

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Efecto de sarolaner en el microbioma intestinal de perros de la Ciudad de México”

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

José David Torres Cruz

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

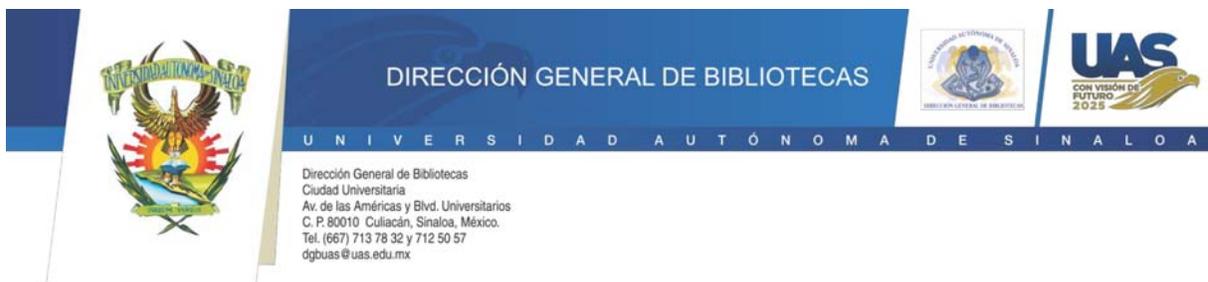
CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ariadna Flores Ortega

ASESORES:

Dr. Camilo Romero Núñez
Dra. Nohemí Castro Del Campo

Culiacán, Sinaloa, México; a 10 julio de 2024.



UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial Compartir Igual, 4.0 Internacional



ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JOSÉ DAVID TORRES CRUZ**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y
HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**(SELLO DE
POSGRADO)**

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO



CO-DIRECTORA

DRA. ARIADNA FLORES ORTEGA



ASESOR

DR. CAMILO ROMERO NÚÑEZ

ASESORA

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

CULIACÁN, SINALOA, 10 DE JULIO DE 2024

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES.....	6
Microbioma intestinal	6
Bacterias intestinales de los perros.....	6
Funciones del microbioma intestinal.	7
Disbiosis.	8
Efecto de la administración de fármacos en el microbioma intestinal.....	9
Isoxazolinás.....	10
Efecto antibacteriano de las isoxazolinás.....	11
Sarolaner.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Área de estudio.....	18
Tipo de estudio y tamaño de muestra.	18
Recolección de muestras.....	19
Extracción y cuantificación de ADN metagenómico.	19
Secuenciación y análisis bioinformático.....	19
Preparación de la biblioteca de secuenciación.	19
Secuenciación.	19
Análisis bioinformático.	20
Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Perro 1.	21
Perros incluidos en el estudio.	26

CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Taxones bacterianos importantes en el microbioma fecal de perros, organizados según la taxonomía de la base de datos de Greengenes	7
2	Afecciones que pueden provocar disbiosis intestinal	9
3	Dosis de comprimidos de sarolaner para perros	12
4	Raza, edad, peso y sexo de los perros incluidos en el estudio	18
5	Análisis de diversidad alfa de las comunidades bacterianas presentes en el microbioma intestinal de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner	27
6	Efecto de sarolaner en la abundancia relativa de las familias de bacterias intestinales de cinco perros	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Perfiles taxonómicos basados en el phylum de bacterias encontradas en una muestra de heces del perro 1	21
2	Perfiles taxonómicos basados en el género de bacterias encontradas en una muestra de heces del perro 1	23
3	Perfiles taxonómicos basados en la especie de bacterias encontradas en una muestra de heces del perro 1	24
4	“Heat map” de los ASVs de bacterias más abundantes en una muestra de heces del perro 1	25
5	Curvas de rarefacción del número de especies observado a nivel de ASV de la diversidad bacteriana en el microbioma intestinal de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner	26
6	Diagrama de barras que representa la abundancia relativa de los phyla bacterianos detectados en el microbioma intestinal de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner	28
7	Diagrama de barras que muestra la abundancia relativa de las familias bacterianas presentes en las heces de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner	30

RESUMEN

Efecto de sarolaner en el microbioma intestinal de perros de la Ciudad de México

José David Torres Cruz

El aparato digestivo de los mamíferos alberga una microbiota que incluye bacterias, arqueas, hongos, protozoarios y virus. El contenido genético de estos microorganismos se define como microbioma intestinal. De los componentes del microbioma intestinal, el bacteriano es el más grande y realiza funciones metabólicas e inmunológicas vitales. Los cambios en la composición de la microbiota y su consecuente función anormal (disbiosis) se han relacionado con enfermedades gastrointestinales y sistémicas. Estos cambios pueden ser provocados por la administración de fármacos. Sarolaner es un fármaco de la familia de las isoxazolinas que es indicado en perros para el tratamiento de infestaciones por pulgas, garrapatas y ácaros. Considerando el efecto antibacteriano in vitro que tienen estos fármacos, se planteó este estudio cuyo objetivo fue determinar el efecto de la administración oral de sarolaner en el microbioma intestinal de perros sanos de la Ciudad de México. La presente investigación se realizó en el Hospital Veterinario DERMAVET, el cual se encuentra ubicado en la Ciudad de México, México. En este estudio experimental se muestrearon por conveniencia a cinco perros clínicamente sanos de razas, edades y pesos diferentes a los que se les administró sarolaner por vía oral a dosis única de 2-4 mg/kg según el peso de cada perro. Se realizaron dos muestreos de heces de los perros (días 1 y 30 (antes y después del tratamiento)), recolectando una muestra por perro por día para analizar en total 10 muestras de heces. Los resultados mostraron la disminución de la diversidad y cantidad de bacterias de las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae del microbioma intestinal de los perros tratados. Se concluyó que estos cambios podrían influir en su salud considerando que estos microorganismos presentan funciones metabólicas e inmunológicas importantes y pertenecen al phylum Bacteroidetes, uno de los 3 phyla bacterianos más representativos de los perros sanos.

Palabras clave: microbioma intestinal, sarolaner, perros, efecto.

ABSTRACT

Effect of sarolaner on the intestinal microbiome of dogs in Mexico City

José David Torres Cruz

The mammalian digestive tract harbors a microbiota that includes bacteria, archaea, fungi, protozoa and viruses. The genetic content of these microorganisms is defined as the gut microbiome. Of the components of the gut microbiome, the bacterial microbiome is the largest and performs vital metabolic and immunological functions. Changes in the composition of the microbiota and its consequent abnormal function (dysbiosis) have been linked to gastrointestinal and systemic diseases. These changes can be triggered by the administration of drugs. Sarolaner is a drug of the isoxazoline family that is indicated in dogs for the treatment of flea, tick and mite infestations. Considering the *in vitro* antibacterial effect of these drugs, the objective of this study was to determine the effect of oral administration of sarolaner on the intestinal microbiome of healthy dogs in Mexico City. The present investigation was carried out at the DERMAVET Veterinary Hospital, which is located in Mexico City, Mexico. In this experimental study, five clinically healthy dogs of different breeds, ages and weights were sampled by convenience and administered sarolaner orally at a single dose of 2-4 mg/kg according to the weight of each dog. Two stool samples were taken from the dogs (days 1 and 30 (before and after treatment)), collecting one sample per dog per day to analyze a total of 10 stool samples. The results showed a decrease in the diversity and quantity of bacteria of the Bacteroidaceae and Prevotellaceae families in the intestinal microbiome of the treated dogs. It was concluded that these changes could influence their health considering that these microorganisms present important metabolic and immunological functions and belong to the phylum Bacteroidetes, one of the 3 most representative bacterial phyla of healthy dogs.

Keywords: intestinal microbiome, sarolaner, dogs, effect.

INTRODUCCIÓN

El microbioma intestinal está compuesto por bacterias, arqueas y organismos eucariotas que residen en el tracto gastrointestinal (GI) ([García-Mazcorroa y Minamotob, 2013](#)). [Pilla y Suchodolski \(2021\)](#) informaron que los microorganismos contribuyen al metabolismo del huésped, protegen contra los patógenos y regulan al sistema inmunitario; por su parte, los metabolitos bacterianos regulan vías importantes como la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), la desconjugación y deshidroxilación de ácidos biliares, la producción de neurotransmisores como la serotonina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA), y compuestos antiinflamatorios como los índoles, ejerciendo un efecto sobre órganos como el cerebro, la piel y los músculos.

Las funciones del microbioma intestinal pueden resultar afectadas por cambios en su composición, lo cual se define como disbiosis intestinal, y provoca una alteración de las vías metabólicas microbianas ([Ziese y Suchodolski, 2021](#)). [Barko et al. \(2018\)](#) demostraron que la administración de fármacos puede afectar esta composición. Uno de los medicamentos cuyo efecto en el microbioma ha sido estudiado es el metronidazol, el cual es un antibiótico y antiprotozoario que se prescribe en pequeñas especies para el tratamiento de infecciones anaerobias, giardiasis y otras infecciones protozoarias; este medicamento puede tener efectos sobre el sistema inmunitario modulando las respuestas inmunitarias mediadas por células ([Tennat, 2012](#)). Un estudio realizado por [Igarashi et al. \(2014\)](#) en perros sanos indica que la reducción de bacterias patógenas y el aumento de bacterias beneficiosas mediante la administración de metronidazol pueden ser benéficos para promover la salud GI.

Las isoxazolininas son una clase de ectoparasiticidas con actividad inhibitoria de los canales de cloruro activados por el glutamato y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) del sistema nervioso de los invertebrados ([Zhou et al., 2022](#)). De acuerdo con estos autores, los miembros de esta clase son afoxolaner, fluralaner, sarolaner y lotilaner, los cuales tienen actividad contra pulgas, garrapatas y ácaros. El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la administración oral de sarolaner en el microbioma intestinal de perros sanos de la Ciudad de México.

ANTECEDENTES

Microbioma intestinal

El tracto GI de los mamíferos alberga una microbiota muy compleja que incluye bacterias, arqueas, hongos, protozoos y virus (principalmente bacteriófagos). El contenido genético de estos microorganismos se define como microbioma intestinal ([Suchodolski, 2011](#)).

