulación al alza y a la baja de diversas bacterias comensales de la microbiota intestinal, y aunque no se encontraron diferencias significativas en los taxones planteados en los objetivos particulares: *Akkermansia*, *Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae*, se analizaron otros taxones relacionados con la degradación de *mucus* y productores de SCFA, gracias a ello, se pudo evaluar el efecto del estrés, lactoferrina y estrés con lactoferrina en la modulación de bacterias relacionadas con la generación de SCFA, IgA y degradadoras de *mucus*, lo cual es una gran fortaleza en este estudio. Uno de los inconvenientes de esta investigación, fue que el análisis metagenómico no pudo ser realizado para las muestras de colon, debido a la escasez de mgDNA bacteriano extraído de las muestras, pese a los

intentos de recuperar la microbiota del lumen intestinal. Lo anterior pudo deberse a que no se les adicionó el caldo tioglicolato como protector antes de congelarlas a -70°C, dando como consecuencia, la posible lisis prematura de las bacterias presentes en las muestras. Como perspectivas a esta investigación, realizar el tratamiento con bLf durante y/o después del modelo de estrés aportaría información crucial para comprender cuál es el efecto de la bLf sobre los efectos posteriores del estrés, ya que posiblemente la respuesta sería diferente después de un determinado tiempo de tratamiento, por ejemplo, **Wen et al., (2017)** administraron bLf durante 33 días, durante los cuales, reportaron efectos distintos sobre la modulación de diversos taxones de la microbiota intestinal. También se podría considerar evaluar el efecto de las dos formas de la bLf: apobLf y holobLf, ya que las formas saturada e insaturada de la bLf poseen mecanismos antibacterianos diferentes, como se describe en los antecedentes. El estudio de la composición de la microbiota intestinal mediante secuenciación de las regiones V4-V5 del gen 16S rRNA podría complementarse con la evaluación de otros parámetros involucrados con la homeostasis intestinal, como cuantificación de mucopolisacáridos, IgA total y citocinas proinflamatorias.

En los objetivos originales planteados, el género *Akkermansia* asociado a la degradación de *mucus*, no presentó diferencias significativas, por lo cual, de manera adicional se evaluó la abundancia de los géneros *Ruminococcus* y *Bacteroides*, los cuales también son degradadores de *mucus* (**Engevik et al., 2021**). Las familias *Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae* asociadas a la generación de SCFA, no presentaron diferencias significativas, de tal manera que se analizaron los géneros *Bacteroides*, *Fecalibacterium* y *Blautia*, y las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, todos ellos productores de SCFA (**Quraishi et al., 2017; Birkeland et al., 2020**). Por último, se analizó el linaje de la familia *Clostridaceae* asociada a la generación de IgA. A continuación, se discuten los hallazgos observados empezando por el grupo Str, seguido del grupo bLf, y por último el grupo Str bLf.

En el grupo Str se observó que incrementó la cuenta de aerobios fecales en comparación con el grupo Ctrl, lo cual también ha sido reportado en trabajos previos (**Machorro et al., 2019; Wang et al., 2005**). Mediante el análisis de diversidad alfa (**Figura 6**) pudimos ver que el estrés causó un aparente incremento de la diversidad. El incremento de la cuenta de la cuenta bacteriana de aerobios fecales, así como el incremento y decremento de distintos taxones (**Figuras 8 y 9**), es debido a que el estrés modifica la composición de la microbiota intestinal mediante la activación del eje cerebro-intestino, promoviendo la liberación de catecolaminas y citocinas proinflamatorias en el colon (**de Jonge et al., 2013; Eskandari et al., 2003**). Las catecolaminas separan el hierro de las proteínas transportadoras como la transferrina y lactoferrina, promoviendo la captura de hierro y crecimiento de bacterias intestinales (**Sandrini et al., 2010**), lo cual puede favorecer la proliferación de ciertas bacterias (no necesariamente de microorganismos benéficos) y estas a su vez, desplazar a otros comensales (**Madison et al., 2019**). A pesar del incremento de aerobios y del aparente incremento de la diversidad en el grupo Str, no se detectaron cambios significativos en la abundancia relativa de los taxones asociados a la generación de SCFA, IgA y degradadores de *mucus*, esto se debió en parte a la dispersión de las muestras en el grupo Str, ya que, aunque sí se observó un incremento aparente en diversos taxones, la dispersión de las muestras no permitió asignar un valor de p significativo, se sugiere que incrementar el número de ratones por grupo mejoraría el comportamiento de las muestras. Otra posible causa fue porque el ensayo duró 4 días consecutivos, el tiempo suficiente para observar cambios estructurales en la microbiota intestinal como lo reporta **Machorro et al., (2019)**, sin embargo, en algunos ensayos de metagenómica, se suelen mantener periodos más largos de estrés, como lo realizaron: **Jang et al., (2018)** (2h / 10d), **Rengarajan et al., (2020)** (2h / 7d) y **Xu et al., (2020)** (1h / 44d).

En el grupo bLf la cuenta de aerobios en heces y colon fue mayor con relación al grupo Ctrl. Estos datos sugieren que la bLf por sí misma induce el incremento de aerobios fecales y en colon. Esto puede deberse a que algunas bacterias de la microbiota, se han adaptado para contrarrestar la limitación de hierro, sustrayéndolo



de la lactoferrina (holobLf) mediante sideróforos microbianos que tienen mayor afinidad por el hierro que la propia lactoferrina (**Reyes., 2009; Ellermann et al., 2017**). Mediante el análisis de diversidad alfa, vimos que el grupo bLf, aparentemente disminuyó la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal, esto se puede explicar debido a que la bLf posee actividad prebiótica y bacteriostática (**Chen et al., 2017; Wen et al., 2017; Teraguchi et al., 1993**).

La bLf causó la disminución de la familia productora de SCFA *Ruminococcaceae* (aproximadamente un 500%), lo cual implica una menor producción de SCFA. Algunos estudios han relacionado niveles bajos de SCFA con el incremento de la permeabilidad intestinal y disbiosis, debido a que los SCFA proveen energía a los colonocitos que producen la mucina, además de que, por su naturaleza ácida, disminuyen el pH intestinal lo cual dificulta la proliferación de patobiontes (comensales que bajo la influencia de un entorno adecuado pueden producir enfermedad) (**Tan et al., 2014**). El género *Bacteroides* incrementó más de 10 veces su abundancia relativa ( $p=0.0038$ ) con respecto al grupo Ctrl. El género *Bacteroides*, como ya se mencionó, son degradadores de mucus y productores de SCFA. Está conformado por bacterias beneficiosas, que metabolizan polisacáridos y oligosacáridos, proporcionando nutrientes y vitaminas al huésped y otros comensales intestinales (**Zafar et al., 2021**), no obstante, se sugiere que una gran abundancia de ellas podría incrementar los niveles de SCFA, pero también una degradación excesiva de mucus y conllevar al típico cuadro de inflamación mediante los mecanismos descritos en los antecedentes.

La bLf también moduló el linaje de la familia *Clostridaceae* asociada a la generación de IgA: pudimos ver que el número de secuencias del filo *Firmicutes*, clase *Clostridia* y orden *Clostridiales*, disminuyeron en el grupo bLf en comparación con el grupo control ( $P>0.05$ ). En algunos artículos se ha demostrado mediante pruebas *in-vitro* la capacidad de la bLf para inhibir fuertemente el crecimiento de especies *Clostridium* (**Tomita et al., 1998**) lo cual sustenta la inhibición de la proliferación de los *Clostridiales*. Se sabe que los SFB son un factor clave en la generación de la inmunidad intestinal, debido a que contribuyen a la generación de linfocitos Th17 e IgA intestinal (**Hedblom et al., 2018**), por tanto, está claro que una disminución de

SFB tendría como consecuencia una disminución de la inmunidad intestinal, debido a que se ha reportado que los SFB son suficientes para inducir células Th17 en la lámina propia intestinal (**Ivanov et al., 2009**), no obstante, esta condición puede representar una propuesta como agente inmunomodulador para pacientes con una respuesta inflamatoria intestinal crónica, en padecimientos como la EII (**Pujol & Martín, 2015**). Estudios previos, han reportado un incremento del filo *Firmicutes* y de la clase *Clostridia* en pacientes con colitis ulcerativa (**Alam et al., 2020**), de manera opuesta, nuestros resultados en el grupo bLf mostraron un decremento de estos dos taxones, lo cual podría sugerir un posible efecto protector para la colitis ulcerativa.

En el grupo Str bLf no se apreció alguna tendencia sobre el incremento o decremento de la riqueza y diversidad bacteriana, sin embargo, con el análisis de beta diversidad, que refleja la diversidad bacteriana entre las muestras, se observó que existe similitud entre las comunidades bacterianas del grupo Str bLf, en comparación con el grupo bLf y con el grupo Str, lo anterior se puede interpretar como la interacción aditiva entre los efectos del estrés y la bLf, pues el grupo Str bLf posee características similares con los grupos Str y bLf.

La bLf, el estrés y la combinación de estrés con bLf, no alteraron la proliferación de lactobacilos en heces y en colon. Nuestros resultados son distintos a otros estudios donde han reportado que el estrés si tiene efectos sobre la disminución de lactobacilos (**Svishcheva et al., 2020**) y que la bLf disminuye la cuenta de lactobacilos fecales (**Sun et al., 2016**), estas diferencias aparentemente contradictorias podrían deberse principalmente a las disimilitudes entre especies animales empleadas, duración del tratamiento, dosis de bLf, e índice de saturación de hierro de la bLf, pues los mecanismos antimicrobianos de la bLf son distintos dependiendo de la saturación.

## CONCLUSIONES

El estrés incrementó la carga fecal bacteriana de aerobios y aumentó aparentemente la riqueza y diversidad bacteriana.

La bLf también incrementó la cuenta bacteriana de aerobios en muestras de heces y colon, sin embargo, indujo un aparente decremento de la diversidad y riqueza bacteriana. Así mismo disminuyó la abundancia de bacterias generadoras de SCFA e IgA y también incrementó la abundancia de bacterias involucradas en la degradación de *mucus* y producción de SCFA.

