

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES
ASOCIADAS AL LINFOMA L5178Y-R EN RATONES BALB/C

Por

DEVANY ALEJANDRA TREVIÑO SANTOS

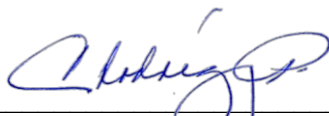
Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES
ASOCIADAS AL LINFOMA L5178Y-R EN RATONES BALB/C

Comité de Tesis

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Presidente



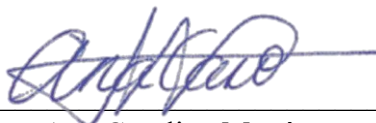
Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



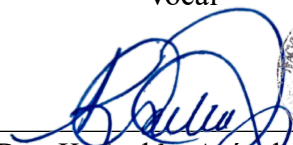
Dr. Alberto Valadez Lira
Vocal



Dr. Alonso Alberto Orozco Flores
Vocal



Dra. Ana Carolina Martínez
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Nino
Subdirector de Posgrado



PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LAS ALTERACIONES
CONDUCTUALES ASOCIADAS AL LINFOMA L5178Y-R EN RATONES BALB/C

Dirección de Tesis

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Directora de Tesis

DERECHOS DE AUTOR

Toda la información contenida en este trabajo de investigación está protegida. No se permite la reproducción parcial o total de esta obra ni su transmisión en cualquier forma o por cualquier medio sin autorización previa. El uso de este material será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa el cierre de una etapa muy importante en mi vida, pero también es el reflejo del apoyo, la confianza y la generosidad de muchas personas que me acompañaron durante este camino. A todas ellas, mi más profundo agradecimiento.

A mi familia, por ser siempre mi mayor fortaleza. En especial a mi mamá, María de Jesús Santos Terreros, por creer incondicionalmente en mí y en mis capacidades, por impulsarme a perseguir cada nuevo reto sin poner límites a mis sueños y por enseñarme, con su ejemplo, el valor de la responsabilidad, la perseverancia y el compromiso. A Gustavo Pérez Hernández, por formar parte de mi vida, por creer siempre en mí y motivarme a seguir preparándome y persiguiendo mis metas.

A la Dra. Diana Elia Caballero Hernández, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y confiar en mí desde el primer día. Gracias por todas las enseñanzas, por su paciencia, por las conversaciones, las risas y por cada aprendizaje que contribuyó a mi crecimiento académico y personal. Ha sido un privilegio formarme bajo su dirección.

A mi comité de tesis: a la Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla, por facilitar las instalaciones del laboratorio; a la Dra. Ana Carolina Martínez, al Dr. Alonso Alberto Orozco Flores y al Dr. Alberto Valadez Lira, por sus observaciones, consejos y valioso acompañamiento durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de generación: Vianey J. del Mercado, David H. Suárez Garza, Juan Pablo Molina Morales, Jessica B. Amaro Fuentes, Daniel E. Rodríguez Espinosa, Mara V. Rodríguez Rodríguez, Adriana Niño y Lenin A. Ledesma Sepúlveda, así como a la generación de Microbiología. Gracias por las largas jornadas de estudio, el apoyo mutuo, las risas y por hacer que este camino estuviera lleno de buenos recuerdos y aprendizajes compartidos.

A Ana Cecilia Espinosa Ríos, por compartir conmigo tus conocimientos, por ser una gran compañera durante la maestría y, sobre todo, por tu amistad. Gracias por convertirte en uno de mis principales apoyos durante esta etapa. Me llevo la fortuna de haberte conocido y de contar con una amiga para toda la vida.

A Priscila Carolina García Guerrero, por estar presente en la parte final de este camino, por creer en mí, escucharme y brindarme siempre palabras de aliento. Gracias por nunca aburrirme de mis explicaciones sobre mi tesis, por mostrarte genuinamente interesada en mi trabajo y, sobre todo, por recordarme que podía lograrlo y motivarme a seguir adelante.

A mis compañeros de laboratorio: Luisa Onofre Alvarado, Luis Fernando Guillén, Ada Leal, Ana Luisa Cantú e Isaías Gutiérrez; y a Andrea Loera, Renata Olmos, Marcos Sotelo Ibarra y Cristóbal Flores, por su disposición para colaborar, por todo lo que aprendimos juntos y por las amistades que surgieron durante este tiempo. Asimismo, agradezco a Lorena L. Vázquez Ávila por enseñarme con paciencia el procedimiento de extracción de ADN, por responder siempre mis dudas y por su constante disposición para ayudarme. Gracias también por brindarme tu amistad.