El microbioma intestinal es un ecosistema conformado por muchas especies de microorganismos que presentan funciones en común, lo cual representa una importante característica evolutiva, ya que si una sola especie realizara una función esencial, cualquier afección (como un tratamiento con antibióticos) a esa especie privaría al huésped de esa función. Por lo tanto, son necesarias múltiples especies para la resistencia del microbioma y una mayor riqueza de especies se considera un indicador de un microbioma saludable ([Lozupone et al., 2012](#)). [Pilla y Suchodolski \(2021\)](#) a través de un análisis de literatura concluyeron que, de los componentes del microbioma intestinal, el bacteriano es el más grande y presenta funciones digestivas esenciales, como la fermentación de las fibras.

Bacterias intestinales de los perros

El microbioma intestinal de los perros sanos está codominado por tres phyla bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes y Fusobacteria ([Middelbos et al., 2010](#); [Hand et al., 2013](#)), los cuales se muestran en el cuadro 1. Dentro de esta comunidad bacteriana principal, una gran cantidad de taxones importantes pertenecen al phylum Firmicutes, incluyendo Clostridia y Bacilli ([García-Mazcorro et al., 2011](#); [García-Mazcorro et al., 2012](#)), muchos de los cuales son productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como *Faecalibacterium*. Bacteroidetes es otro phylum importante, incluyendo *Prevotella* y *Bacteroides*, cuya abundancia es muy variable entre los perros ([Vázquez-Baeza et al., 2016](#)).

El género *Fusobacterium* se asocia normalmente con la salud de los perros, en cuyo tracto GI se suelen encontrar especies como *F. mortiferum* y *F. perfoetens* ([Kim et al., 2019](#)).

Las proteobacterias y actinobacterias también se identifican con frecuencia y suelen colonizar el intestino delgado (ID). En condiciones fisiológicas se presentan en menor número que el resto de los phyla. Por ejemplo, los miembros de la familia Enterobacteriaceae (como *Escherichia coli*) son anaerobios facultativos, lo que les permite aprovechar el oxígeno disponible en el ID ([Pilla y Suchodolski, 2021](#)).

Cuadro 1. Taxones bacterianos importantes en el microbioma fecal de perros, organizados según la taxonomía de la base de datos Greengenes.

Phylum	Clase	Familia	Género/Especie		
Actinobacteria	Coriobacteriia	Coriobacteriaceae	<i>Collinsella</i>		
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>		
		Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>		
Firmicutes	Clostridia	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>		
		Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		
		Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus</i>		
		Lachnospiraceae	<i>Blautia</i>		
	Bacilli	Veillonellaceae	<i>Megamonas</i>		
		Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>		
		Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>		
		Turicibacteraceae	<i>Turicibacter</i>		
		Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>
		Proteobacteria	Betaproteobacteria	Alcaligenaceae	<i>Sutterella</i>
Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae		<i>E. coli</i>		

([Pilla y Suchodolski, 2021](#)).

Funciones del microbioma intestinal.

La composición y la actividad de la microbiota intestinal dependen de una compleja interacción entre el genoma, la nutrición y el estilo de vida del huésped ([Nicholson et al., 2012](#)). Por su parte, el genoma microbiano confiere capacidades metabólicas que superan las del organismo huésped por sí solo, lo cual implica que el microbioma intestinal sea un participante fundamental en la fisiología del huésped ([Barko et al., 2018](#)). Esta relación mutuamente beneficiosa entre el organismo y su microbiota tiene como resultado la producción de metabolitos microbianos, los cuales contribuyen a la aptitud evolutiva del huésped ([Hosokawa et al., 2006](#)).

El microbioma participa en procesos fisiológicos e inmunológicos vitales, como la homeostasis energética y el metabolismo, la síntesis de vitaminas y otros nutrientes, la señalización endocrina, la prevención de la colonización de enteropatógenos, la regulación de la función inmunitaria y el metabolismo de los compuestos xenobióticos ([Nicholson et al., 2012](#); [Wilson y Nicholson, 2015](#)).

La microbiota determina el desarrollo del sistema inmunitario y éste, a su vez, determina la composición de la microbiota. Esta interrelación entre los microbios y el sistema inmunitario del huésped implica una amplia variedad de vías de señalización en las que intervienen diversas clases de moléculas. Estos procesos mediados por el sistema inmunitario en conjunto con las interacciones químicas entre el microbio y el huésped, actúan sobre estructuras digestivas, musculares y nerviosas ([Nicholson y Wilson, 2003](#)).

El organismo y su microbiota intestinal producen diversas moléculas durante el metabolismo de alimentos y compuestos xenobióticos, las cuales desempeñan funciones esenciales en la interacción química entre las células del huésped y sus simbiontes microbianos ([Nicholson et al., 2012](#)). La fibra dietética (hidratos de carbono complejos) puede ser digerida y posteriormente fermentada en el colon por los microbios intestinales en AGCC como acetato y propionato, que son transportados por el torrente sanguíneo a diversos órganos en los que son utilizados como sustratos para la oxidación, la síntesis de lípidos y el metabolismo energético, en particular por los hepatocitos, que utilizan el propionato para la gluconeogénesis ([Wong et al., 2006](#); [Samuel et al., 2008](#)). [Grider y Piland \(2007\)](#) demostraron que los AGCC estimulan la motilidad y el tránsito intestinal.

Disbiosis.

La mayoría de los perros con enfermedades GI presentan disbiosis concurrente ([AlShawaqfeh et al., 2017](#); [Marsilio et al., 2019](#)). Aunque los patrones de disbiosis generalmente difieren entre las enfermedades agudas y crónicas, existen similitudes en todas las condiciones ([Jalanka-Tuovinen et al., 2011](#)), como el aumento de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, que es una característica distintiva de disbiosis en perros ([Vázquez-Baeza et al., 2016](#)) y se asocia con enfermedades tanto intestinales como extraintestinales ([Xenoulis et al., 2008](#); [Suchodolski et al., 2010](#); [Minamoto et al., 2019](#)).

El microbioma es dinámico y está sujeto a cambios durante la vida del huésped en respuesta a factores como la dieta, el medio ambiente, los tratamientos médicos y los estados de enfermedad ([Barko et al., 2018](#)).

Las causas por las que se desarrolla la disbiosis se mencionan en el cuadro 2. La disbiosis puede causar una alteración de la barrera intestinal, lo que aumenta la susceptibilidad para la translocación de microorganismos patógenos, toxinas o antígenos alimentarios. El sistema inmunitario también puede resultar afectado, lo cual promueve procesos proinflamatorios ([Levy et al., 2017](#)). Los metabolitos bacterianos pueden aumentar o disminuir y, dependiendo de su actividad fisiológica, esto puede afectar a la salud del huésped ([Duboc et al., 2013](#)), provocando enteritis a través del dismetabolismo de los ácidos biliares ([Giaretta et al., 2018](#); [Guard et al., 2019](#)), la disminución de la producción de moléculas antiinflamatorias como los AGCC ([Minamoto et al., 2019](#); [Park et al., 2020](#); [Duscha et al., 2020](#)) y los indoles ([Bansal et al., 2010](#); [Waclawiková y El Aidy, 2018](#)).

Cuadro 2. Afecciones que pueden provocar disbiosis intestinal.

Anomalías anatómicas

- Asas ciegas
- Estenosis o adherencias del intestino delgado
- Resección quirúrgica de la válvula ileocecal
- Neoplasia
- Cuerpos extraños

Trastornos de motilidad

- Hipotiroidismo
- Neuropatía autonómica diabética
- Esclerodermia
- Complejos motores migratorios anormales

Disminución de la producción de ácido gástrico

- Gastritis atrófica
- Administración de fármacos supresores de la acidez (bloqueadores H₂, omeprazol)

Insuficiencia pancreática exócrina

- Disminución de la producción de factores antimicrobianos pancreáticos
- Aumento del sustrato no digerido en el lumen que estimula un sobrecrecimiento bacteriano

Enteropatías crónicas

- La enteritis favorece las condiciones aeróbicas y los cambios de pH en la mucosa
- La reducción de la capa de moco permite la adhesión de bacterias a la mucosa

Varios

- Disminución de la inmunidad de la mucosa
 - Inducida por antibióticos (metronidazol, tilosina)
 - Dietas ricas en grasas y proteínas, y deficientes en fibra (aumento de *E. coli* y *Clostridium perfringens*)
-

([Ziese y Suchodolski, 2021](#)).

Efecto de la administración de fármacos en el microbioma intestinal

Los fármacos pueden tener efectos en la composición y función de la microbiota GI de especies de mamíferos ([Liepman et al., 2022](#)). Estos efectos pueden resultar benéficos o nocivos para el huésped ([Walsh et al., 2018](#)). Los pacientes pediátricos y gerontes son los más susceptibles a presentar reacciones adversas a los fármacos ([Turnheim, 2003](#)).

Se ha determinado el efecto de la administración de fármacos en el microbioma intestinal de diversas especies. [Liepman et al. \(2022\)](#) observaron que la aplicación intravenosa de antibióticos (ceftiofur y enrofloxacin) en equinos disminuye la diversidad y cantidad bacterianas. Un estudio realizado por [Igarashi et al. \(2014\)](#) en caninos indica que la administración oral de prednisolona no provoca ningún efecto en la composición del microbioma.

Se ha determinado el efecto de la administración de metronidazol en la composición y función del microbioma intestinal de la especie canina. Un estudio realizado por [Igarashi et al. \(2014\)](#) en perros Beagle clínicamente sanos, con una media de edad de 4 años, indica que la administración oral de este fármaco a dosis de 12.5 mg/kg cada 12 horas por 14 días, disminuyó la diversidad y cantidad de bacterias

entéricas, lo cual fue revertido por completo 28 días después de interrumpir la administración del fármaco. Este estudio indica que su efecto puede mejorar la salud digestiva mediante la reducción de bacterias patógenas y el aumento de bacterias beneficiosas. [Pilla et al. \(2020\)](#) observaron que en perros sanos de entre 1 y 10 años de edad, la administración oral de esta sustancia activa a dosis de 15 mg/kg empleando la frecuencia y duración del tratamiento descrito previamente, disminuyó la cantidad de bacterias importantes para la salud GI, como las del phylum Fusobacteria, lo cual no fue revertido en su totalidad 28 días después de la interrupción del medicamento. Por lo tanto, este estudio concluye en que su prescripción en perros debe ser realizada con mayor cuidado.