A diferencia de la bLf sin estrés, la bLf en condiciones de estrés, no moduló de manera significativa los taxones relacionados con la generación de SCFA, IgA intestinal e involucradas en la degradación de *mucus*.

De acuerdo los objetivos particulares planteados, no se logró demostrar que el estrés y/o la bLf afectan de manera significativa los taxones *Akkermansia*, *Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae*.

En conclusión, se logró demostrar el efecto del estrés, bLf y estrés con bLf, en el incremento y/o decremento de la proliferación de múltiples taxones involucrados en la homeostasis intestinal, lo cual provee evidencia para ensayos posteriores.

A manera de perspectiva, se sugiere profundizar sobre los potenciales efectos benéficos y/o dañinos de la bLf sobre la microbiota intestinal en condiciones de estrés, con la finalidad de fundamentar la aplicación de lactoferrina bovina como ingrediente de fármacos formulados para control de disfunciones intestinales en las cuales el estrés es un factor de riesgo.

## REFERENCIAS

Aguilera M, Vergara P, Martínez V. Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2013 Aug;25(8):e515-29. doi: 10.1111/nmo.12154. Epub 2013 May 27. PMID: 23711047.

Alam MT, Amos GCA, Murphy ARJ, Murch S, Wellington EMH, Arasaradnam RP. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathog.* 2020;12:1. Published 2020 Jan 4. doi:10.1186/s13099-019-0341-6

Angell IL, Nilsen M, Carlsen KCL, Carlsen KH, Hedlin G, Jonassen CM, Marsland B, Nordlund B, Reh binder EM, Saunders C, Skjerven HO, Staff AC, Söderhäll C, Vettukattil R, Rudi K. De novo species identification using 16S rRNA gene nanopore sequencing. *PeerJ.* 2020 Oct 21;8:e10029. doi: 10.7717/peerj.10029. PMID: 33150059; PMCID: PMC7585375.

Aoki YA, Aoki R, Moriya N, Goto T, Kubota Y, Toyoda A, Takayama Y, Suzuki C. Omics Studies of the Murine Intestinal Ecosystem Exposed to Subchronic and Mild Social Defeat Stress. *J Proteome Res.* 2016 Sep 2;15(9):3126-38. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00262. Epub 2016 Aug 15. PMID: 27482843.

Appelmeik BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun.* 1994 Jun;62(6):2628-32. doi: 10.1128/iai.62.6.2628-2632.1994. PMID: 8188389; PMCID: PMC186557.

Arciniega-Martínez IM, Campos-Rodríguez R, Drago-Serrano ME, Sánchez-Torres LE, Cruz-Hernández TR, Reséndiz-Albor AA. Modulatory Effects of Oral Bovine Lactoferrin on the IgA Response at Inductor and Effector Sites of Distal Small Intestine from BALB/c Mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016 Feb;64(1):57-63. doi: 10.1007/s00005-015-0358-6. Epub 2015 Aug 30. PMID: 26318768.

Baker EN, Baker HM. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie.* 2009 Jan;91(1):3-10. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.006. Epub 2008 May 21. PMID: 18541155.

Bansil R & Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Chemistry* Published 2006  
DOI:10.1016/j.cocis.2005.11.001.

Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta.* 1992 May 22;1121(1-2):130-6. doi: 10.1016/0167-4838(92)90346-f. PMID: 1599934.

Birkeland E, Gharagozlian S, Birkeland KI, et al. Prebiotic effect of inulin-type fructans on faecal microbiota and short-chain fatty acids in type 2 diabetes: a randomised controlled trial [published correction appears in Eur J Nutr. 2020 Jul 6;:]. Eur J Nutr. 2020;59(7):3325-3338. doi:10.1007/s00394-020-02282-5

Bowcutt R, Forman R, Glymenaki M, Carding SR, Else KJ, Cruickshank SM. Heterogeneity across the murine small and large intestine. World J Gastroenterol. 2014;20(41):15216-32.

Braun V, Braun M. Active transport of iron and siderophore antibiotics. Curr Opin Microbiol. 2002 Apr;5(2):194-201. DOI: 10.1016/s1369-5274(02)00298-9.

Brawner KM, Yeramilli VA, Kennedy BA, Patel RK, Martin CA. Prenatal stress increases IgA coating of offspring microbiota and exacerbates necrotizing enterocolitis-like injury in a sex-dependent manner. Brain Behav Immun. 2020;89:291-299. doi:10.1016/j.bbi.2020.07.008.

Bo-Ra K, Jiwon S, Robin B, Guevarra J, Doo W, Kuk-Hwan Se, Ju-Hoon L, Hyeun B, Richard E. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. J. Microbiol. Biotechnol. (2017), 27(12), 2089–2093 <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>.

Bunešová V, Joch M, Musilová S, Rada V. Bifidobacteria, lactobacilli, and short chain fatty acids of vegetarians and omnivores. Scientia Agriculturae Bohemica, 48, 2017 (1): 47–54. doi: 10.1515/sab-2017-0007.

Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Abarca-Rojano E, Pacheco-Yépez J, Reyna-Garfias H, Barbosa-Cabrera RE, Drago-Serrano ME. Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A. Front Integr Neurosci. 2013 Dec 2;7:86. doi: 10.3389/fnint.2013.00086. PMID: 24348350; PMCID: PMC3845795.

Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. Curr Nutr Rep. 2018 Dec;7(4):198-206. doi: 10.1007/s13668-018-0248-8. PMID: 30264354; PMCID: PMC6244749.

Castillo-Álvarez F, Marzo-Sola ME. Role of intestinal microbiota in the development of multiple sclerosis. Neurologia. 2017 Apr;32(3):175-184. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2015.07.005. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26383059.

Chen B, Chen H, Shu X, Yin Y, Li J, Qin J, Chen L, Peng K, Xu F, Gu W, Zhao H, Jiang L, Li L, Song J, Elitsur Y, Yu HD, Jiang M, Wang X, Xiang C. Presence of Segmented Filamentous Bacteria in Human Children and Its Potential Role in the Modulation of Human Gut Immunity. Front Microbiol. 2018; 9: 1403. doi: 10.3389/fmicb.2018.01403.

Chen PW, Liu ZS, Kuo TC, Hsieh MC, Li ZW. Prebiotic effects of bovine lactoferrin on specific probiotic bacteria. *Biometals*. 2017 Apr;30(2):237-248. doi: 10.1007/s10534-017-9999-8. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28185076.

Chen W, Zhang CK, Cheng Y, Zhang S, Zhao HA. Comparison of Methods for Clustering 16S rRNA Sequences into OTUs. *PLoS ONE* 2013 8(8): e70837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070837>.

Coenye T, Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Nov 7;228(1):45-9. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00717-1. PMID: 14612235.

Conneely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr*. 2001 Oct;20(5 Suppl):389S-395S; discussion 396S-397S. doi: 10.1080/07315724.2001.10719173. PMID: 11603648.

Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*. 2015 Apr 3;3(1-2):e982426. doi: 10.4161/21688370.2014.982426. PMID: 25838985; PMCID: PMC4372027.

Clavel T, Gomes-Neto JC, Lagkouvardos I, Ramer-Tait AE. Deciphering interactions between the gut microbiota and the immune system via microbial cultivation and minimal microbiomes. *Immunol Rev*. 2017 Sep;279(1):8-22. doi: 10.1111/imr.12578. PMID: 28856739; PMCID: PMC5657458.

Da silva N, Hiromi M, Amstalden VC, Arruda N, Da silva M, Romeiro RA. Microbiological examination methods of food and water. A laboratory manual. Institute of Food Technology – ITAL. 2013 Brazil.

Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):300-17. doi: 10.1159/000216188.

Dix C, Wright O. Bioavailability of a Novel Form of Microencapsulated Bovine Lactoferrin and Its Effect on Inflammatory Markers and the Gut Microbiome: A Pilot Study. *Nutrients*. 2018 Aug 17;10(8):1115. doi: 10.3390/nu10081115. PMID: 30126153; PMCID: PMC6115941.

Dos Santos HRM, Argolo CS, Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC Microbiol*. 2019 Apr 8;19(1):74. doi: 10.1186/s12866-019-1446-2. PMID: 30961521; PMCID: PMC6454784.

Dube J, Valverde A, Steyn J, Cowan D, Waals JE. Differences in Bacterial Diversity, Composition and Function due to Long-Term Agriculture in Soils in the Eastern Free State of South Africa. *Diversity*. 2019. 11. 1-16. 10.3390/d11040061.

Ellermann M, Arthur JC. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radic Biol Med*. 2017 Apr;105:68-78. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27780750; PMCID: PMC5401654.

Engevik, Melinda A. and Engevik, Amy C. and Engevik, Kristen A. and Auchtung, Jennifer M. and Chang-Graham, Alexandra L. and Ruan, Wenly and Luna, Ruth Ann and Hyser, Joseph M. and Spinler, Jennifer K. and Versalovic, James. Mucin-Degrading Microbes Release Monosaccharides That Chemoattract *Clostridioides difficile* and Facilitate Colonization of the Human Intestinal Mucus Layer. *ACS Infect Dis*. 2021;7(5):1126-1142. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00634.

Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(6):251-65. doi: 10.1186/ar1002. Epub 2003 Sep 23. PMID: 14680500; PMCID: PMC333413.

Fransen F, Zagato E, Mazzini E, Fosso B, Manzari C, El Aidy S, Chiavelli A, D'Erchia AM, Sethi MK, Pabst O, Marzano M, Moretti S, Romani L, Penna G, Pesole G, Rescigno M. BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity*. 2015 Sep 15;43(3):527-40. doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.011. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26362264.

Fadeev E, Cardozo MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, Molari M, Tegetmeyer HE, Buttigieg PL, Boetius A. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3-V4 and V4-V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Front Microbiol*. 2021 Feb 16;12:637526. doi: 10.3389/fmicb.2021.637526. PMID: 33664723; PMCID: PMC7920977.

Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. 1992 Jan;42(1):166-70. doi: 10.1099/00207713-42-1-166. PMID: 1371061.