Finalmente, a Kassandra O. Rodríguez Aguillón, María González Flores, Diana A. Delgadillo Solís, Mariana Carranza Corral, Denisse P. Campa Gómez, Paula Ma. Fernández Sedas, Kenia Y. Garza Guevara, Gustavo A. Garza Hernández y Vanessa R. Villafaña Santiago. Gracias por su amistad, por cada conversación, por las risas y por hacer que esta etapa fuera mucho más llevadera y feliz.

A todos ustedes, gracias por formar parte de este logro. Cada palabra de aliento, cada enseñanza y cada momento compartido dejaron una huella que permanecerá conmigo mucho después de concluir esta etapa. Este trabajo también les pertenece, porque, de una u otra manera, cada uno contribuyó a que hoy pudiera alcanzar esta meta.

DEDICATORIA

A quienes me enseñaron que los sueños se alcanzan con esfuerzo, constancia y amor. Gracias por creer en mí incluso antes de que yo aprendiera a creer en mí misma. Este logro lleva un poco de cada palabra de aliento, de cada enseñanza y de cada momento en que caminaron a mi lado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Microbiota	4
2.2. Microbiota y conducta	5
2.3. Microbiota y cáncer	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO.....	13
5.1. Objetivo general	13
5.2. Objetivos específicos	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1. Animales	14
6.2. Inoculación de células tumorales.....	14
6.3. Pruebas conductuales.....	14
6.4. Obtención de heces	17
6.5. Taxonomía metagenómica	18
6.6. Obtención de perfiles metabólicos	18
6.7. Análisis de la estructura, diversidad y perfiles de la microbiota intestinal	20
6.8. Modelado de cambio biológico (log2 Fold Change) y exclusividad taxonómica	21
6.9. Integración trans-ómica y fenotípica mediante análisis de redes	21
6.10. Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS.....	24

7.1.	Evaluación conductual.....	24
7.2.	Análisis de Diversidad y Composición de la Microbiota Intestinal	25
7.3.	Perfilado Taxonómico.....	28
7.4.	Modelado de Cambio Biológico (log2 Fold Change) y Exclusividad Taxonómica 34	
7.5.	Obtención de Perfiles Metabólicos (PICRUST2).....	39
7.6.	Integración Trans-Ómica y Fenotípica mediante Análisis de Redes	42
8.	DISCUSIÓN.....	50
9.	CONCLUSIÓN	60
11.	BIBLIOGRAFÍA	62
12.	ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pruebas conductuales, vista superior durante experimentos	15
Figura 2. Resultados de la prueba conductual de Campo Abierto	24
Figura 3. Resultados de las pruebas conductuales de Laberinto en Y y Reconocimiento de Objeto Novedoso	25
Figura 4. Índices de Diversidad Alfa	26
Figura 5. Diversidad β bacteriana: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis.....	27
Figura 6. Distancia Bray-Curtis individual entre condiciones Basal y Tumor	28
Figura 7. Boxplot de abundancia relativa de Filos por grupo de estudio	29
Figura 8. Heatmap clusterizado de la abundancia promedio de Familias por grupo de estudio	30
Figura 9. Abundancia relativa de familias bacterianas seleccionadas entre grupos experimentales	31
Figura 10. Heatmaps de abundancia taxonómica basados en la transformación de Hellinger	33
Figura 11. Abundancias de especies bacterianas exclusivas en los grupos Basal y Tumor.....	35
Figura 12. Distribución global del cambio diferencial en la microbiota intestinal.	37
Figura 13. Top 30 especies con mayor magnitud de cambio diferencial.....	38
Figura 14. Comparación de la abundancia relativa individual por grupo experimental	39