Se ha determinado también el efecto de la administración de fármacos antiparasitarios en el microbioma intestinal de caninos. Un estudio realizado por [Fujishiro et al. \(2020\)](#) en perros adultos Beagle clínicamente sanos, con giardiasis y criptosporidiasis subclínicas (n=6; 3 hembras y 3 machos) (parte 1), y en perros adultos clínicamente sanos (de cualquier peso, sexo o raza con una edad superior a 9 meses e inferior a 10 años), sin giardiasis ni criptosporidiasis (n=19; grupo de tratamiento (n=9) y grupo testigo (no tratado) (n=10)) (parte 2), indica que la administración oral de un producto comercial constituido por febantel, pirantel y praziquantel a dosis de 27.8-34.2 mg/kg, 5.6-6.9 mg/kg y 5.6-6.9 mg/kg, consecutivamente, cada 24 horas por 3 días (parte 1), y la administración oral de fenbendazol a dosis de 50 mg/kg cada 24 horas por 5 días (parte 2), no provocan cambios significativos en la diversidad o en la abundancia relativa de especies bacterianas.

[Hoffman et al. \(2007\)](#) demostraron a través de un estudio in vitro que la nitazoxanida es un inhibidor no competitivo de la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) de *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*, y es débilmente activo contra la piruvato deshidrogenasa de *E. coli*. La diana bioquímica de este fármaco antiparasitario es la enzima responsable de la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil coenzima A (acetil-CoA) y CO₂ ([White, 2004](#); [Hoffman et al., 2007](#)), por lo que el ciclo del ácido tricarbóxico resulta afectado, ya que disminuye el suministro de acetil-CoA para que éste continúe, obligando al microorganismo a utilizar fuentes alternativas de acetil-CoA como la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de proteínas ([Isac et al., 2016](#)). Además, el exceso de piruvato induce acidosis debido a un aumento de las concentraciones de lactato que también induce la gluconeogénesis ([Isac et al., 2016](#)).

Isoxazolinás

Se han realizado estudios para evaluar la eficacia y seguridad de las isoxazolinás contra varios tipos de ectoparásitos, demostrando que presentan características únicas de rápida absorción, efecto ectoparasiticida prolongado y actividad de amplio espectro contra pulgas, garrapatas y ácaros. Estos ectoparasiticidas se

comercializan como tabletas palatables para caninos aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Fluralaner también está disponible en forma tópica para perros y gatos. Además de su uso aprobado por la FDA contra las pulgas y garrapatas comunes, las isoxazolininas comercializadas han demostrado experimental y clínicamente su eficacia en el tratamiento de las infestaciones por ácaros ([Zhou et al., 2022](#)).

Efecto antibacteriano de las isoxazolininas

Las isoxazolininas son heterociclos insaturados de cinco miembros que contienen tres átomos de carbono, uno de nitrógeno y átomos de oxígeno (adyacentes) entre sí ([Kotian et al., 2020](#)). Los heterociclos que contienen átomos de nitrógeno y oxígeno se consideran andamiajes útiles para la síntesis de moléculas biológicamente activas y cristales líquidos ([Kotian et al., 2016](#); [Fritsch et al., 2020](#)). Entre estas clases de compuestos, las isoxazolininas ocupan un lugar destacado en la química bioorgánica por sus diversas aplicaciones biológicas. Se ha descrito su actividad anticancerígena ([Byrappa et al., 2019](#)), antipalúdica ([Tang et al., 2020](#)), antimicrobiana ([Mohsen et al., 2018](#)), antioxidante ([Gul y Eryilmaz, 2019](#)), inhibidora de enzimas ([Rodríguez et al., 2020](#)), ectoparasiticida ([Weber y Selzer, 2016](#)) e insecticida ([Guo et al., 2019](#)).

Un estudio in vitro realizado por [Mohsen et al. \(2018\)](#) a partir de derivados de isoxazolinina indica que estos fármacos a dosis de 2 mg/mL utilizando DMSO como disolvente, muestran una actividad entre moderada y potente contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.*, siendo su diana bioquímica el sitio activo de la enzima L-glutamina: D-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (glucosamina-6-fosfato sintasa) al cual se unen a través de ligandos, interfiriendo de esta manera con la glucólisis.

Sarolaner

Sarolaner es la sustancia activa del producto comercial Simparica, el cual es un comprimido masticable con un sabor agradable ([EMA, 2015](#)).

Indicaciones de uso

Sarolaner es un acaricida e insecticida de la familia de las isoxazolininas que es indicado en perros para el tratamiento de infestaciones por pulgas (*Ctenocephalides felis* y *C. canis*), garrapatas (*Dermacentor reticulatus*, *Ixodes hexagonus*, *I. ricinus* y *Rhipicephalus sanguineus*) y ácaros (*Sarcoptes scabiei*, *Otodectes cynotis* y *Demodex canis*) ([EMA, 2015](#)).

Precauciones especiales de uso

Todos los datos de eficacia y seguridad han sido adquiridos con cachorros de 8 semanas de edad o más y de 1.3 kg de peso o más. El uso de este medicamento veterinario en cachorros menores de 8 semanas de edad o de menos de 1.3 kg de peso deberá basarse en una evaluación beneficio-riesgo realizada por el médico veterinario responsable ([EMA, 2015](#)).

Reacciones adversas

Signos gastrointestinales leves y transitorios (vómito y diarrea) se han reportado en muy raras ocasiones. Trastornos neurológicos transitorios como temblores, ataxia o convulsiones pueden ocurrir en muy raras ocasiones. Estos signos normalmente se resuelven sin tratamiento ([EMA, 2015](#)).

Posología

El medicamento veterinario se administra por la vía oral de acuerdo con el cuadro 3 para asegurar una dosis de 2-4 mg/kg de peso corporal. El fármaco se administra una vez al mes con o sin alimento ([EMA, 2015](#)).

Cuadro 3. Dosis de comprimidos de sarolaner para perros.

Peso (kg)	Concentración del comprimido (mg de sarolaner)	Número de comprimidos a administrar
1.3-2.5	5	1
>2.5-5	10	1
>5-10	20	1
>10-20	40	1
>20-40	80	1
>40-60	120	1
>60	Combinación apropiada de comprimidos	

([EMA, 2015](#)).

Sobredosificación

No se han observado reacciones adversas tras la administración oral a cachorros de 8 semanas a dosis de 4 mg/kg en 10 ocasiones en intervalos de 28 días. En grupos sobredosificados, se observaron signos neurológicos transitorios y auto-limitantes en algunos animales: temblores moderados a una dosis 3 veces superior a la dosis máxima y convulsiones a una dosis 5 veces superior a la dosis máxima ([EMA, 2015](#)).

Farmacodinamia

El ácido gamma-aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados ([Gassel et al., 2014](#); [Krnjević, 2004](#); [Krnjević, 2010](#)), así como en el sistema nervioso periférico (SNP) de los invertebrados ([Lunt, 1991](#)). Los receptores GABA son miembros de la superfamilia Cys-loop vinculada a los canales de cloruro ([Sine y Engel, 2006](#)). Estos receptores tienen cinco subunidades transmembrana, cada una formada por cuatro hélices transmembrana. [Weber y Selzer \(2016\)](#) indicaron que las subunidades helicoidales son el objetivo de las isoxazolinas, aunque no identificaron el sitio preciso de inhibición. La variación en la disposición y sustitución de estas subunidades es responsable de la diferente acción de cada isoxazolina dirigida al receptor y de su grado de seguridad en vertebrados. [Gassel et al. \(2014\)](#) demostraron que existe una preferencia de las isoxazolinas por los receptores GABA de los invertebrados frente a los de los vertebrados. Estos autores también indican que el canal de cloruro activado por glutamato, un canal iónico activado por ligando exclusivo de los invertebrados, es otro objetivo de estos fármacos. El GABA y el glutamato ejercen sus acciones estimulando la afluencia de cloruro en las terminales postsinápticas, causando hiperpolarización, impidiendo la generación de un potencial de acción. Las isoxazolinas inhiben esta acción moduladora uniéndose a las terminales postsinápticas, impidiendo la afluencia de cloruro, lo que provoca despolarización/hiperexcitación, parálisis y muerte del parásito ([Gassel et al., 2014](#); [Ozoe et al., 2010](#)).

Farmacocinética

Tras la administración oral, la biodisponibilidad de sarolaner es superior al 85%. El estado de alimentación del perro no afecta significativamente el grado de su absorción. La unión a proteínas plasmáticas in vitro es de $\geq 99.9\%$. Los residuos derivados del fármaco se distribuyen ampliamente por los tejidos. La ruta de excreción primaria es la excreción biliar de la molécula parental, y la eliminación se realiza a través de las heces ([EMA, 2015](#)).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El microbioma intestinal realiza funciones vitales para el metabolismo y la inmunidad del huésped. Los cambios en la composición de la microbiota y su consecuente función anormal (disbiosis) se han asociado con enfermedades gastrointestinales y sistémicas. Estos cambios pueden ser provocados por la administración de fármacos como las isoxazolininas, cuyo efecto antibacteriano in vitro ha sido estudiado, demostrando que puede ser entre moderado y potente.

JUSTIFICACIÓN

Las isoxazolinas presentan características de rápida absorción, efecto ectoparasiticida prolongado y de amplio espectro. Sarolaner es un fármaco de la familia de las isoxazolinas que es indicado en perros para el tratamiento de infestaciones por pulgas, garrapatas y ácaros. Considerando el efecto antibacteriano in vitro que tienen estos fármacos, se plantea un estudio para determinar el efecto de la administración oral de sarolaner en el microbioma intestinal de perros sanos de la Ciudad de México, lo cual puede contribuir a la toma de decisiones terapéuticas acertadas.

HIPÓTESIS

La administración oral de sarolaner modifica la diversidad y cantidad de bacterias del microbioma intestinal de perros sanos de la Ciudad de México.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración oral de sarolaner en el microbioma intestinal de perros sanos de la Ciudad de México.

1.2. Objetivos específicos

- 1- Comparar el microbioma intestinal de perros sanos tratados con sarolaner.
- 2- Correlacionar la diversidad y cantidad de bacterias intestinales con los días de administración del fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio.

El presente estudio se realizó en el Hospital Veterinario DERMAVET, el cual se encuentra ubicado la Ciudad de México, México (al norte 19°35'34"; al sur 19°02'54" de latitud norte; al este 98°56'25"; al oeste 99°21'54" de longitud oeste), ciudad con una extensión de 1,494.3 km² cuya mayor parte de territorio presenta un clima templado subhúmedo (87%), mientras que el resto tiene un clima seco y semiseco (7%), y templado húmedo (6%); con lluvias en verano y temperatura media anual de 16°C, máxima superior de 25°C de marzo a mayo y mínima de aproximadamente 5°C en enero; la precipitación total anual es variable, siendo en la región seca de 600 mm y en la parte templada húmeda de 1,200 mm. ([INEGI, 2020](#)).