García-Ródenas CL, Bergonzelli GE, Nutten S, Schumann A, Cherbut C, Turini M, Ornstein K, Rochat F, Corthésy-Theulaz I. Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006 Jul;43(1):16-24. doi: 10.1097/01.mpg.0000226376.95623.9f. PMID: 16819372.

Giansanti F, Panella G, Leboffe L, Antonini G. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016. Dec; 9(4): 61. doi: 10.3390/ph9040061.

Gómez G & Guerrero A. Bioinformática microbiana. Posgrado En Ciencias, CIAD, A.C. (2019). Disponible en: <https://sites.google.com/a/ciad.mx/bioinformatica/home>.

Gopalakrishna KP, Hand TW. Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. *Nutrients*. 2020 Mar 20;12(3):823. doi: 10.3390/nu12030823. PMID: 32244880; PMCID: PMC7146310.

Gritsenko VA, Brudastov IuA, Zhurlov OS, Chertkov KL. Svoïstva ésherikhii, vydelennykh iz organizma mysheï pri bakterial'noï translokatsii posle immobilizatsionnogo stressa [The properties of Escherichia isolated from the bodies of mice in bacterial translocation after immobilization stress]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2000 Jan-Feb;(1):37-41. Russian. PMID: 10876890.

Grondin JA, Kwon YH, Far PM, Haq S, Khan WI. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. *Front Immunol*. 2020 Sep 4;11:2054. doi: 10.3389/fimmu.2020.02054. PMID: 33013869; PMCID: PMC7500085.

Guzmán-Mejía F, Vega-Bautista A, Molotla-Torres DE, Aguirre-Garrido JF, Drago-Serrano ME. Bovine lactoferrin as a modulator of neuroendocrine components of stress. *Curr Mol Pharmacol*. 2021 Jan 11. doi: 10.2174/1874467214999210111211947. Epub ahead of print. PMID: 33430754.

Haiwen Z, Rui H, Bingxi Z, Qingfeng G, Jifeng Z, Xuemei W, Beibei W. Oral Administration of Bovine Lactoferrin-Derived Lactoferricin (Lfcin) B Could Attenuate Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Induced Intestinal Disease through Improving Intestinal Barrier Function and Microbiota. *J Agric Food Chem*. 2019 Apr 10;67(14):3932-3945. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00861. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30892034.

Han SK, Kim DH. Lactobacillus mucosae and Bifidobacterium longum Synergistically Alleviate Immobilization Stress-Induced Anxiety/Depression in Mice by Suppressing Gut Dysbiosis. *J Microbiol Biotechnol*. 2019 Sep 28;29(9):1369-1374. doi: 10.4014/jmb.1907.07044. PMID: 31564078.

Hedblom GA, Reiland HA, Sylte MJ, Johnson TJ, Baumler DJ. Segmented Filamentous Bacteria - Metabolism Meets Immunity. *Front Microbiol*. 2018;9:1991. Published 2018 Aug 24. doi:10.3389/fmicb.2018.01991.

Hemalatha R, Ouwehand A, Saarinen M. T, Prasad U. V, Swetha K, Bhaskar V. Effect of probiotic supplementation on total lactobacilli, bifidobacteria and short chain fatty acids in 2–5-year-old children. *Microb Ecol Health Dis*. 2017; 28(1): 1298340. doi: 10.1080/16512235.2017.1298340.

Hernández M, Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico [Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis].



Rev Argent Microbiol. 2020 Apr-Jun;52(2):150-161. Spanish. doi: 10.1016/j.ram.2019.06.003. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31784184.

Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J.* 2015;56(2):228-40. doi: 10.1093/ilar/ilv017. PMID: 26323632.

Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski JS. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 28;20(44):16489-97. doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16489. PMID: 25469017; PMCID: PMC4248192.

Ibal JC, Pham HQ, Park CE, Shin JH. Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification. *PLoS One.* 2019 Feb 15;14(2):e0212090. doi: 10.1371/journal.pone.0212090. PMID: 30768621; PMCID: PMC6377111.

Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* Author manuscript; available in PMC 2010 Apr 30. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.

Jan B & Wolfgang S. Comparing measures of species diversity from incomplete inventories: an update. *Methods Ecol.* 2010. *Evol.* V1. P. 38-44.

Jang HM, Lee KE, Lee HJ, Kim DH. Immobilization stress-induced *Escherichia coli* causes anxiety by inducing NF- $\kappa$ B activation through gut microbiota disturbance. *Sci Rep.* 2018 Sep 17;8(1):13897. doi: 10.1038/s41598-018-31764-0. PMID: 30224732; PMCID: PMC6141499.

Jenssen H, Hancock RE. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie.* 2009 Jan;91(1):19-29. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.015. Epub 2008 Jun 5. PMID: 18573312.

Kim JJ, Khan WI. Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections. *Pathogens.* 2013 Feb 4;2(1):55-70. doi: 10.3390/pathogens2010055. PMID: 25436881; PMCID: PMC4235714.

Kim M & Chun J. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *J. Microbiol. Methods.* 2014. Chapter 4, Volume 41, Pages 61-74.

Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(17):5112-5120. doi:10.1128/AEM.01043-13.

Kumar J, Kumar M, Gupta S, Ahmed V, Bhambi M, Pandey R, Chauhan NS. An Improved Methodology to Overcome Key Issues in Human Fecal Metagenomic DNA Extraction. *GPB*. 2016 Dec;14(6):371-378. doi: 10.1016/j.gpb.2016.06.002. Epub 2016 Nov 23. PMID: 27888152; PMCID: PMC5200916.

Lagkouvardos I, Overmann J, Clavel T. Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota. *Gut Microbes*. 2017;8(5):493-503. doi:10.1080/19490976.2017.1320468.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62):3923. doi: 10.3791/3923. PMID: 22546956; PMCID: PMC4846332.

León N, Flores H, Canizalez A. Las dos caras de Lactoferrina en su interacción con microorganismos patógenos. La lucha por el hierro: patógeno vs. Hospedero. Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa. 2009. Cap12B p 319.

León-Sicairos N, López-Soto F, Reyes-López M, Godínez-Vargas D, Ordaz-Pichardo C, de la Garza M. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, slgA and lysozyme. *Clin Med Res*. 2006 Jun;4(2):106-13. doi: 10.3121/cmr.4.2.106. PMID: 16809402; PMCID: PMC1483887.

Li J, Sung CY, Lee N, et al. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(9):E1306-E1315. doi:10.1073/pnas.1518189113.

Li Y, Hu X, Yang S, Zhou J, Qi L, Sun X, Fan M, Xu S, Cha M, Zhang M, Lin S, Liu S, Hu D. Comparison Between the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Captive Musk Deer. *Front Microbiol*. 2018 Mar 2;9:300. doi: 10.3389/fmicb.2018.00300. PMID: 29551996; PMCID: PMC5840195.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3. doi: 10.1038/4441022a. PMID: 17183309.

Litvak Y, Byndloss MX, Bäumlér AJ. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science*. 2018 Nov 30;362(6418):eaat9076. doi: 10.1126/science.aat9076. PMID: 30498100; PMCID: PMC6296223.

Liu Y, Yuan X, Li L, Lin L, Zuo X, Cong Y, Li Y. Increased Ileal Immunoglobulin A Production and Immunoglobulin A-Coated Bacteria in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020 Mar;11(3):e00146. doi: 10.14309/ctg.000000000000146. PMID: 32352710; PMCID: PMC7145038.

Llorente B & Morrone J. Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: Teorías, concepto, métodos y aplicaciones. 2001. Facultad de Ciencia. U.N.A.M. CDMX.

López S, López S, Espinoza F. Propuesta de un índice de diversidad funcional: Aplicación a un bosque semideciduo micrófilo de Cuba Oriental. *Bosque (Valdivia)* [online]. 2017, vol.38, n.3 [citado 2021-09-02], pp.457-466.

Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016 Aug;14(4):264-70. doi: 10.1089/bio.2015.0064. Epub 2016 May 9. PMID: 27158753; PMCID: PMC4991598.

Lyte M. Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior. *Gut Microbes*. 2014 May-Jun;5(3):381-9. doi: 10.4161/gmic.28682. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24690573; PMCID: PMC4153777.

Machorro-Rojas N, Sainz-Espuñes T, Godínez-Victoria M, Castañeda-Sánchez JI, Campos-Rodríguez R, Pacheco-Yepes J, Drago-Serrano ME. Impact of chronic immobilization stress on parameters of colonic homeostasis in BALB/c mice. *Mol Med Rep*. 2019 Sep;20(3):2083-2090. doi: 10.3892/mmr.2019.10437. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31257542; PMCID: PMC6691234.

Madison A, Kiecolt JK. Stress, depression, diet, and the gut microbiota: human-bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition. *Curr Opin Behav Sci*. 2019;28:105-110. doi:10.1016/j.cobeha.2019.01.011.

Majka G, Pilarczyk-Zurek M, Baranowska A, Skowron B, Strus M. Lactoferrin Metal Saturation-Which Form Is the Best for Neonatal Nutrition?. *Nutrients*. 2020;12(11):3340. Published 2020 Oct 30. doi:10.3390/nu12113340.

Monge NJ & Moreno C. Métodos para medir la biodiversidad: Vol. 1. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. *Rev. biol. trop*. 2001, vol.49, n.3-4. 0034-7744.

Moreno CE, Barragan F, Pineda E, Pavon NP. Reanalyzing alpha diversity: alternatives to understand and compare information about ecological communities. *Rev. Mex. Biodiv*. 2011, vol.82, n.4. 1870-3453.

Mostacedo B & Fredericksen TS. Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal. Proyecto de manejo forestal sostenible BOLFOR. 2000. p.44.

Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014 Oct;14(10):667-85. doi: 10.1038/nri3738. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25234148.

Muraoka M, Mine K, Kubo C. A study of intestinal dysfunction induced by restraint stress in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1998 Aug;33(8):806-10. doi: 10.1080/00365529850171440. PMID: 9754726.

Nakatsu G, Li X, Zhou H, Sheng J, Wong SH, Wu WK, Ng SC, Tsoi H, Dong Y, Zhang N, He Y, Kang Q, Cao L, Wang K, Zhang J, Liang Q, Yu J, Sung JJ. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun.* 2015 Oct 30;6:8727. doi: 10.1038/ncomms9727. PMID: 26515465; PMCID: PMC4640069.