Figura 15. Distribución global del log2 Fold Change en el potencial funcional neuroactivo	40
Figura 16. Magnitud de cambio diferencial en metabolitos neuroactivos.....	41
Figura 17. Abundancia relativa individual de metabolitos neuroactivos por muestra.....	42
Figura 18. Integración de la estructura de la microbiota intestinal y el potencial funcional enzimático.....	44
Figura 19. Interacciones Directas: Microbiota vs Metabolitos Neuroactivos	46
Figura 20. Maquinaria Funcional: Enzimas Bacterianas vs Metabolitos Neuroactivos.....	47
Figura 21. Red de co-ocurrencia trans-ómica y fenotípica asociada al desempeño cognitivo	49
Anexo 1. Resultados de la alineación de secuencias mediante BLASTn para la identificación taxonómica de <i>Odoribacter</i> sp13184.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familias bioquímicas, metabolitos y enzimas microbianas asociadas a las rutas metabólicas analizadas en el modelo de linfoma L5178Y-R	19
--	----

RESUMEN

Se reconoce que la microbiota intestinal influye en la comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro, pudiendo modular procesos neurológicos, la progresión del cáncer y el deterioro cognitivo asociado a este. El presente proyecto se enfocó en comprender el papel de la microbiota en las alteraciones cognitivas tempranas relacionadas con el cáncer, utilizando el modelo de linfoma L5178Y-R en ratones hembra BALB/c a los 10 días de la inducción tumoral.

A través del análisis taxonómico y la predicción funcional con PICRUST2, se identificó que la presencia del tumor periférico induce una remodelación selectiva en la composición bacteriana, destacando el incremento en miembros de la familia *Lachnospiraceae* y asociaciones de los géneros *Odoribacter* y *Alistipes*. Funcionalmente, el perfil bacteriano mostró una transición hacia el enriquecimiento relativo de funciones ligadas a la síntesis de aminas biógenas (histamina y poliaminas), en paralelo a una disminución en las rutas asociadas al metabolismo de triptófano y glutamato, sugiriendo una alteración en el potencial metabólico de aminoácidos de la comunidad microbiana intestinal.

Estos cambios funcionales coincidieron con alteraciones conductuales caracterizadas por una menor actividad locomotora y exploratoria en la prueba de Campo Abierto; no obstante, no se detectaron diferencias estadísticas significativas en las pruebas de memoria espacial o de reconocimiento (NOR) en este periodo de evaluación.

En conjunto, la integración de datos mediante redes de co-ocurrencia demuestra que el tumor genera una huella funcional específica en la microbiota intestinal a los 10 días de evolución. Estos resultados respaldan la participación del eje microbiota–intestino–cerebro en la respuesta sistémica al cáncer y señalan a las rutas metabólicas alteradas como nodos clave en la comunicación entre la microbiota y el sistema nervioso durante esta fase de la enfermedad.

ABSTRACT

It is recognized that the gut microbiota influences the bidirectional communication between the gut and the brain, with the potential to modulate neurological processes, cancer progression, and cancer-related cognitive impairment. This work focused on understanding the role of the gut microbiota in the early cognitive alterations associated to the progression of the L5178Y-R lymphoma in female BALB/c mice.

Through taxonomic analysis and functional prediction using PICRUST2, it was identified that the presence of a peripheral tumor induces a selective remodeling of the bacterial composition, highlighting a relative increase in members of the *Lachnospiraceae* family and key associations of the genera *Odoribacter* and *Alistipes*. Functionally, the bacterial profile showed a transition toward a relative enrichment of pathways linked to the synthesis of biogenic amines (histamine and polyamines), in parallel with a decrease in pathways associated with tryptophan and glutamate metabolism, suggesting an alteration in the amino acid metabolic potential of the intestinal microbial community.

These functional shifts coincided with behavioral alterations characterized by reduced locomotor and exploratory activities in the Open Field test; however, no statistically significant differences were detected in spatial memory or recognition memory (NOR) tests during this evaluation period.

Altogether, data integration through co-occurrence networks demonstrates that the tumor generates a specific functional footprint in the gut microbiota at 10 days of evolution. These results support the involvement of the microbiota–gut–brain axis in the systemic response to cancer and point to the altered metabolic pathways as key nodes in the communication between the microbiota and the nervous system during this phase of the disease.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del organismo al cumplir diversas funciones, incluida la modulación cognitiva a través del Eje Cerebro-Intestino-Microbiota (ECIM). Se ha demostrado que la microbiota sintetiza neurotransmisores y sus precursores, los cuales se transmiten al cerebro a través del nervio vago (Adak y Khan, 2019; Rutsch *et al.*, 2020; Jaye *et al.*, 2021).