Tipo de estudio y tamaño de muestra.

Se muestrearon por conveniencia a cinco perros clínicamente sanos, con resultados de hemograma, química sanguínea, estudio coproparasitológico (con tinción de lugol) y urianálisis dentro de los valores de referencia ([Igarashi et al., 2014](#)) y empleados para trasplante fecal en el Hospital Veterinario DERMAVET. Cada perro representa una unidad experimental al tratarse de razas, edades y pesos diferentes que se mencionan en el cuadro 4. Tres meses antes del estudio no se les administró ningún fármaco y durante todo el periodo de este cada uno contó con su dieta particular ([Igarashi et al., 2014](#)). El cambio de dieta, la administración de otros fármacos y cualquier tipo de enfermedad fueron considerados factores de exclusión de los perros. El fármaco se administró por vía oral a dosis única de 2-4 mg/kg según el peso de cada perro ([EMA, 2015](#)). Se realizaron dos muestreos de los perros (días 1 y 30 (antes y después del tratamiento)) ([Igarashi et al., 2014](#)), recolectando una muestra por perro por día para analizar en total 10 muestras de heces. Los perros vivieron con sus respectivos dueños durante el tiempo del estudio.

Cuadro 4. Raza, edad, peso y sexo de los perros incluidos en el estudio.

Perro (#)	Raza	Edad	Peso	Sexo
2	Pastor Australiano	5 años	22.3 kg	Macho (castrado)
3	Mestizo	4 años	15.6 kg	Hembra (castrada)
4	Chihuahueño	2 años	4.4 kg	Hembra (castrada)
5	Antiguo Pastor Inglés	5 años	39.8 kg	Hembra (no castrada)
6	Mestizo	3 años	4.4 kg	Hembra (no castrada)

Recolección de muestras.

Se tomaron muestras de heces firmes, las cuales fueron partidas con abatelenguas para recolectar del centro cuatro gramos de heces por muestra. Las muestras colectadas se colocaron en tubos de criopreservación con RNAlater, se almacenaron en refrigerador y después fueron enviadas en contenedores a 4°C con refrigerantes al laboratorio, donde se analizaron posteriormente ([Igarashi et al., 2014](#)).

Extracción y cuantificación de ADN metagenómico.

Las heces conservadas en RNAlater se centrifugaron a 16,000 g durante 1 minuto para peletizarlas y extraer la mayor cantidad posible del sobrenadante. Los pellets se resuspendieron en 1 ml de DNA/RNA Shield, colocando aproximadamente 200 mg de muestra fecal, según las recomendaciones de Zymo Research. La extracción del ADN metagenómico se realizó con el kit ZymoBiomics® (#cat. D4300T) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de ADN se determinó con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, WA). Las concentraciones obtenidas de ADN metagenómico se situaron entre 7.1 y 29.3 ng/μL.

Secuenciación y análisis bioinformático.

Preparación de la biblioteca de secuenciación.

Las muestras de ADN se prepararon para secuenciación dirigida con el kit Quick-16S™ Plus NGS Library Prep Kit (Zymo Research, Irvine, CA). Los cebadores utilizados (Quick-16S™ Primer Set V1-V3) fueron diseñados por Zymo Research. La biblioteca de secuenciación se preparó mediante PCR en tiempo real para controlar los ciclos y limitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de la PCR se cuantificaron con lecturas de fluorescencia qPCR y se agruparon en base a una molaridad igual. La biblioteca final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA) y, a continuación, se cuantificó con TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e Invitrogen Qubit 1X DSDNA High-Sensitivity Assay Kits® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA).

Secuenciación.

La biblioteca final se secuenció en Illumina® NextSeq 2000™ con un kit de reactivos p1 (cat 20075294) (600 ciclos). La secuenciación se realizó con un 30% de PhiX spike-in.

Análisis bioinformático.

Las secuencias únicas de amplicones se infirieron a partir de lecturas en total utilizando Pipeline Dada2 ([Callahan et al., 2016](#)), así como la detección y eliminación de secuencias quiméricas. La asignación de la taxonomía se realizó con Uclust de Qiime v.1.9.1, utilizando la propia base de datos 16S de Zymo como referencia. La visualización de la composición y los análisis de diversidad alfa se realizaron con Qiime v.1.9.1 ([Caporaso et al., 2010](#)). La cantidad y diversidad de la comunidad bacteriana se analizaron utilizando especies observadas y estimadores Chao1, así como los índices recíprocos de Shannon y Simpson ([Kim et al., 2017](#)). Se elaboraron curvas de rarefacción con Qiime v.1.9.1 para determinar la diversidad bacteriana de cada muestra ([Igarashi et al., 2014](#)).

Análisis estadístico.

Las diferencias en los índices de diversidad bacteriana y las proporciones de taxones bacterianos entre puntos temporales se determinaron mediante la prueba de Friedman considerando que los datos no tienen una distribución normal (JMP Pro versión 10.0.2, SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). Sólo se incluyeron en el análisis los taxones bacterianos presentes en al menos tres de los cinco perros (en los días 1 y 30) ([Igarashi et al., 2014](#)). El análisis se realizó considerando un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perro 1.

Las figuras mostradas a continuación corresponden a los perfiles taxonómicos basados en el phylum, género y especie de bacterias encontradas en una muestra de heces fecales de un canino hembra (castrada) de raza Antiguo Pastor Inglés de 8 años y 39 kg, la cual fue analizada a partir de secuenciación por amplicón 16S, región V4 (515F–806R). El análisis de tamizaje de esta muestra fue realizado para estudiar las características de diversidad y cantidad de bacterias intestinales de un perro clínicamente sano con resultados de hemograma, química sanguínea, estudio coproparasitoscópico (con tinción de lugol) y urianálisis dentro de los valores de referencia y empleado para trasplante fecal en el Hospital Veterinario DERMAVET.

La figura 1 muestra que la mayor abundancia relativa la presenta el phylum Bacteroidota, seguido por Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteriota y Actinobacteriota, consecutivamente, lo cual coincide con la descripción encontrada en la literatura, la cual indica que el microbioma intestinal de los perros sanos está codominado por tres phyla bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes y Fusobacteria ([Middelbos et al., 2010](#); [Hand et al., 2013](#)).

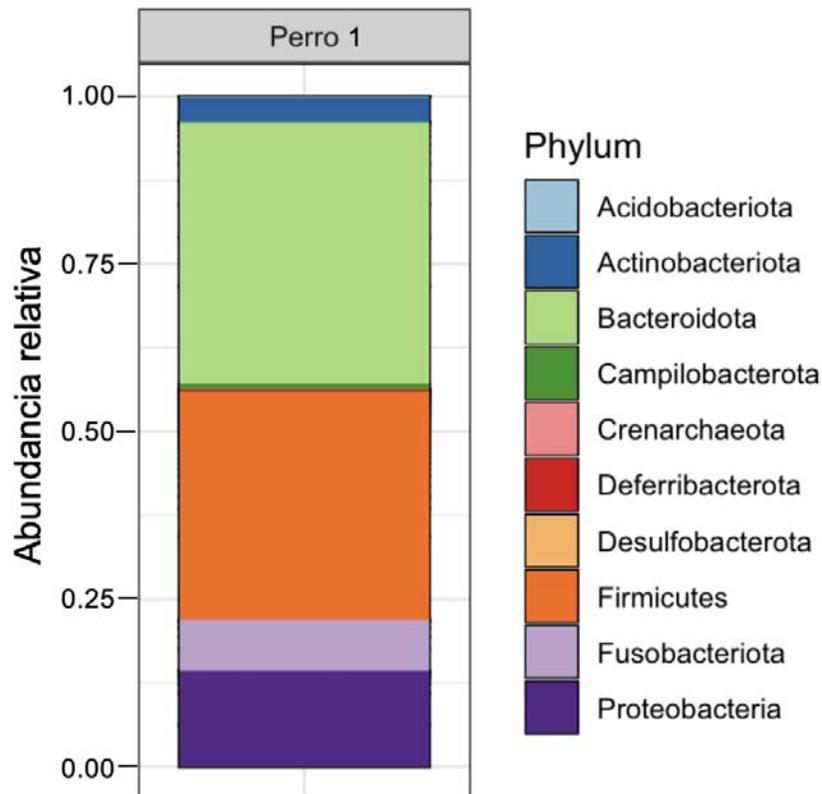


Figura 1. Perfiles taxonómicos basados en el phylum de bacterias encontradas en una muestra de heces del perro 1.

La figura 2 muestra que la categoría de géneros bacterianos denominada “Otros” es la que presenta la mayor abundancia relativa, seguida por los géneros *Prevotella*, *Phascolarctobacterium*, *Sutterella* y *Bacteroides*. Es importante indicar que la categoría “Otros” incluye diversos géneros con abundancias relativas menores a 0.5%, por lo que carece de relevancia.

De acuerdo con la literatura, una gran cantidad de taxones importantes del microbioma intestinal de los perros sanos pertenecen al phylum Firmicutes, incluyendo las clases Clostridia y Bacilli ([Garcia-Mazcorro et al., 2011](#); [Garcia-Mazcorro et al., 2012](#)) de las que se derivan familias que contemplan los géneros *Faecalibacterium* (familia Ruminococcaceae) y *Blautia* (familia Lachnospiraceae) ([Pilla y Suchodolski, 2021](#)), los cuales están presentes en la muestra de heces del perro 1. Bacteroidetes es otro phylum importante, incluyendo los géneros *Prevotella* y *Bacteroides*, cuya abundancia es muy variable entre los perros ([Vázquez-Baeza et al., 2016](#)); en el caso de este canino fueron dos de los géneros con mayor abundancia relativa.

El género *Fusobacterium* se asocia normalmente con la salud de los perros ([Kim et al., 2019](#)). Este género se deriva de la familia Fusobacteriaceae (perteneciente al phylum Fusobacteria), la cual fue identificada en la muestra fecal del canino.