Onywera H, Meiring T. Comparative analyses of Ion Torrent V4 and Illumina V3-V4 16S rRNA gene metabarcoding methods for characterization of cervical microbiota: taxonomic and functional profiling. *Sci. Afr* 2020, V7, e00278.

Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics.* 2014;30(21):3123-3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494.

Pérez IC & Arco L. Una revisión sobre aprendizaje no supervisado de métricas de distancia. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas [en línea].* 2016, 10(4), 43-67[fecha de Consulta 3 de Octubre de 2021]. ISSN: 1994-1536. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=378349316004>.

Pietrzak B, Tomela K, Olejnik-Schmidt A, Mackiewicz A, Schmidt M. Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9254. Published 2020 Dec 4. doi:10.3390/ijms21239254.

Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* 2017 Jan;23(1):107-113. doi: 10.1038/nm.4236. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27892954.

Pujol Muncunill G., Martín de Carpi, J. Papel actual de los inmunomoduladores convencionales en la enfermedad inflamatoria intestinal pediátrica. *JOUR* 2015. Vol. 16. Núm. 3. P 91-162.

Rajilić SM, & de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014 Sep;38(5):996-1047. doi: 10.1111/1574-6976.12075. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24861948; PMCID: PMC4262072.

Rengarajan S, Knoop KA, Rengarajan A, Chai JN, Grajales-Reyes JG, Samineni VK, Russler-Germain EV, Ranganathan P, Fasano A, Sayuk GS, Gereau RW 4th, Kau AL, Knights D, Kashyap PC, Ciorba MA, Newberry RD, Hsieh CS. A Potential

Role for Stress-Induced Microbial Alterations in IgA-Associated Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea. *Cell Rep Med.* 2020 Oct 20;1(7):100124. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100124. PMID: 33196055; PMCID: PMC7659537.

Reyes M. Transferrina entrega hierro a todas las células y también a los microorganismos patógenos. *La lucha por el hierro: patógeno vs. Hospedero.* 2009. Cap12A. Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Robles A, Robles V, Guarner F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr. Hosp.* 2013. v. 28, n. 3, p. 553-557.

Rodríguez-Franco DA, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales [Antimicrobial mechanisms and potential clinical application of lactoferrin]. *Rev Latinoam Microbiol.* 2005 Jul-Dec;47(3-4):102-11. Spanish. PMID: 17061535.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016;4:e2584. Published 2016 Oct 18. doi:10.7717/peerj.2584.

Rosselló R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 25, Issue 1, January 2001, Pages 39–67.

Sánchez Q, Vega A, Melendez A, Machorro N, Drago ME. Fecal Bacterial Count in stressed BALB/c Mice treated with Bovine Lactoferrin. Sept 4-6, 2019. Mucosal Immunology Symposium. FES Iztacala, Tlalnepantla Edo Mex. Mexico.

Sánchez Q, Carrizales JE, Vega A, Melendez A, Guzmán F, Drago ME. Efecto de la lactoferrina bovina sobre la proliferación de lactobacilos y de bacterias aerobias en heces de ratones estresados. Congreso Nacional de Inmunología Monterrey 2021 23-28 Abril 2021 Monterrey México.

Sánchez Q, Vega A, Melendez A, Machorro N, Drago ME. Fecal Bacterial Count in stressed BALB/c Mice treated with Bovine Lactoferrin. Mucosal Immunology Symposium, Latinamerican of Mucosal Immunology Group (LAMIG), Sociedad Mexicana de Inmunología (SMI), 4-6 September 2019, FES Iztacala UNAM, Tlalnepantla Estado de Mexico Mexico.

Sánchez-Marañón, Manuel and Miralles, Isabel and Aguirre, Felix and Anguita-Maeso, Manuel and Millán, Vicenta and Ortega Perez, Raul and García-Salcedo, José and Martínez-Abarca, Francisco and Soriano, Miguel. Changes in the soil bacterial community along a pedogenic gradient. *Sci Rep.* 2017 Nov 6;7(1):14593. doi: 10.1038/s41598-017-15133-x.

Sandrini SM, Shergill R, Woodward J, Muralikuttan R, Haigh RD, Lyte M, Freestone PP. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate

iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol.* 2010 Jan;192(2):587-94. doi: 10.1128/JB.01028-09. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19820086; PMCID: PMC2805316.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Dec;75(23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09. Epub 2009 Oct 2. PMID: 19801464; PMCID: PMC2786419.

Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hottton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford).* 2020 Jan 1;2020:baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062. PMID: 32761142; PMCID: PMC7408187.

Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring).* 2010 Jan;18(1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167. Epub 2009 Jun 4. PMID: 19498350.

Sicard JF, Le Bihan G, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Sep 5;7:387. doi: 10.3389/fcimb.2017.00387. PMID: 28929087; PMCID: PMC5591952.

Söderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1099-108. doi: 10.1053/gast.2002.36019. PMID: 12360472.

Sonco R. Estudio de la diversidad alfa y beta en tres localidades de un bosque montano en la región de Madidi, La paz-Bolivia. Tesis de grado. Universidad mayor de San Andres, Facultad de agronomía. La paz-Bolivia 2013.

Song L, Xie W, Liu Z, Guo D, Zhao D, Qiao X, Wang L, Zhou H, Cui W, Jiang Y, Li Y, Xu Y, Tang L. Oral delivery of a *Lactococcus lactis* strain secreting bovine lactoferricin-lactoferrampin alleviates the development of acute colitis in mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Aug;103(15):6169-6186. doi: 10.1007/s00253-019-09898-6. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31165225.

Stefani F, Terrence B Marchand C, de la Providencia I, Yassimi A, St-Arnaud M, Hijri M. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS ONE* (2015). 10. e0128272. 10.1371/journal.pone.0128272.

Sugg, D. Measuring Biodiversity. State University of New York at Geneseo. Braak, C.J. F. 1987. Ordination. 1996. 91-173p.

Sun J, Ren F, Xiong L, Zhao L, Guo H. Bovine lactoferrin suppresses high-fat diet induced obesity and modulates gut microbiota in C57BL/6J mice. *J. Funct. Foods*. 2016 April; 22: 189-200. doi:10.1016/j.jff.2016.01.022.

Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. 2017 Jan;52(1):1-8. doi:10.1007/s00535-016-1242-9. Epub 2016 Jul 23. PMID: 27448578; PMCID: PMC5215992.

Sun Y, Li L, Xie R, Wang B, Jiang K, Cao H. Stress Triggers Flare of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adults. *Front Pediatr*. 2019;7:432. Published 2019 Oct 24. doi:10.3389/fped.2019.00432.

Sun Y, Zhang M, Chen CC, Gilliland M 3rd, Sun X, El-Zaatari M, Huffnagle GB, Young VB, Zhang J, Hong SC, Chang YM, Gumucio DL, Owyang C, Kao JY. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1478-87, 1487.e1-8. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.038. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23470617; PMCID: PMC3777426.

Suzuki N, Murakoshi M, Ono T, et al. Effects of Enteric-coated Lactoferrin Tablets Containing *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on Fecal Properties, Defecation Frequency and Intestinal Microbiota of Japanese Women with a Tendency for Constipation: a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Biosci Microbiota Food Health*. 2013;32(1):13-21. doi:10.12938/bmfh.32.13.

Svishcheva MV, Mukhina AY, Medvedeva OA. Composition of Colon Microbiota in Rats Treated with ACTH(4-7)-PGP Peptide (Semax) under Conditions of Restraint Stress. *Bull Exp Biol Med* 169, 357–360 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04886-7>.

Takayasu L, Suda W, Hattori M. Mapping the Environmental Microbiome. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019. Volume 3, P 17-28.

Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol*. 2014;121:91-119. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9. PMID: 24388214.

Teraguchi S, Ozawa K, Yasuda S, Fukuwatari Y, Shimamura S. Effects of Orally Administered Bovine Lactoferrin on the Faecal Enterobacteriaceae of SPF Mice Fed Milk. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57 卷, 2 号, p. 360-361, 公開日 2008/02/08.

Teraguchi S, Shin K, Ogata T, Kingaku M, Kaino A, Miyauchi H, Fukuwatari Y, Shimamura S. Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Nov;61(11):4131-4. doi: 10.1128/aem.61.11.4131-4134.1995. PMID: 8526530; PMCID: PMC167723.

Tomita S, Shirasaki N, Hayashizaki H, Matsuyama J, Benno Y, Kiyosawa I. Binding characteristics of bovine lactoferrin to the cell surface of *Clostridium* species and identification of the lactoferrin-binding protein. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998 Aug;62(8):1476-82. doi: 10.1271/bbb.62.1476. PMID: 9757551.

Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*. 2020;8(4):573. Published 2020 Apr 15. doi:10.3390/microorganisms8040573.

Van Wijck K, Lenaerts K, Grootjans J, Wijnands KA, Poeze M, van Loon LJ, Dejong CH, Buurman WA. Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Jul 15;303(2):G155-68. doi: 10.1152/ajpgi.00066.2012.

Vega-Bautista A, de la Garza M, Carrero JC, Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Drago-Serrano ME. The Impact of Lactoferrin on the Growth of Intestinal Inhabitant Bacteria. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 23;20(19). pii: E4707. doi: 10.3390/ijms20194707.

Vega-Bautista A, Carrizales-Luna JE, Cruz-Hernández TR, Campos-Rodríguez R, Drago-Serrano Maria Elisa. Gut Mucopolysaccharides in Stressed Mice Treated with Bovine Lactoferrin. Sept 4-6, 2019. Mucosal Immunology Symposium. FES Iztacala, Tlalnepantla Edo Mex. Mexico.

Watanabe Y, Arase S, Nagaoka N, Kawai M, Matsumoto S. Chronic Psychological Stress Disrupted the Composition of the Murine Colonic Microbiota and Accelerated a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150559. Published 2016 Mar 7. doi:10.1371/journal.pone.0150559.

Wang SX, Wu WC. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 7;11(13):2016-21. doi: 10.3748/wjg.v11.i13.2016. PMID: 15800998; PMCID: PMC4305729.