En los últimos años, esta área de investigación ha adquirido una creciente importancia, especialmente en el ámbito terapéutico para tratar síntomas neuropsiquiátricos. Sin embargo, también ha surgido un interés relevante en el estudio del cáncer, donde se ha observado que el Eje CIM influye en la biología de esta enfermedad. Estudios han revelado diferencias en la composición de la comunidad microbiana entre pacientes sanos y aquellos con cáncer (Wong *et al.*, 2019; Lewandowska-Pietruszka *et al.*, 2022).

Se ha documentado que los pacientes con cáncer experimentan deterioro cognitivo incluso antes de someterse a terapias específicas. Los síntomas más comunes incluyen dificultades en la concentración, la memoria y la toma de decisiones, además de manifestaciones clínicas (Ahles y Root, 2018). Esta asociación entre el cambio en la composición microbiana y la cognición en presencia del cáncer sugiere una relación bidireccional entre el cáncer y la microbiota, planteando la hipótesis de que la microbiota actúa como intermediario de los efectos del tumor sobre el sistema nervioso central (SNC), especialmente en lo que respecta a la función cognitiva.

A pesar de la relevancia de esta idea, la exploración de este fenómeno ha sido limitada, con la mayoría de los estudios enfocados en el impacto de la quimioterapia en la microbiota y la cognición. En este contexto, el presente proyecto busca llenar esta brecha de conocimiento, aprovechando la evidencia previa obtenida en un modelo murino BALB/c que sugiere que un tumor periférico puede influir en la función cognitiva.

2. ANTECEDENTES

2.1. Microbiota

La conceptualización de la microbiota se origina a principios del siglo XX cuando se detecta la coexistencia de una amplia diversidad de microorganismos, tales como bacterias, arqueas, parásitos, levaduras y virus, en distintas regiones del cuerpo humano, en las que se incluye el intestino, la piel, los pulmones y la cavidad bucal. Este conjunto, conocido como microbiota, conforma una comunidad ecológica que coloniza hábitats específicos en el huésped, contribuyendo significativamente en la homeostasis y preservación de esta, en este sentido, participa en el mantenimiento de la salud del huésped (Adak y Khan, 2019; Hou *et al.*, 2022).

La microbiota intestinal, por lo tanto, es “la comunidad de microorganismos residentes en el tubo digestivo” (Icaza-Chávez, 2013). Por otro lado, en la revisión realizada por Riccio y Rossano en 2020, indican que dicha microbiota se tiende a describir como un órgano adicional al cuerpo, de igual manera ambos autores indican que recientemente se ha acuñado el término de “metaorganismo”, el cual describe la íntima conexión entre la microbiota intestinal y el cerebro.

El sistema digestivo humano alberga una vasta y diversa comunidad de microorganismos, superando los 100 billones en número. Se ha estimado que la densidad de bacterias en el colon oscila entre los 10^{11} y 10^{12} por mililitro. Aunque el sistema gastrointestinal (GI) esté compuesto por varios órganos, se ha observado que la mayoría de las bacterias comensales habitan en el colon, mientras que su presencia en el estómago y el intestino delgado es prácticamente insignificante. La composición de esta microbiota abarca entre 500 y 2000 especies de bacterias las cuales pertenecen a los cuatro filos dominantes: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*, siendo los dos primeros los más predominantes (Sender *et al.*, 2016; Rinninella *et al.*, 2019; Rutsch *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022).

La microbiota intestinal desempeña un papel vital en diversos aspectos del cuerpo humano, estas funciones se pueden separar en cuatro rubros: metabólico, inmunológico, fisiológico y neurológico, este último se explicará más adelante (Adak y Khan, 2019).

Además de su contribución al proceso de digestión, donde participa activamente en la extracción, síntesis y absorción de nutrientes esenciales, ácidos biliares, lípidos, aminoácidos, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta (AGCC); tiene un impacto significativo en la defensa del hospedero contra patógenos, esta defensa se lleva a cabo mediante la competencia contra estos microorganismos a través de procesos como el metabolismo de nutrientes, la modificación del pH y la producción de péptidos antimicrobianos (AMP) (Adak y Khan, 2019).

De igual manera, ejerce un papel clave en la regulación del sistema inmunológico, influyendo en el desarrollo, la homeostasis y la función de las células inmunitarias, tanto innatas como adaptativas. La interacción entre ambas partes es compleja. Los productos derivados de la microbiota activan receptores en las células intestinales e inmunitarias, afectando tanto a la respuesta inmune local como a la sistémica (Zheng *et al.*, 2020).