Las proteobacterias y actinobacterias también se identifican con frecuencia en perros. En condiciones fisiológicas se presentan en menor número que el resto de los phyla ([Pilla y Suchodolski, 2021](#)). Uno de los géneros con mayor abundancia relativa que presenta este canino es *Sutterella*, el cual pertenece al phylum Proteobacteria ([Pilla y Suchodolski, 2021](#)). Su abundancia relativa es significativamente menor en comparación con la del género *Prevotella*, por lo que esto se considera un hallazgo normal. Otro género presente es *Collinsella* (perteneciente al phylum Actinobacteria), con una abundancia relativa menor que la de *Sutterella*, lo cual también se considera normal.

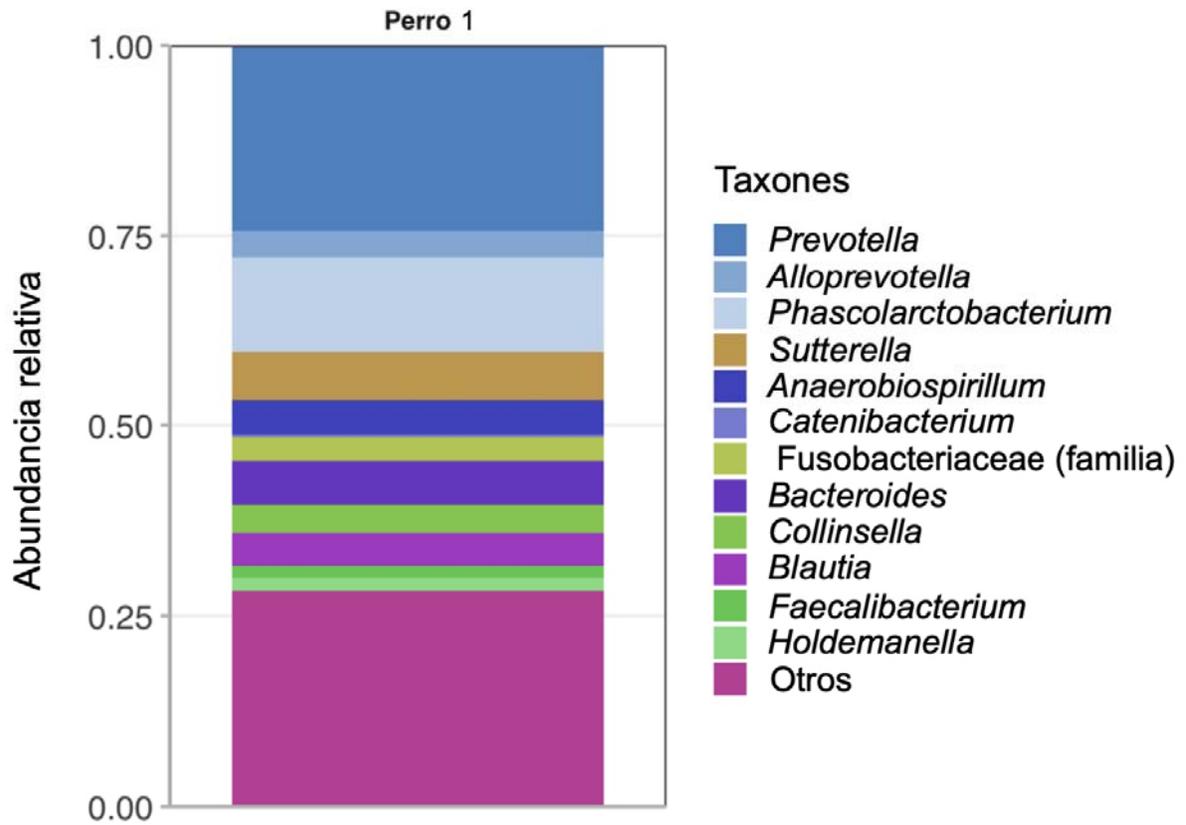


Figura 2. Perfiles taxonómicos basados en el género de bacterias encontradas en una muestra de heces del perro 1.

Por segunda ocasión destaca en primera posición la abundancia relativa de la categoría “otros”, ahora con la figura 3, en la que se muestra que las especies bacterianas contempladas en esta son las que en conjunto presentan la mayor abundancia relativa, seguidas de la especie *Prevotella copri* y los géneros *Phascolarctobacterium* y *Prevotella*, y la especie *Sutterella massilliensis/stercoricanis/wadsworthensis*, consecutivamente. Previamente se ha señalado la importancia taxonómica del phylum Bacteroidetes, el cual incluye a los géneros *Prevotella* y *Bacteroides* ([Vázquez-Baeza et al., 2016](#)), ambos encontrados en este canino, siendo el primero uno de los géneros con más abundancia relativa y el segundo, un género con una abundancia relativa superior que la de la especie *Collinsella intestinalis/stercoris*, perteneciente al phylum Actinobacteria, que en condiciones fisiológicas se presenta en menor número que los phyla Bacteroidetes y Firmicutes ([Pilla y Suchodolski, 2021](#)). En el caso del segundo phylum, la abundancia relativa de la especie *Blautia coccoides/hansenii marasmilproducta* también es mayor que la de la especie del género *Collinsella*. Es por ello que estos hallazgos se consideran normales.

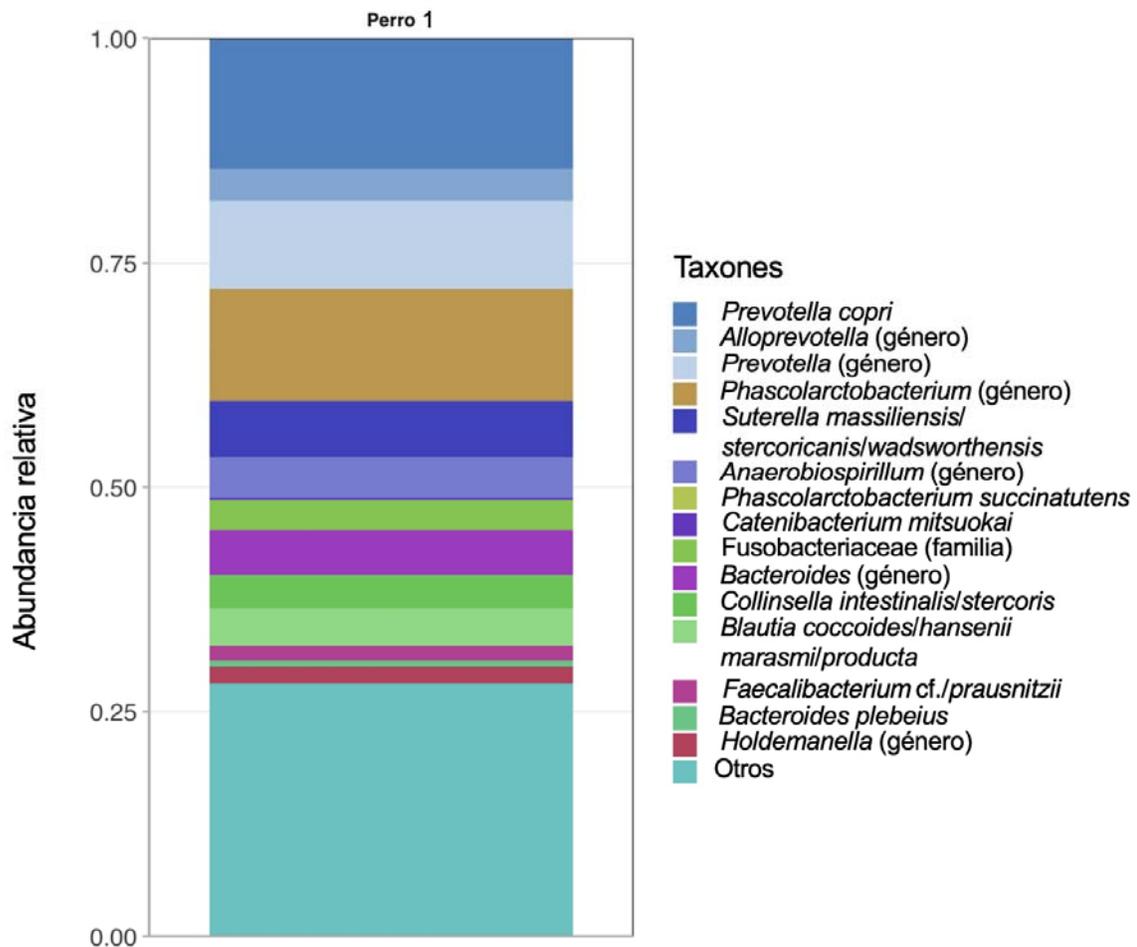


Figura 3. Perfiles taxonómicos basados en la especie de bacterias encontradas en una muestra de heces del perro 1.

En la figura 4 se muestra que la abundancia relativa de las variantes de secuencias de amplicón (ASVs) de *Prevotella copri*, *Prevotella* y *Bacteroides*, taxones pertenecientes al phylum Bacteroidetes es superior que la de la especie *Sutterella massiliensis/stercoricanis/wadsworthensis*, la cual corresponde al phylum Proteobacteria. Coincidiendo con la figura 3, la especie *Blautia coccooides/hansenii/marasmil/producta* (del phylum Firmicutes) presenta una abundancia relativa mayor que la de la especie *Collinsella intestinalis/stercoris* (del phylum Actinobacteria). Estos hallazgos son considerados normales, ya que en perros sanos las proteobacterias y actinobacterias se presentan en un número inferior que los phyla Bacteroidetes y Firmicutes ([Pilla y Suchodolski, 2021](#)).