Wang S, Zhou J, Xiao D, Shu G, Gu L. Bovine Lactoferrin Protects Dextran Sulfate Sodium Salt Mice Against Inflammation and Impairment of Colonic Epithelial Barrier



by Regulating Gut Microbial Structure and Metabolites. *Front Nutr.* 2021;8:660598. Published 2021 Apr 16. doi:10.3389/fnut.2021.660598.

Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73(16):5261-5267; doi: 10.1128/AEM.00062-07 [PMID: 17586664].

Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, Theodorou V, Dekker J, Méheust A, de Vos WM, Mercenier A, Nauta A, Garcia-Rodenas CL. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017 Mar 1;312(3):G171-G193. doi: 10.1152/ajpgi.00048.2015. Epub 2016 Dec 1. PMID: 27908847; PMCID: PMC5440615.

Xu D, Gao J, Gilliland M 3rd, Wu X, Song I, Kao JY, Owyang C. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology.* 2014 Feb;146(2):484-96.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.026. Epub 2013 Oct 22. PMID: 24161699; PMCID: PMC3939606.

Xu M, Wang C, Krolick KN, Shi H, Zhu J. Difference in post-stress recovery of the gut microbiome and its altered metabolism after chronic adolescent stress in rats. *Sci Rep.* 2020 Mar 3;10(1):3950. doi: 10.1038/s41598-020-60862-1.

Wen Yongping, He Qiuwen, Ma Da, Hou Qiangchuan, Zhang Heping, Kwok Lai-Yu. An intact gut microbiota may be required for lactoferrin-driven immunomodulation in rats, *Journal of Functional Foods*, Volume 39, 2017, Pages 268-278, ISSN 1756-4646.

Zafar H, Saier MH Jr. Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1-20. doi:10.1080/19490976.2020.1848158.

Zhai S, Zhu L, Qin S, Li L. Effect of lactulose intervention on gut microbiota and short chain fatty acid composition of C57BL/6J mice. *Microbiologyopen.* 2018 Dec;7(6):e00612. doi: 10.1002/mbo3.612.

Zhu HZ, Liang YD, Ma QY, Hao WZ, Li XJ, Wu MS, Deng LJ, Li YM, Chen JX. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota. *Biomed Pharmacother.* 2019 Apr;112:108621. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108621.

## **ANEXOS**

### **1) Material y reactivos**

DNeasy® PowerSoil (Cat. no. 12888-100 Hilden, Alemania)

ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Cat. no. D4300T California, U.S.A.)

SOFLORAN® Isoflurano PiSA (Guadalajara, México)

Caldo tioglicolato NIH (cat No.211721 BD Bioxon Cuautitlan Izcalli Edo. Méx)

TSA (agar soya tripticaseina) (cat 7172 MDC LAB).

MRS medio de cultivo (Man, Rogosa, Sharpe) para lactobacilos (cat No. 288210 BD Difco Sparks MD, USA).

lactoferrina bovina (NutriScience Innovations, LLC Trumbul Connecticut, USA)

### **2) Equipo**

Microcentrífuga (Eppendorf 5418 Hamburgo, Alemania)

Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5415 Hamburgo, Alemania)

Fotodocumentador (Bio Rad Universal Hood II California, U.S.A.)

Biofotómetro (Eppendorf BioPhotometer plus Hamburgo, Alemania)

Balanza analítica (Precisa 320XB Santiago de Querétaro, México)

Campana de flujo laminar (NUAIRE 126-400 Plymouth, U.S.A.)

Termociclador (Eppendorf Mastercycler personal Hamburgo, Alemania)

Microscopio (Primo Star ZEISS Jena, Alemania)

### **3) Protocolo de extracción de mgDNA (kits)**

El procedimiento empleado para la extracción del mgDNA de las muestras de heces se realizó según el manual del kit comercial, el cual se puede consultar en la página oficial de *DNeasy® PowerSoil* ([qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit/](http://qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit/).)

El procedimiento empleado para la extracción del mgDNA de las muestras de colon se realizó según el manual del kit comercial, el cual se puede consultar en la página

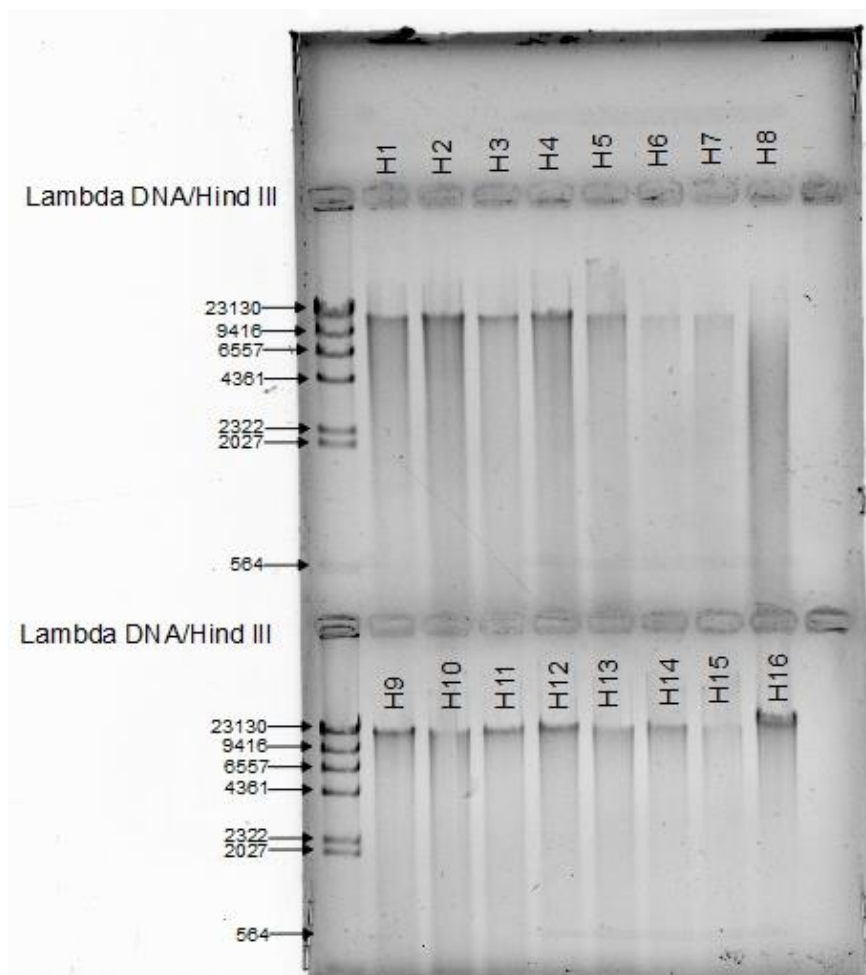
oficial de *ZymoBIOMICS™* DNA ([zymoresearch.com/products/zymobiomics-dna-miniprep-kit](http://zymoresearch.com/products/zymobiomics-dna-miniprep-kit)).

#### 4) Concentración y pureza del mgDNA secuenciado

**Tabla 11** Muestra los parámetros de calidad evaluados para cada una de las muestras procesadas en este trabajo, la muestra, el código, la concentración y los parámetros de pureza 260/280 y 260/230.

<b>Muestra</b>	<b>Código</b>	<b>Conc. (ng/uL)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Str 1</b>	<b>H1</b>	<b>64</b>	<b>1.81</b>	<b>1.73</b>
<b>Str 2</b>	<b>H2</b>	<b>109</b>	<b>1.81</b>	<b>1.76</b>
<b>Str 3</b>	<b>H3</b>	<b>54</b>	<b>1.89</b>	<b>2.03</b>
<b>Str 4</b>	<b>H4</b>	<b>112</b>	<b>1.71</b>	<b>1.62</b>
<b>Ctrl 1</b>	<b>H5</b>	<b>23</b>	<b>1.8</b>	<b>1.73</b>
<b>Ctrl 2</b>	<b>H6</b>	<b>54</b>	<b>1.85</b>	<b>1.85</b>
<b>Ctrl 3</b>	<b>H7</b>	<b>35</b>	<b>1.59</b>	<b>1.23</b>
<b>Ctrl 4</b>	<b>H8</b>	<b>102</b>	<b>1.82</b>	<b>1.93</b>
<b>Str bLf 1</b>	<b>H9</b>	<b>62</b>	<b>1.82</b>	<b>1.83</b>
<b>Str bLf 2</b>	<b>H10</b>	<b>80</b>	<b>1.84</b>	<b>2.03</b>
<b>Str bLf 3</b>	<b>H11</b>	<b>44</b>	<b>1.87</b>	<b>1.95</b>
<b>Str bLf 4</b>	<b>H12</b>	<b>57</b>	<b>1.91</b>	<b>2.25</b>
<b>BLf 1</b>	<b>H13</b>	<b>68</b>	<b>1.73</b>	<b>1.71</b>
<b>bLf 2</b>	<b>H14</b>	<b>35</b>	<b>1.83</b>	<b>1.75</b>
<b>bLf 3</b>	<b>H15</b>	<b>20</b>	<b>1.78</b>	<b>1.70</b>
<b>bLf 4</b>	<b>H16</b>	<b>72</b>	<b>1.83</b>	<b>1.84</b>
<b>Colon 1</b>	<b>C17</b>	<b>61</b>	<b>1.93</b>	<b>1.82</b>
<b>Colon 2</b>	<b>C18</b>	<b>63</b>	<b>1.82</b>	<b>1.73</b>
<b>Colon 3</b>	<b>C19</b>	<b>53</b>	<b>1.68</b>	<b>1.55</b>
<b>Colon 4</b>	<b>C20</b>	<b>192</b>	<b>2.02</b>	<b>1.82</b>
<b>Colon 5</b>	<b>C21</b>	<b>105</b>	<b>1.83</b>	<b>2.06</b>
<b>Colon 6</b>	<b>C22</b>	<b>420</b>	<b>2.05</b>	<b>1.48</b>
<b>Colon 7</b>	<b>C23</b>	<b>167</b>	<b>1.87</b>	<b>2.20</b>
<b>Colon 8</b>	<b>C24</b>	<b>22</b>	<b>1.99</b>	<b>1.86</b>
<b>Colon 9</b>	<b>C25</b>	<b>33</b>	<b>1.83</b>	<b>1.53</b>
<b>Colon 10</b>	<b>C26</b>	<b>19</b>	<b>1.85</b>	<b>1.18</b>
<b>Colon 11</b>	<b>C27</b>	<b>127</b>	<b>1.84</b>	<b>2.09</b>
<b>Colon 12</b>	<b>C28</b>	<b>73</b>	<b>1.90</b>	<b>1.81</b>
<b>Colon 13</b>	<b>C29</b>	<b>50</b>	<b>1.93</b>	<b>1.78</b>
<b>Colon 14</b>	<b>C30</b>	<b>47</b>	<b>1.97</b>	<b>1.12</b>
<b>Colon 15</b>	<b>C31</b>	<b>67</b>	<b>1.98</b>	<b>1.90</b>
<b>Colon 16</b>	<b>C32</b>	<b>60</b>	<b>1.87</b>	<b>1.70</b>