Se ha reconocido que las modificaciones en la composición de la microbiota pueden interrumpir la relación simbiótica y favorecer la aparición de diversas enfermedades, correlacionándose con un estado de salud deficiente en el huésped. Específicamente, el desequilibrio de la microbiota conduce a la disbiosis, lo cual puede resultar en condiciones como obesidad, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, disfunción metabólica, inflamación y cáncer, solo por mencionar algunas (Jaye *et al.*, 2021).

2.2. Microbiota y conducta

Existe una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro, a esto se le conoce como “Eje intestino-cerebro” (Gut Brain Axis, en inglés), la cual es crucial tanto para la salud mental como para el comportamiento del individuo. Este vínculo se establece a través de la interacción del sistema nervioso entérico (SNE) y el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal, así como por la microbiota intestinal. Además, forma parte del eje cerebro-intestino-microbiota (ECIM), el cual facilita la comunicación entre el sistema nervioso central con el aparato digestivo. El ECIM incluye componentes como el cerebro, el sistema nervioso autónomo (SNA) (incluyendo los sistemas simpático, parasimpático y entérico), la médula espinal y los sistemas neuroendocrino y neurohumoral. Aspectos esenciales para su óptimo funcionamiento son la diversidad bacteriana y la integridad de la barrera intestinal, que se

reflejan tanto en la preservación de la salud mental como en el bienestar global del individuo (Adak y Khan, 2019; Bustos-Fernández y Hanna-Jairala, 2022).

La microbiota tiene la capacidad de sintetizar moléculas neuroactivas que contribuyen a esta compleja red de comunicación como lo son los neurotransmisores (sustancias químicas que pueden moverse entre las neuronas a través de la sinapsis, facilitando así la transmisión de señales que regulan diversos comportamientos) y sus precursores (mayormente aminoácidos como triptófano o tirosina), implicando una conexión directa entre la síntesis de estos en el intestino y la actividad neuronal y cognitiva del cerebro (movimiento, emociones, aprendizaje y memoria) (Rutsch *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021).

Específicamente precursores de la acetilcolina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la serotonina, sintetizadas por bacterias como lo son: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacteria*, influyen en los procesos fisiológicos del cerebro. Es importante resaltar que la mayoría de la serotonina que se requiere tanto para algunas funciones cerebrales como gastrointestinales, el estado de ánimo, el comportamiento y el sueño, se produce en el intestino (90%); y su unión a los receptores cerebrales desencadena la liberación de exosomas que participan en la regulación de la neuroinflamación (Rutsch *et al.*, 2020).

El triptófano, precursor de la serotonina, no ejerce un papel directo en la activación de la microglía, las células inmunes del sistema nervioso central. Sin embargo, su metabolismo puede influir en la activación de dichas células; es importante señalar que la microglía metaboliza el triptófano y genera como producto final el ácido quinolínico, una neurotoxina que está asociada con diversas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Huntington y la depresión. Además, la presencia de bacterias en el intestino puede modificar la neurotransmisión serotoninérgica, lo que probablemente contribuye a la reducción de la ansiedad (Rutsch *et al.*, 2020).

En 2020 se realizó un estudio por Liu *et al.*, donde se investigó el mecanismo regulador mediante el cual la microbiota intestinal influye sobre el comportamiento asociado a la depresión en modelo de ratas libres de gérmenes. Trasplantando microbiota fecal de individuos con depresión y controles sanos en las ratas, se encontró que las ratas con trasplante de pacientes deprimidos mostraron comportamientos similares a la depresión.

Además, se observaron alteraciones en los niveles de neurotransmisores, hormonas del estrés y citocinas inflamatorias tanto en el cerebro como en la sangre. De igual manera, se evidenciaron daños en la estructura de las mitocondrias en las células intestinales, sugiriendo una estrecha relación entre la microbiota intestinal y los trastornos neuroendocrinos, inflamatorios y mitocondriales asociados con la depresión.