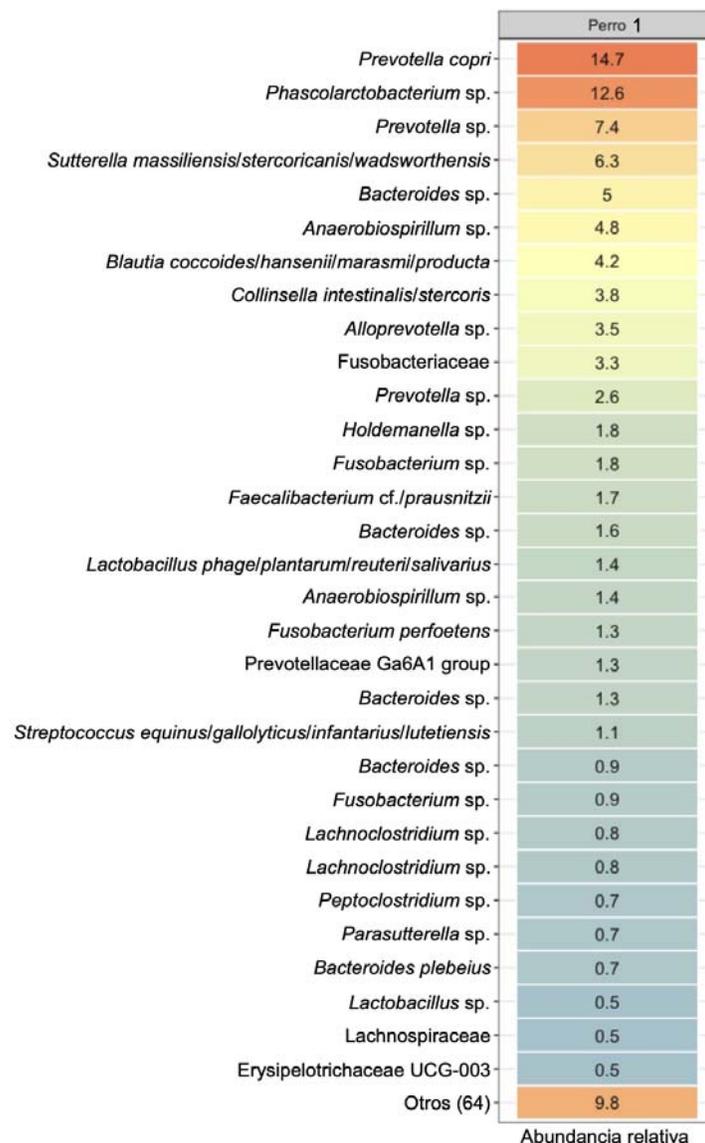


Figura 4. “Heat map” de los ASVs de bacterias más abundantes en una muestra de heces del perro 1. El número representa la abundancia relativa de cada género. Solamente se muestran los ASVs con abundancias mayores a 0.5%, el resto se encuentra agrupado en la categoría “Otros”.

Perros incluidos en el estudio.

Se obtuvo un total de 1,810,508 secuencias para la región V1-V3 del análisis del gen ARNr 16S, en un rango de 117,502 a 275,046 (media de 181,051 secuencias por muestra), a partir de la secuenciación de 10 muestras. Tras realizar el filtrado de calidad, así como la detección y eliminación de quimeras (52,518 secuencias), el total de secuencias de alta calidad analizadas fue de 353,880, en un rango de 44,072 a 107,345 (media de 69,355 por muestra). La profundidad de secuenciación para describir la diversidad bacteriana a nivel de ASV se evaluó mediante una curva de rarefacción de las especies observadas de todas las muestras normalizadas a 20,000 secuencias (figura 5). Todas las curvas alcanzaron una meseta. Es decir, se puede observar que inicialmente conforme fue aumentando el número de secuencias de 0 a 5,000, en cada muestra se identificaba un número cada vez mayor de especies observadas (diversidad creciente) hasta que las muestras se normalizaron entre las 15,000 y 20,000 secuencias presentando curvas que alcanzaron una meseta, lo que indicó que se había generado un número suficiente de secuencias para evaluar la diversidad bacteriana en las muestras de heces.

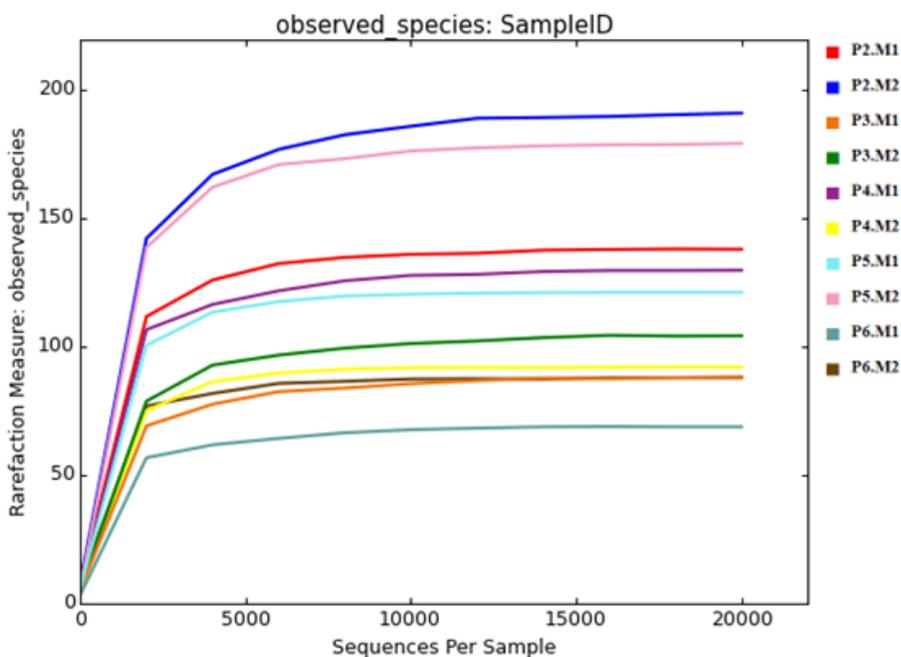


Figura 5. Curvas de rarefacción del número de especies observado a nivel de ASV de la diversidad bacteriana en el microbioma intestinal de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner. Las series de datos denominadas M1 y M2 se refieren a las muestras recogidas antes y después del tratamiento, respectivamente. La etiqueta P corresponde al número de identificación del perro.

Se calcularon los índices de Shannon (homogeneidad) y Simpson recíproco (diversidad), así como el estimador de riqueza Chao1 para todas las muestras. El análisis de la diversidad alfa no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas (antes y después del tratamiento con sarolaner) (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de diversidad alfa de las comunidades bacterianas presentes en el microbioma intestinal de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner.

Muestras	Chao1	Shannon	Simpson recíproco
P2.M1	137.925	4.999	12.265
P3.M1	88.0	3.253	3.626
P4.M1	130.103	5.023	15.624
P5.M1	121.0	4.057	5.65
P6.M1	68.7	2.433	2.251
Media	109.15	3.95	7.88
DE ¹	29.54	1.12	5.79
P2.M2	191.528	5.445	19.975
P3.M2	104.576	3.682	4.933
P4.M2	92.0	3.667	5.629
P5.M2	178.995	4.528	7.13
P6.M2	88.0	4.684	14.213
Media	131.02	4.40	10.38
DE	50.09	0.75	6.51

¹DE: Desviación estándar

Las secuencias de amplicones V3-V4 del gen ARNr 16S permitieron identificar 5 phyla, 41 familias y 74 géneros bacterianos. La media de los phyla procariotas más abundantes en el microbioma intestinal de los perros estudiados consistió en Firmicutes (54.4%), Proteobacteria (32.3%), Actinobacteria (7.8%), Bacteroidetes (3.5%) y Fusobacteria (1.9%), como se muestra en la figura 6. Se puede observar que la abundancia relativa de Bacteroidetes disminuyó drásticamente después de la administración oral de sarolaner (de 6.2% decreció a un valor de 0.86%) (el análisis estadístico de este hallazgo no indica diferencia estadísticamente significativa), por lo que la relación Bacteroidetes:Firmicutes pasó de 0.12224 a 0.01482 (cuadro 6), lo que podría influir en la salud de los animales considerando que este phylum es uno de los tres phyla bacterianos principales del microbioma intestinal de los perros sanos ([Middelbos et al., 2010](#); [Hand et al., 2013](#)).

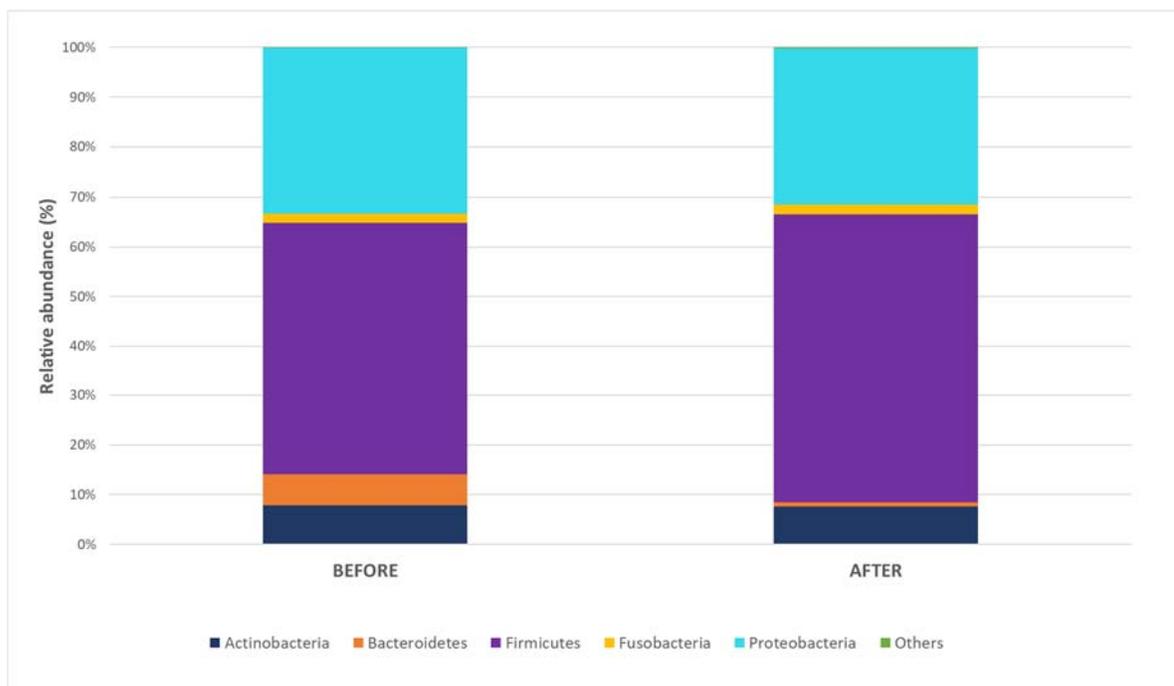


Figura 6. Diagrama de barras que representa la abundancia relativa de los phyla bacterianos detectados en el microbioma intestinal de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner. Se representaron los phyla con abundancias relativas superiores al 1%, el resto se agruparon en “otros”.