## 5) Gel de las muestras de mgDNA secuenciado



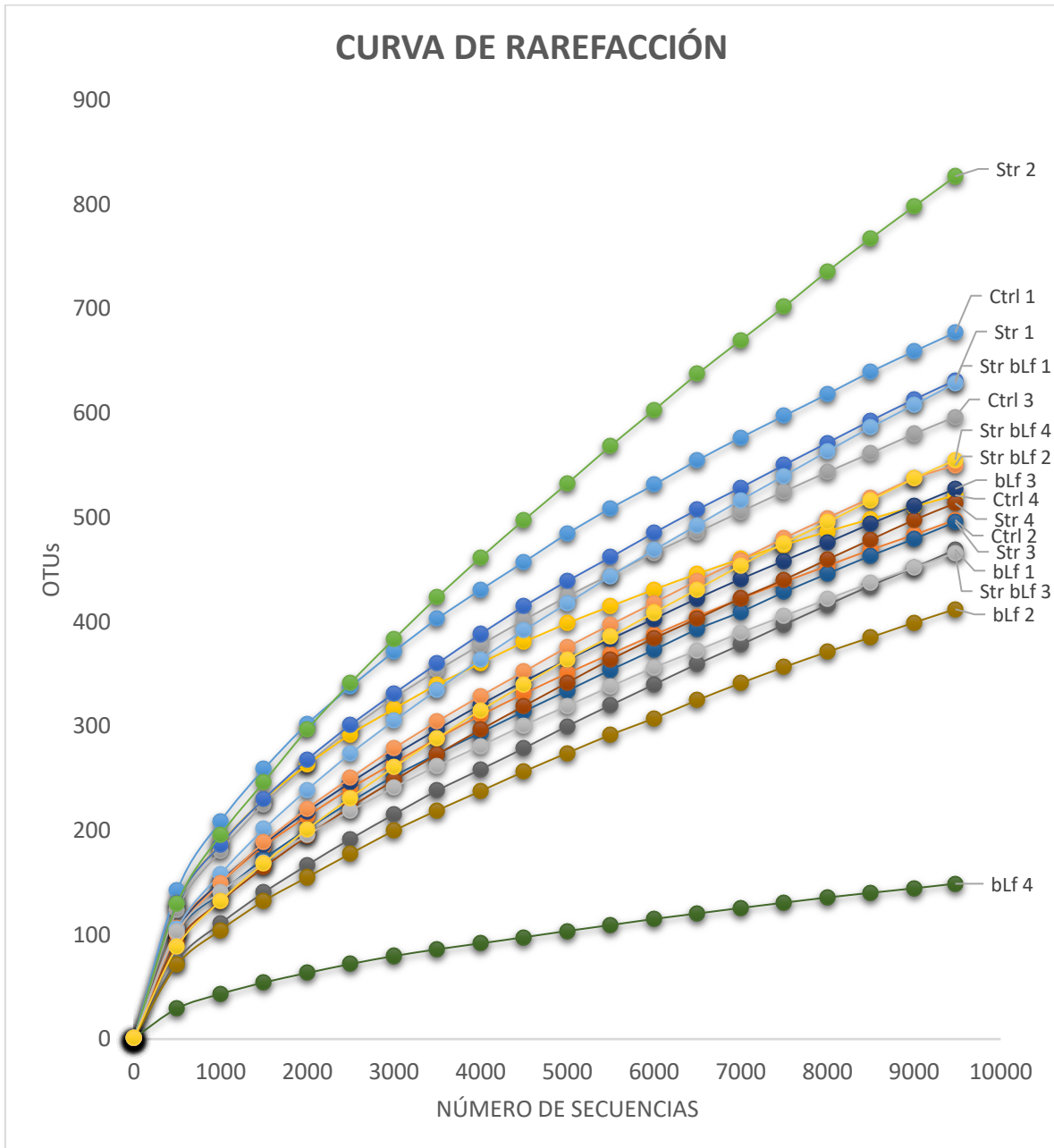
**Figura 17** Gel de agarosa al 1%p/v en donde se muestra la integridad de las 16 muestras de mgDNA de las muestras de heces. El marcador de peso molecular *Lambda DNA/HindIII Marker* indica que el tamaño del mgDNA extraído es de 23130 PB.

## 6) Primers para amplificar el gen 16S rRNA

**Tabla 12** Primers empleados para la amplificación del gen 16S rRNA, de la marca T4OLIGO® con sede Euquerio Guerrero #278, Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

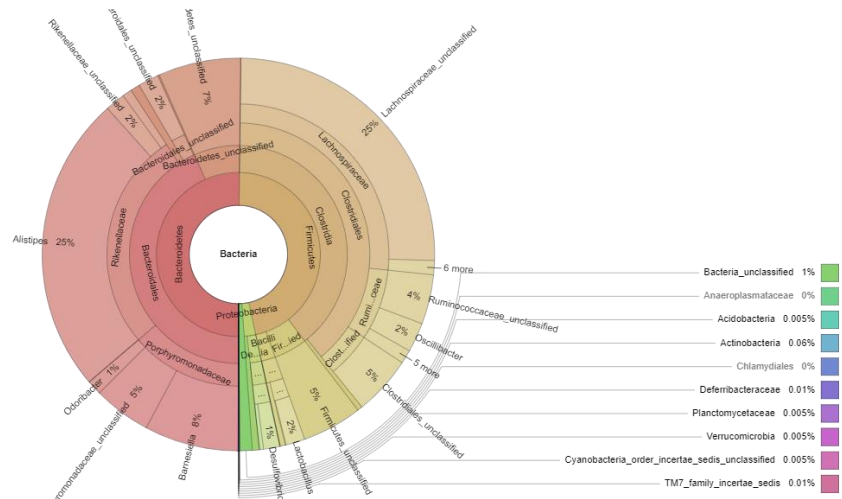
Primer	Secuencia
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCA
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

## 7) Curva de rarefacción

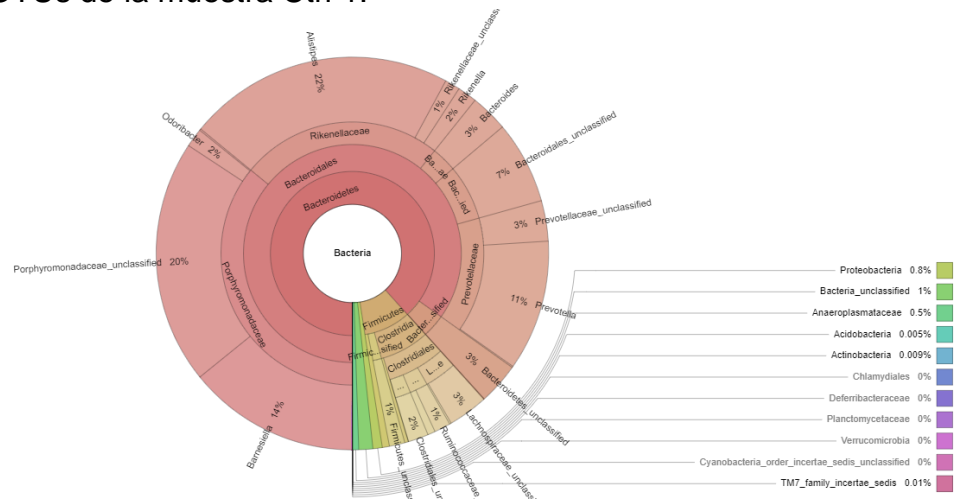


**Figura 18** Se muestra la curva de rarefacción para cada una de las muestras de heces.

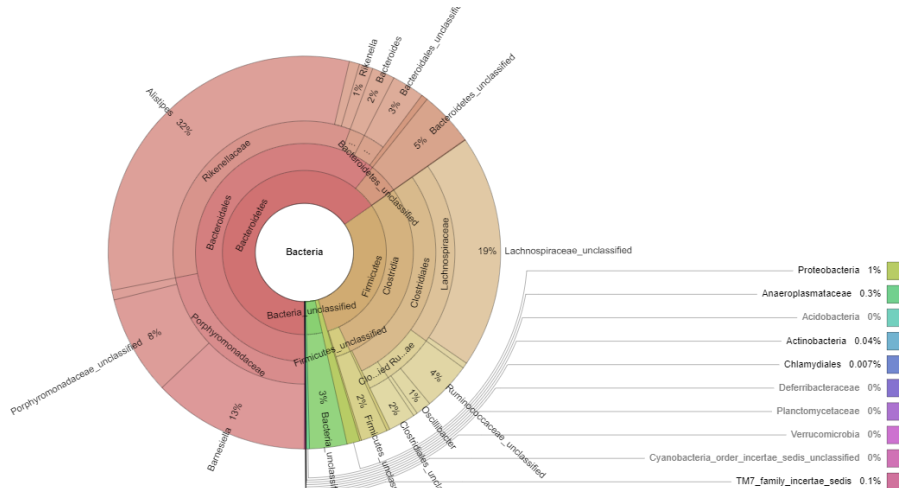
## 8) Gráficos de Krona de bacterias identificadas en las muestras de heces



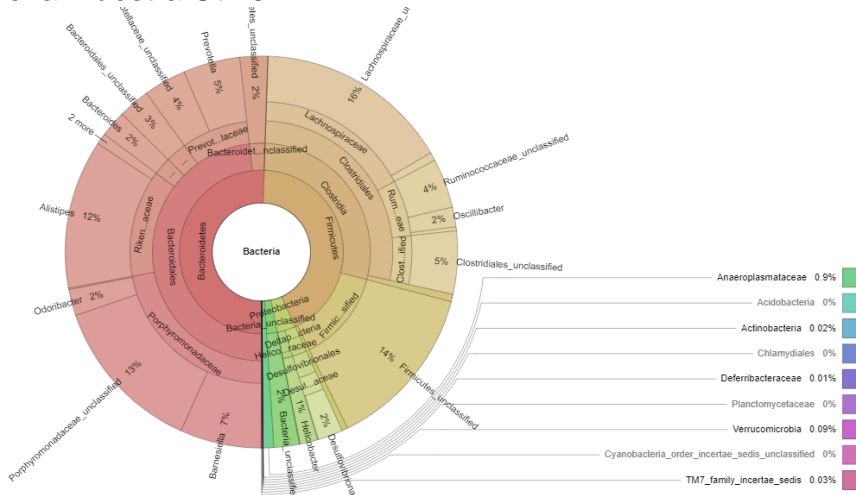
**Figura 19** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Ctrl 1.