Agranyoni *et al.*, en el 2021 estudiaron el impacto de la composición de la microbiota intestinal en los patrones de comportamiento social establecidos de dominancia y sumisión en un modelo de ratón Sabra, así como comprender las posibles asociaciones entre la microbiota intestinal, el perfil metabólico e inflamatorio del tejido adiposo blanco y el comportamiento social en dicho modelo. Los resultados revelaron diferencias significativas en la microbiota entre estos dos grupos de ratones, siendo los sumisos quienes poseen menos diversidad microbiana, con la presencia de los géneros *Mycoplasma* y *Anaeroplasm* pertenecientes al filo *Tenericutes*, mientras que los dominantes poseían mayor presencia del género *Prevotella* del filo *Bacteroidetes*, el cual era menos abundante en los sumisos. Además, los ratones sumisos mostraron menos peso corporal, una reducción en la masa de tejido adiposo blanco y una expresión elevada de marcadores inflamatorios en comparación con los dominantes. Mediante trasplantes de microbiota fecal, se confirmó que la composición bacteriana influye en los comportamientos asociados con la sumisión. Por lo tanto, estos hallazgos destacan el papel crucial de la microbiota intestinal en la determinación de los patrones de comportamiento social en los ratones Sabra.

Mientras tanto, Chu *et al.*, (2020) examinaron el papel de la microbiota en la función cerebral y el comportamiento en ratones adultos. Las manipulaciones de la microbiota mediante tratamientos con antibióticos o mediante la cría de ratones libres de gérmenes resultaron en déficits significativos en la capacidad de los ratones para superar el miedo condicionado, un proceso conocido como “fear extinction learning”, alteraciones en la expresión génica en el cerebro y reducción de la actividad en neuronas codificadoras de señales. Además, el análisis metabolómico identificó metabolitos relacionados con trastornos neuropsiquiátricos: sulfato de fenilo, sulfato de pirocatechol, ácido 3-(3-sulfooxifenil) propanoico y sulfato de indoxilo, sugiriendo una influencia directa de la microbiota en la función cerebral.

Bravo *et al.*, (2011) investigaron el efecto directo de *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1), una bacteria del ácido láctico, en los receptores de neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) en ratones sanos BALB/c. Se observó que el tratamiento con JB-1 provocó cambios en la expresión del mRNA del receptor de GABA (B1b) en diversas regiones cerebrales, con un aumento en las regiones corticales y reducciones en el hipocampo, amígdala y el locus coeruleus. Este tratamiento también redujo los niveles de corticosterona inducida por estrés y mitigó comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión. Estos efectos fueron evidentes en ratones intactos, pero no en aquellos vagotomizados, lo que sugiere la importancia de la comunicación intestino-cerebro a través del nervio vago. Por lo que se concluye que la manipulación de la microbiota induce cambios en el comportamiento del individuo.

Ray *et al.*, (2021) examinaron los efectos del tratamiento con vancomicina en la microbiota intestinal de ratones BALB/c y C57BL/6 y cómo estos cambios afectan su comportamiento. Se encontró que el uso de antibióticos alteró significativamente la microbiota intestinal, lo que coincidió con los cambios en el comportamiento de los individuos, incluyendo niveles elevados de ansiedad y comportamiento depresivo. Así mismo, se observó una disminución en la abundancia relativa de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que aumentaron los filos *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*.

Estos hallazgos subrayan la importancia de la microbiota intestinal en la regulación del comportamiento y la salud mental.

2.3. Microbiota y cáncer

El cáncer, según Brown y colaboradores, en una actualización de su definición en el 2023, lo definen como: “Una enfermedad de proliferación incontrolada de las células transformadas sujetas a evolución por selección natural”.

A pesar de que está ampliamente aceptado que el cáncer resulta de una interacción compleja entre la predisposición genética y factores ambientales, se ha sugerido que la influencia de los microorganismos en el desarrollo del cáncer podría contribuir alrededor del 20% de los cánceres en los humanos (Ağagundüz *et al.*, 2023).

En la actualidad se acepta que la composición de la microbiota intestinal puede tener un impacto significativo en la predisposición a diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. Por otra parte, se ha observado que el cáncer tiene la capacidad de modificar la composición de la microbiota intestinal en modelos murinos, lo que potencialmente conduce a una disbiosis y promueve el crecimiento tumoral (Long, 2023).