El efecto de sarolaner en la composición del microbioma intestinal de los cinco perros tratados se muestra en el cuadro 6 como cambio en las abundancias relativas de las 41 familias bacterianas que se detectaron en las 10 muestras analizadas. Coincidiendo con la figura 6, en el cuadro 6 se muestra que las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae del phylum Bacteroidetes han disminuido de 0.0196 a 0.0062 ($P=0.33$) y de 0.034 a 0.002 ($P=0.35$) consecutivamente, lo cual podría influir en la salud de los animales tratados ya que las familias afectadas incluyen los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*, que son importantes para la salud de los perros ([Vázquez-Baeza et al., 2016](#)).

Cuadro 6. Efecto de sarolaner en la abundancia relativa de las familias de bacterias intestinales de cinco perros.

	Antes	Después	EEM ¹	Valor de P
Otro	0	0.0004	0.000173	0.14
Bifidobacteriaceae	0.0008	0.004000	0.00288	0.45
Corynebacteriaceae	0	0.0014	0.000989	0.34
Dietziaceae	0	0.0004	0.000282	0.34
Nocardiaceae		0.0034	0.002231	0.31
Brevibacteriaceae	0	0.002	0.00141	0.34
Cellulomonadaceae	0	0.004	0.002828	0.34
Micrococcaceae	0.0004	0.036	0.00256	0.40
Promicromonosporaceae	0	0.0042	0.00296	0.34
Streptomycetaceae	0	0.0084	0.005939	0.34
Nocardiopsaceae	0	0.001	0.00070	0.34
Coriobacteriaceae	0.0778	0.0432	0.03805	0.53
Bacteroidaceae	0.0196	0.0062	0.00924	0.33
Porphyromonadaceae	0.0062	0	0.00438	0.34
Prevotellaceae	0.034	0.002	0.02339	0.35
Rikenellaceae	0.014	0	0.000989	0.31
Bacillaceae	0.0002	0.0118	0.007644	0.51
Planococcaceae	0.0102	0.0222	0.01249	0.51
Staphylococcaceae	0.0004	0.0024	0.001720	0.43
Carnobacteriaceae	0	0.0004	0.000282	0.34
Enterococcaceae	0.047	0.0176	0.022203	0.37
Lactobacillaceae	0.1490	0.1072	0.08406	0.73
Leuconostocaceae	0.0066	0.0006	0.00468	0.39
Streptococcaceae	0.0144	0.0178	0.010141	0.81
Clostridiaceae	0.0692	0.0122	0.04351	0.38
Eubacteriaceae	0	0.0016	0.00113	0.34
FamilyXI	0.0004	0.0058	0.003930	0.35
Lachnospiraceae	0.0744	0.1236	0.05928	0.57
NA	0.06420	0.0962	0.0415853	0.60
Peptostreptococcaceae	0.0076	0.0054	0.00453	0.74
Ruminococcaceae	0.0116	0.09460	0.06045	0.36
Erysipelotrichaceae	0.0438	0.049	0.023118	0.87
Acidaminococcaceae	0.0080	0.0106	0.00623	0.77
Fusobacteriaceae	0.1800	0.0200	0.012496	0.91
Alcaligenaceae	0.0016	0.0006	0.000748	0.37
Desulfovibrionaceae	0.0344	0	0.02432	0.34
Helicobacteraceae	0.0026	0.0012	0.00136	0.48
Aeromonadaceae	0.0052	0	0.00367	0.34
Succinivibrionaceae	0.0004	0	0.000173	0.14
Enterobacteriaceae	0.2772	0.2040	0.13614	0.71

Moraxellaceae	0.0070	0.1000	0.07088	0.38
Pseudomonadaceae	0.0044	0.0072	0.00596	0.74
Anaeroplasmataceae	0.0008	0.0014	0.6826	0.68

¹EEM: Error estándar de la media

La media (entre antes y después del tratamiento con sarolaner) de bacterias con una abundancia relativa >1% a nivel de familia fue: Enterobacteriaceae (24%), Lactobacillaceae (12.8%), Lachnospiraceae (9.9%), Coriobacteriaceae (6%), Moraxellaceae y Ruminococcaceae (5.3%), Erysipelotrichaceae (4.6%), Clostridiaceae (4.1%), Enterococcaceae (3.2%), Fusobacteriaceae (1.9%), Prevotellaceae (1.8%), Desulfovibrionaceae (1.7%), Planococcaceae y Streptococcaceae (1.6%), Bacteroidaceae (1.3%) y el orden Clostridiales con familia no asignada (8%), como se muestra en la figura 7. Se puede observar que la abundancia relativa de las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae decreció después de la administración oral de sarolaner (no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos cambios), lo que podría influir en la salud de los animales tratados dado que las familias afectadas contemplan los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*, que son importantes para la fisiología de los perros ([Vázquez-Baeza et al., 2016](#)).

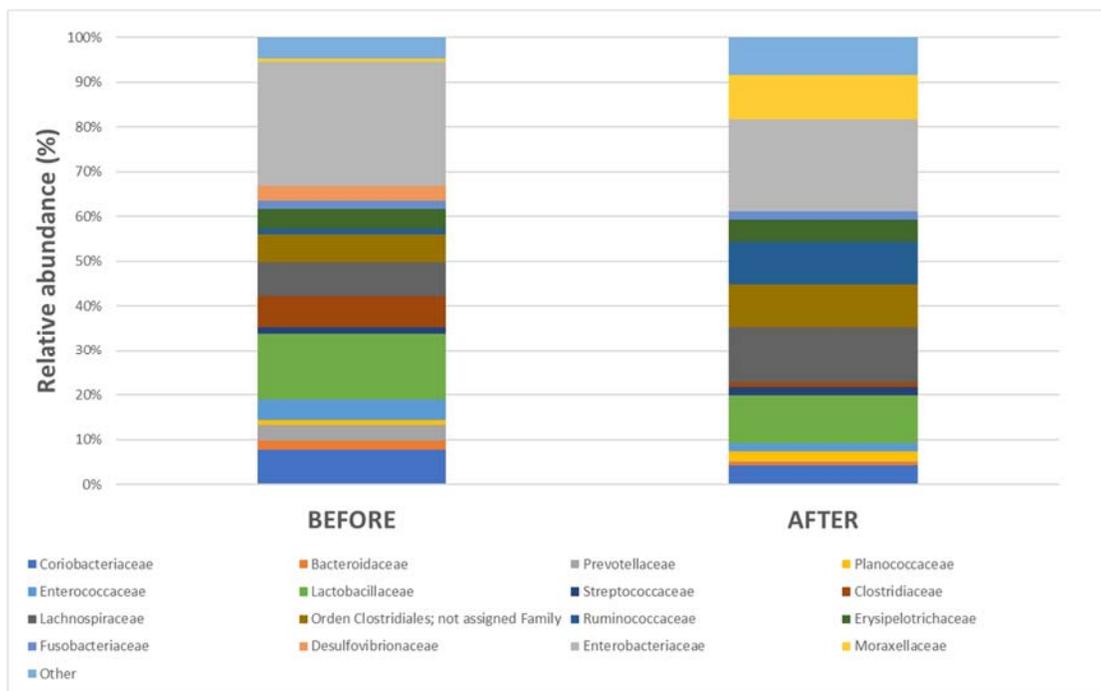


Figura 7. Diagrama de barras que muestra la abundancia relativa de las familias bacterianas presentes en las heces de cinco perros antes y después del tratamiento con sarolaner. Se representaron las familias con abundancias relativas superiores al 1%, el resto se agruparon en “otras”.

CONCLUSIONES

La administración oral de sarolaner a dosis única de 2-4 mg/kg de peso disminuyó la diversidad y cantidad de bacterias de las familias Bacteroidaceae y Prevotellaceae del microbioma intestinal de perros sanos de la Ciudad de México, lo cual podría influir en la salud de los animales tratados considerando que estos microorganismos presentan funciones metabólicas e inmunológicas importantes y pertenecen al phylum Bacteroidetes, uno de los 3 phyla bacterianos más representativos de los perros sanos. Por lo tanto, se recomienda administrar este fármaco en base a la evaluación beneficio-riesgo realizada por el médico veterinario.

LITERATURA CITADA

- Garcia-Mazcorro JF, Minamoto Y. 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Arch Med Vet*; 45 (2): 111-124. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200002>
- Pilla R, Suchodolski JS. 2021. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. *Vet Clin Small Anim*; 51:605–621. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.002>
- Ziese A, Suchodolski JS. 2021. Impact of Changes in Gastrointestinal Microbiota in Canine and Feline Digestive Diseases. *Vet Clin Small Anim*; 51: 155-169. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.004>
- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*; 32 (1):9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Tennat B. 2012. *Vademécum Farmacológico de Pequeños Animales y Exóticos. Manual de Formulación*, 5ª edición. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA). ISBN: 978-84-87736-65-0. <https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UNANI.035228>
- Igarashi H, Maeda S, Ohno K, Horigome A, Odamaki T, Tsujimoto H. 2014. Effect of Oral Administration of Metronidazole or Prednisolone on Fecal Microbiota in Dogs. *PLoS ONE*; 9(9): 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107909>
- Zhou X, Hohman AE, Hsu WH. 2022. Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Therap*; 45:1–15. <https://doi.org/10.1111/jvp.12959>
- Suchodolski JS. 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: a Bigger World than We Thought. *Vet Clin Small Anim*; 41:261–272. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.12.006>
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*; 489(7415): 220–30. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Middelbos IS, Vester Boler BM, Qu A, White BA, Swanson KS, Fahey GC. 2010. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE*; 5(3): 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
- Hand D, Wallis C, Colyer A, Penn CW. 2013. Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. *PLoS One*; 8(1): 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053115>
- Garcia-Mazcorro JF, Lanerie DJ, Dowd SE, Paddock CG, Grutzner N, Steiner JM, Ivanek R, Suchodolski JS. 2011. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol*; 78: 542–554. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01185.x>
- Garcia-Mazcorro JF, Dowd SE, Poulsen J, Steiner JM, Suchodolski JS. 2012. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *MicrobiologyOpen*; 1(3): 340–347. <https://doi.org/10.1002/mbo3.36>
- Vázquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, Knight R. 2016. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol*; 1: 1-5. <https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2016.177>

Kim D, Jeong D, Kang I, Lim H, Cho Y, Seo K. 2019. Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product. *Journal of Dairy Science*; 102(5): 3903-3911. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15639>

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. 2012. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*; 336 (6086): 1262–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>

Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T. 2006. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol*; 4 (10): 1841-1851. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040337>