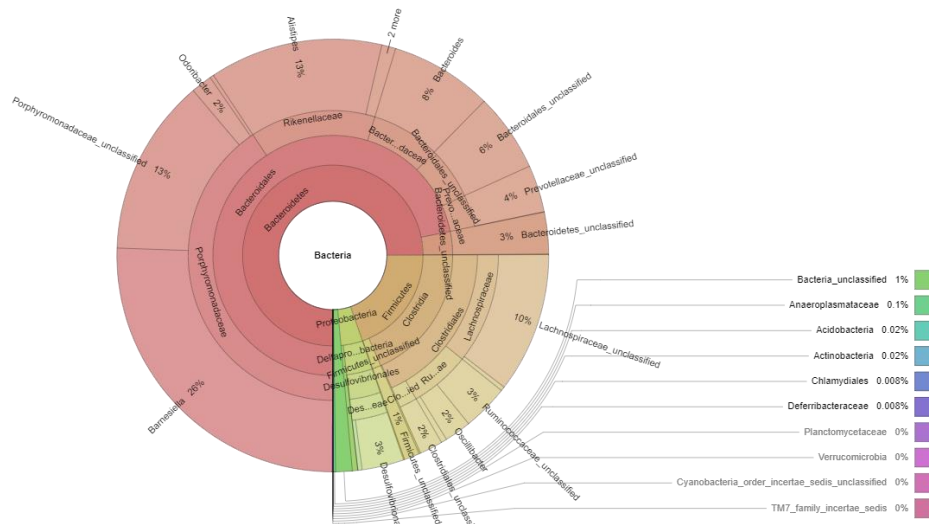
**Figura 20** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Ctrl 2



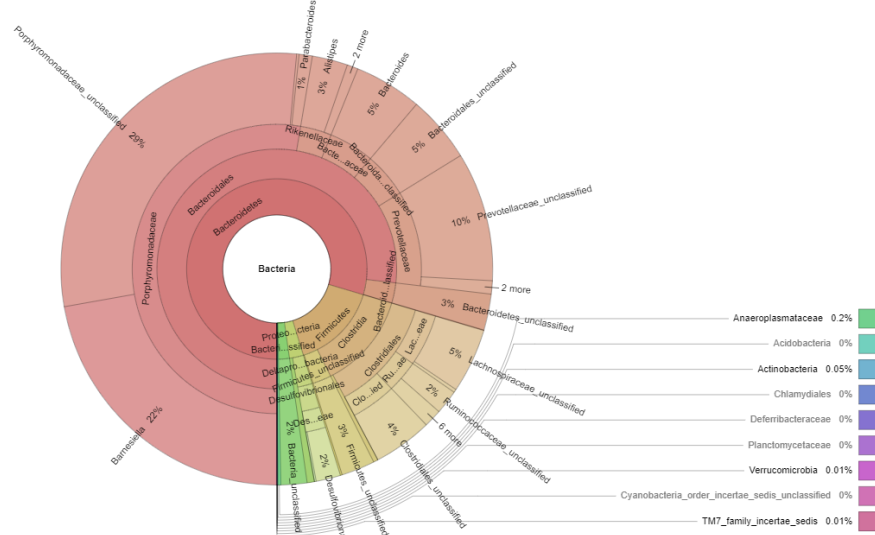
**Figura 21** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Ctrl 3



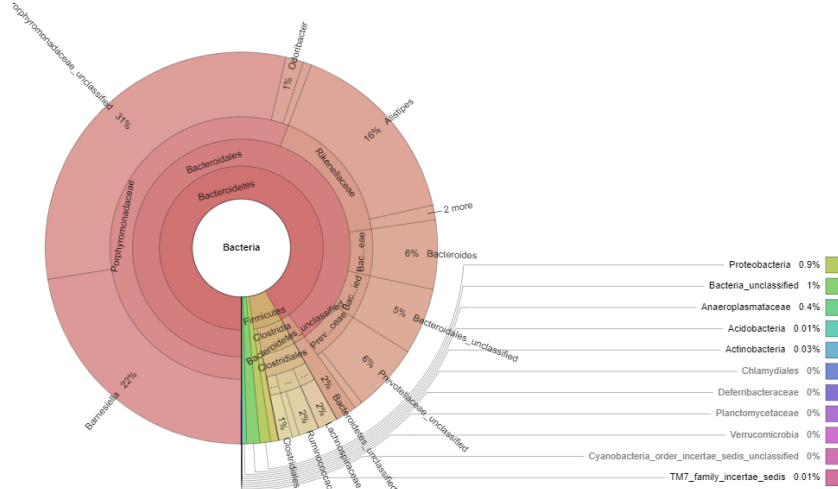
**Figura 22** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Ctrl 4



**Figura 23** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str 1

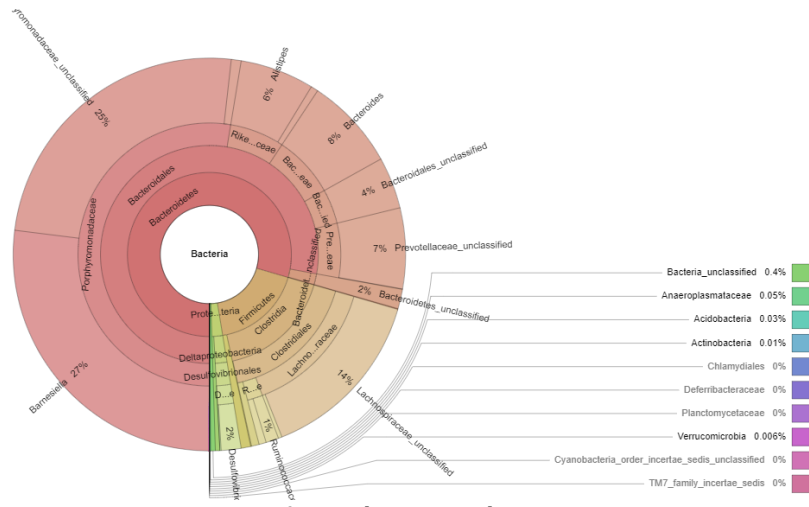


**Figura 24** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str 2

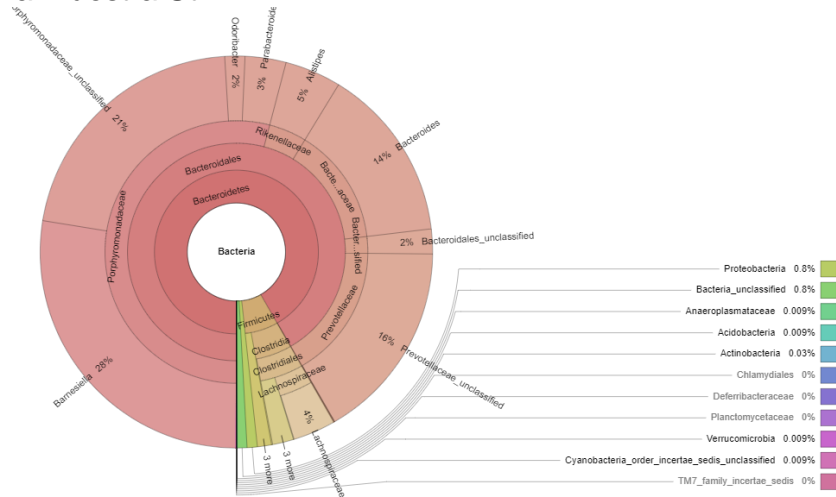


**Figura 25** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str 3

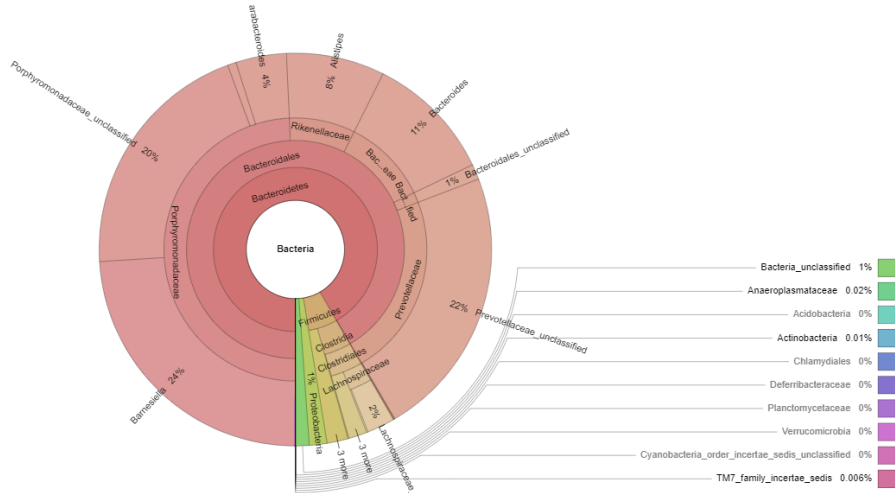




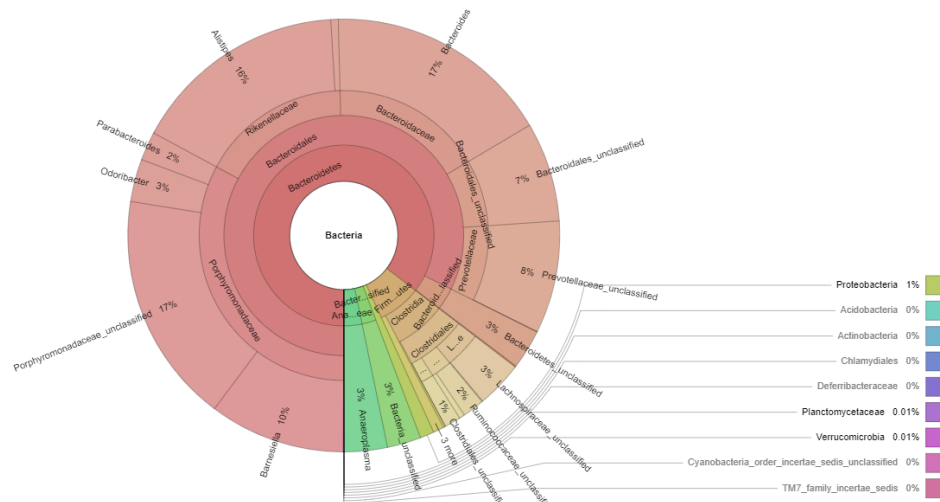
**Figura 26** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str 4



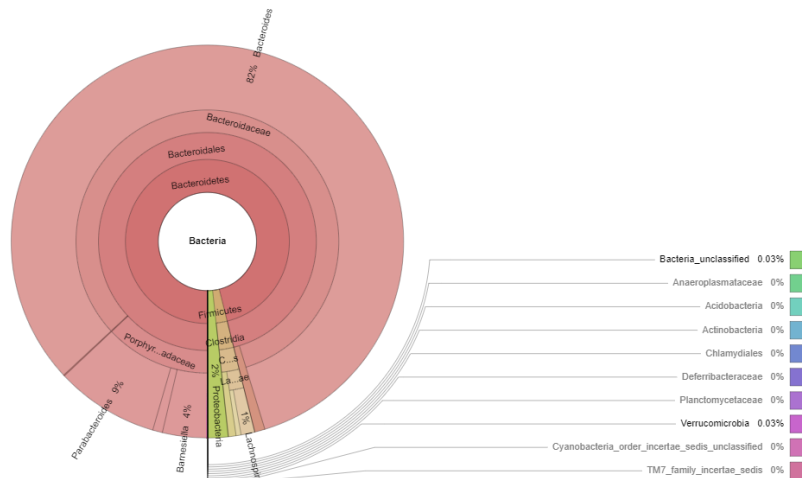
**Figura 27** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra bLf 1



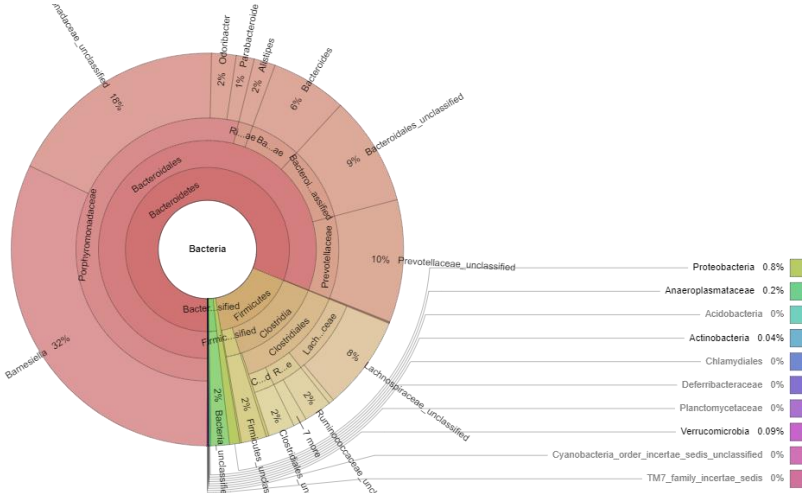
**Figura 28** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra bLf 2



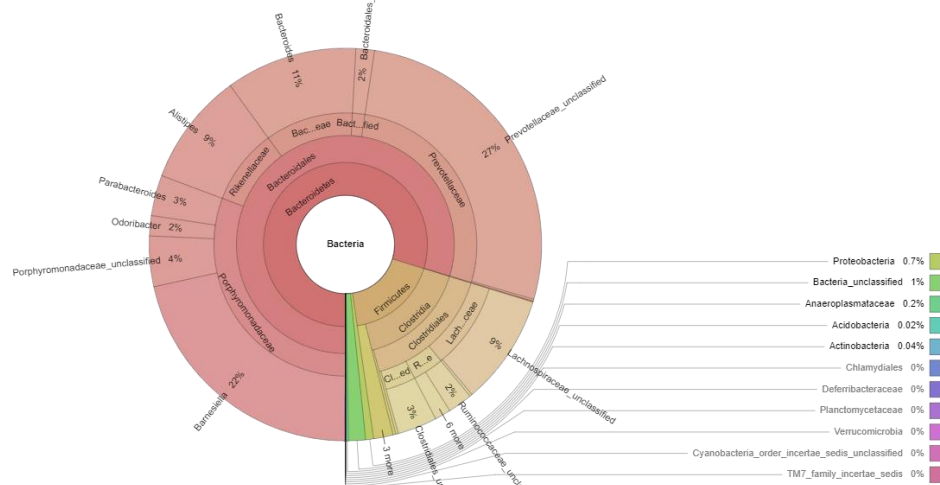
**Figura 29** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra bLf 3



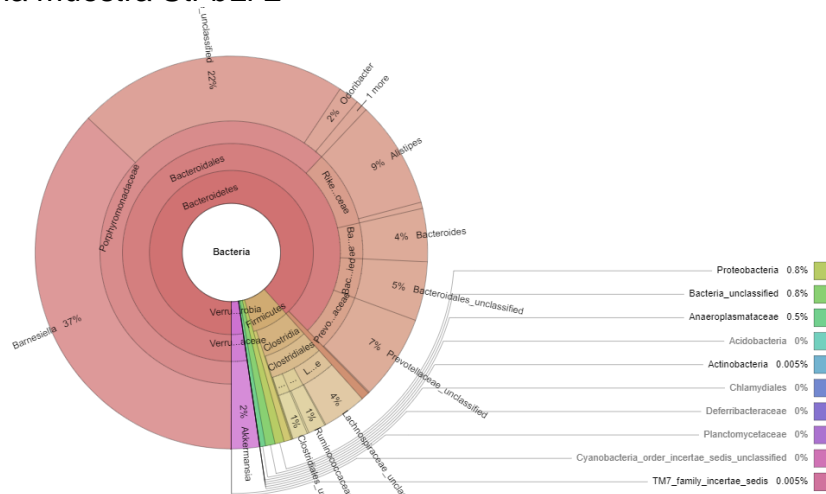
**Figura 30** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra bLf 4



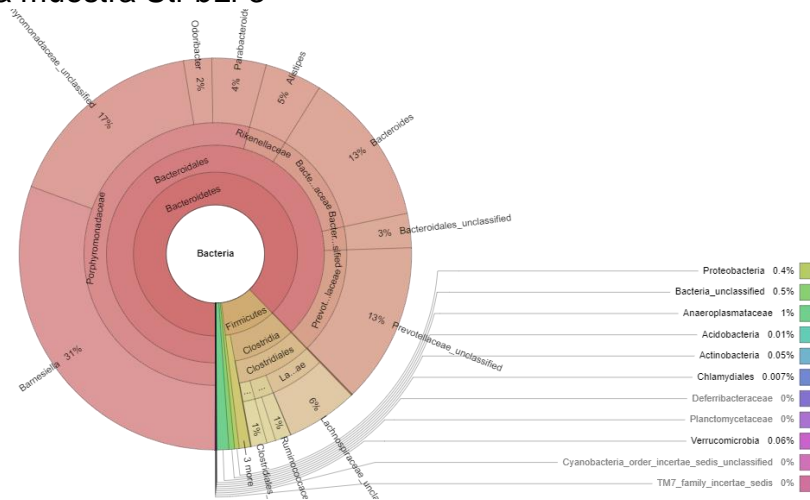
**Figura 31** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str bLf 1



**Figura 32** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str bLf 2



**Figura 33** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str bLf 3



**Figura 34** Gráfico de Krona, muestra la identificación taxonómica y la abundancia relativa de las OTUs de la muestra Str bLf 4

## 9) Presentación de avances en el Congreso COIFFA-2020



**LA CONFERENCIA IBEROAMERICANA DE FACULTADES DE FARMACIA**

**Otorga el presente:**  
**DIPLOMA DE AGRADECIMIENTO A:**

*Molotla Torres Daniel Efraín; Aguirre Garrido José Félix; Guzmán Mejía Fabiola;  
Vega Bautista Alan; Drago Serrano María Elisa*

---

*Por su destacada participación en la Expo Póster COIFFA- 2020  
Con el trabajo*

**“EVALUACIÓN DE BACTERIAS INTESTINALES EN RATONES SOMETIDOS A ESTRÉS”.**

**SIMPOSIO IBEROAMERICANO EN LÍNEA COIFFA 2020:  
ESCENARIOS DE FORMACIÓN Y CAPACITACIÓN FARMACÉUTICA,  
EN EL SECTOR PRODUCTIVO Y DE SERVICIOS, ANTE LA NUEVA REALIDAD.**

*Con una duración de 8 horas.*

Guatemala, 13 y 14 de noviembre de 2020.

  
Dr. Félix Daniel Andueza  
Presidente  
-COIFFA-

  
Dr. Elfego Rolando López García  
Secretario General  
-COIFFA-