Wilson ID, Nicholson JK. 2015. The Modulation of Drug Efficacy and Toxicity by the Gut Microbiome. *Metabonomics and Gut Microbiota in Nutrition and Disease, Molecular and Integrative Toxicology*. Londres: Springer-Verlag; 323–341. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6539-2_15

Nicholson JK, Wilson ID. 2003. Understanding ‘Global’ Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. *Nat Rev Drug Discov*; 2: 668–676. <https://doi.org/10.1038/nrd1157>

Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*; 40(3): 235-243. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>

Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105(43): 16767–16772. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808567105>

Grider JR, Piland BE. 2007. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 292(1): G429–G437. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00376.2006>

AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, Serpedin E, Suchodolski JS. 2017. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology*; 93(11): 1-8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136>

Marsilio S, Pilla R, Sarawichitr B, Chow B, Hill SL, Ackermann MR, Estep JS, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. 2019. Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Sci Rep*; 9: 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55691-w>

Jalanka-Tuovinen J, Salonen A, Nikkilä J, Immonen O, Kekkonen R, Lahti L, Palva A, de Vos WM. 2011. Intestinal Microbiota in Healthy Adults: Temporal Analysis Reveals Individual and Common Core and Relation to Intestinal Symptoms. *PLoS One*; 6(7): 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023035>

Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS. 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol*; 66(3): 579-589. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00556.x>

Suchodolski JS, Xenoulis PG, Paddock CG, Steiner JM, Jergens AE. 2010. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic

inflammatory bowel disease. *Vet Microbiol*; 142(3-4): 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.002>

Minamoto Y, Minamoto T, Isaiah A, Sattasathuchana P, Buono A, Rangachari VR, McNeely IH, Lidbury J, Steiner JM, Suchodolski JS. 2019. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *J Vet Intern Med*; 33(4): 1608-1618. <https://doi.org/10.1111/jvim.15520>

Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*; 17(4): 219-232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>

Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert MA, Quervain E, Thomas G, Barbu V, Humbert L, Despras G, Bridonneau C, Dumetz F, Grill JP, Masliah J, Beaugerie L, Cosnes J, Chazouillères O, Poupon R, Wolf C, Mallet JM, Langella P, Trugnan G, Sokol H, Seksik P. 2013. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut*; 62(4): 531-539. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302578>

Giaretta PR, Rech RR, Guard BC, Blake AB, Blick AK, Steiner JM, Lidbury JA, Cook AK, Hanifeh M, Spillmann T, Kilpinen S, Syrjä P, Suchodolski JS. 2018. Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med*; 32(6): 1918-1926. <https://doi.org/10.1111/jvim.15332>

Guard BC, Honneffer JB, Jergens AE, Jonika MM, Toresson L, Lawrence YA, Webb CB, Hill S, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. 2019. Longitudinal assessment of microbial dysbiosis, fecal unconjugated bile acid concentrations, and disease activity in dogs with steroid-responsive chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med*; 33(3): 1295-1305. <https://doi.org/10.1111/jvim.15493>

Park MJ, Pilla R, Panta A, Pandey S, Sarawichitr B, Suchodolski J, Sohrabji F. 2020. Reproductive Senescence and Ischemic Stroke Remodel the Gut Microbiome and Modulate the Effects of Estrogen Treatment in Female Rats. *Transl Stroke Res*; 11(4):812-830. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00760-5>

Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Yissachar N, Stangl GI, Eilers E, Bader V, Haase S, Kaisler J, David C, Schneider R, Troisi R, Zent D, Hegelmaier T, Dokalis N, Gerstein S, Del Mare-Roumani S, Amidror S, Staszewski O, Poschmann G, Stühler K, Hirche F, Balogh A, Kempa S, Träger P, Zaiss MM, Holm JB, Massa MG, Nielsen HB, Faissner A, Lukas C, Gatermann SG, Scholz M, Przuntek H, Prinz M, Forslund SK, Winkelhofer KF, Müller DN, Linker RA, Gold R, Haghikia A. 2020. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell*; 180(6): 1067-1080. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.035>

Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. 2010. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 107(1): 228-233. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906112107>

Waclawiková B, El Aidy S. 2018. Role of Microbiota and Tryptophan Metabolites in the Remote Effect of Intestinal Inflammation on Brain and Depression. *Pharmaceuticals (Basel)*; 11(3): 63. <https://doi.org/10.3390/ph11030063>

Liepman RS, Swink JM, Habing GG, Boyaka PN, Caddey B, Costa M, Gomez DE, Toribio RE. 2022. Effects of Intravenous Antimicrobial Drugs on the Equine Fecal Microbiome. *Animals (Basel)*; 12(8): 1-11. <https://doi.org/10.3390/ani12081013>

Walsh J, Griffin BT, Clarke G, Hyland NP. 2018. Drug-gut microbiota interactions: implications for neuropharmacology. *Br J Pharmacol*; 175(24): 4415-4429. <https://doi.org/10.1111/bph.14366>

Turnheim K. 2003. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp Gerontol*; 38(8): 843-853. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(03\)00133-5](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(03)00133-5)

Pilla R, Gaschen FP, Barr JW, Olson E, Honneffer J, Guard BC, Blake AB, Villanueva D, Khattab MR, AlShawaqfeh MK, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. 2020. Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med*; 34: 1853–1866. <https://doi.org/10.1111/jvim.15871>

Fujishiro MA, Lidbury JA, Pilla R, Steiner JM, Lappin MR, Suchodolski JS. 2020. Evaluation of the effects of anthelmintic administration on the fecal microbiome of healthy dogs with and without subclinical *Giardia* spp. and *Cryptosporidium canis* infections. *PLoS ONE*; 15(2): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228145>

Hoffman PS, Sisson G, Croxen MA, Welch K, Harman WD, Cremades N, Morash MG. 2007. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*; 51(3): 868-876. <https://doi.org/10.1128/AAC.01159-06>

White CA. 2004. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 2(1): 43-49. <https://doi.org/10.1586/14787210.2.1.43>

Isac E, de A Picanço G, da Costa TL, de Lima NF, de SMM Alves D, Fraga CM, de S Lino Junior R, Vinaud MC. 2016. Nitazoxanide induces in vitro metabolic acidosis in *Taenia crassiceps cysticerci*. *Exp Parasitol*; 171: 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.012>

Kotian SY, Mohan CD, Merlo AA, Rangappa S, Nayak SC, Rai KM, Rangappa KS. 2020. Small molecule based five-membered heterocycles: A view of liquid crystalline properties beyond the biological applications. *J Mol Liq*; 297: 1-30, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111686>

Kotian SY, Kudva NU, Rai KM, Byrappa K. 2016. Synthesis of new series of 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxylate derivatives for the study of their liquid crystalline properties. *J Chem Sci*; 128: 1033-1036. <https://doi.org/10.1007/s12039-016-1114-0>

Fritsch L, Baptista LA, Bechtold IH, Araújo G, Mandle RJ, Merlo AA. 2020. Isoxazoline- and isoxazole- liquid crystalline schiff bases: A puzzling game dictated by entropy and enthalpy effects. *J Mol Liq*; 298. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111750>

Byrappa S, Rachaiah K, Kotian SY, Balaraju Y, Prabhuswamimath SC, Rai KM, Salimath BP. 2019. Synthesis and Screening of Pro-apoptotic and Angio-inhibitory Activity of Novel Benzisoxazole Derivatives both In Vitro and In Vivo. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*; 19(6): 827-839. <https://doi.org/10.2174/1871520619666190114170621>

Tang Z, Peng Y, Liu F. 2020. Design and synthesis of novel quinoline derivatives bearing oxadiazole, isoxazoline, triazolothiadiazole, triazolothiadiazine, and piperazine moieties. *Journal of Heterocyclic Chemistry*; 57(6): 1-9, <https://doi.org/10.1002/jhet.3907>

Mohsen GL, Abdula AM, Jassim AM. 2018. Synthesis, Antimicrobial, Antioxidant and Docking Study of Novel Isoxazoline Derivatives. *ACTA Pharmaceutica Scientia*; 56(3): 71-83. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05619>

Gul M, Eryilmaz S. 2019. Synthesis, Antioxidant Activity and Theoretical Investigation of Isoxazolines Derivatives of Monoterpenoids. *Letters in Organic Chemistry*; 16(6): 501-510. <https://doi.org/10.2174/1570178616666181226154540>

Rodríguez NY, Gutiérrez M, Alzate-Morales J, Adasme-Carreño F, Güiza FM, Bernal CC, Bohórquez AR. 2020. Tetrahydroquinoline-Isoxazole/Isoxazoline Hybrid Compounds as Potential Cholinesterases Inhibitors: Synthesis, Enzyme Inhibition Assays, and Molecular Modeling Studies. *International Journal of Molecular Sciences*; 21 (1): 1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms21010005>

Weber T, Selzer PM. 2016. Isoxazolines: A Novel Chemotype Highly Effective on Ectoparasites. *Chem Med Chem*; 11(3): 270-276. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500516>

Guo Y, Zhang Q, Liu Z, Bao C, Fan J, Yang R. 2019. Non-food bioactive products: Design and semisynthesis of novel (+)-nootkatone derivatives containing isoxazoline moiety as insecticide candidates. *Industrial Crops and Products*; 140: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111706>

Agencia Europea de Medicamentos (EMA). 2015. Ficha técnica o resumen de las características del producto: Simparica. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/simparica-epar-product-information_en.pdf

Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. 2014. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod gamma-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 45: 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.009>

Krnjević K. 2004. How does a little acronym become a big transmitter? *Biochemical Pharmacology*; 68(8): 1549–1555. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.038>

Krnjević K. 2010. When and why amino acids? *The Journal of Physiology*; 588: 33–44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176990>

Lunt GG. 1991. GABA and GABA receptors in invertebrates. *Seminars in Neuroscience*; 3(3): 251–258. [https://doi.org/10.1016/1044-5765\(91\)90022-G](https://doi.org/10.1016/1044-5765(91)90022-G)

Sine SM, Engel AG. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*; 440: 448–455. <https://doi.org/10.1038/nature04708>

Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T. 2010. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 391(1): 744–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.131>

INEGI. 2020. Panorama sociodemográfico de México. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825197711>

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*; 13(7): 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Gonzalez PA, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*; (7): 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Kim BR, Shin J, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, Seol KH, Lee JH, Kim HB, Isaacson RE. 2017. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol*; 27(12): 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>