La relación entre la microbiota y el cáncer es sumamente compleja y multifacética. Por un lado, la microbiota presente en el intestino juega un papel fundamental en la aparición, progresión, tratamiento y pronóstico de varios tipos de cáncer. Esta influencia se manifiesta a través de una serie de mecanismos, que incluyen la regulación del sistema inmunológico, la activación de inflammasomas, la influencia en vías hormonales y la producción de metabolitos que pueden tanto estimular como inhibir el crecimiento tumoral. Por otro lado, el cáncer también puede alterar la composición y función de la microbiota intestinal, provocando un desequilibrio conocido como disbiosis (Sun *et al.*, 2023).

Las interacciones entre la microbiota y el cáncer se pueden categorizar en tres niveles distintos. En primer lugar, las interacciones primarias se caracterizan por una asociación directa entre la microbiota y el entorno tumoral. Aquí, la microbiota intestinal puede desencadenar procesos carcinogénicos y también influir en la respuesta del tumor a la quimioterapia. Por otro lado, las interacciones secundarias comprenden las conexiones entre la comunidad microbiana local y los tumores dentro del mismo entorno físico. Estas interacciones pueden proporcionar pistas valiosas para la detección temprana del cáncer, ya que los cambios en la microbiota local pueden reflejar la presencia de tumores en desarrollo. Por último, las interacciones terciarias describen cómo las comunidades microbianas en lugares distantes del cuerpo pueden influir en la eficacia de la quimioterapia y, a su vez, servir como marcadores para el diagnóstico de cáncer en etapas avanzadas. Esta clasificación subraya la complejidad de las relaciones entre la microbiota y el cáncer (Jaye, 2021).

Es relevante destacar que en pacientes con cáncer se ha observado un aumento en el riesgo de experimentar deterioro cognitivo, también conocido como "neblina mental" o "cerebro nublado". Este fenómeno se caracteriza por dificultades en la concentración, la memoria y la toma de decisiones, lo que impacta significativamente en la calidad de vida de los pacientes. Además, se ha reportado que pacientes con cáncer llegan a tener esta disfunción cognitiva

antes del tratamiento o cirugía, inclusive antes de un diagnóstico definitivo. Se ha documentado que el 30% de pacientes diagnosticados con tumores sólidos presentan problemas cognitivos inclusive antes de iniciar cualquier tratamiento antineoplásico, por lo tanto, dada esta situación, se ha adoptado el término “deterioro cognitivo relacionado con el cáncer” (CRCI) (Ahles y Root, 2018; Iranzo *et al.*, 2023; Grassi *et al.*, 2023).

Los cambios en la cognición relacionados al cáncer podrían vincularse con presencia de inflamación tanto del área afectada como en el sistema en su totalidad, junto con una liberación aumentada de sustancias mediadoras que promueven la inflamación, Esta situación puede dar lugar a la activación de una respuesta inflamatoria en el SNC, lo que se conoce como “neuroinflamación”. De igual manera, dichos cambios también están relacionados con una disfunción del eje ECIM, su disfunción está mayormente estudiada en pacientes que están o han salido de tratamientos contra el cáncer, específicamente quimioterapias. Asimismo, estos se entrelazan con factores biológicos como lo son la edad, la biología del tumor y los factores de riesgo genético (Lomeli *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La microbiota intestinal influye en el comportamiento humano a través del eje microbiota intestino-cerebro (ECIM), y su papel cobra especial relevancia en pacientes con cáncer, quienes enfrentan un mayor riesgo de deterioro cognitivo, conocido como "neblina mental", que impacta significativamente la calidad de vida de los pacientes. Investigaciones han demostrado que la composición de la microbiota puede modificar el comportamiento.

Mediante los análisis metagenómico y metabolómico de ratones sanos y portadores de tumor, se busca proporcionar nuevo conocimiento con respecto a cómo la composición bacteriana afecta el comportamiento en este contexto específico para ofrecer perspectivas valiosas sobre la regulación del comportamiento por parte de la microbiota intestinal y su potencial en el tratamiento de un síndrome que afecta la calidad de vida del sobreviviente del cáncer.

4. HIPÓTESIS

Las alteraciones cognitivas observadas en el modelo de cáncer murino L5178Y-R están asociadas a cambios en el metaboloma y la diversidad del microbioma intestinal de los ratones BALB/c portadores del linfoma.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo general

Evaluar cambios en el metaboloma y diversidad de la microbiota intestinal en un modelo murino de linfoma que desarrolla alteraciones cognitivas.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la memoria a corto plazo y espacial en ratones BALB/c portadores del linfoma L5178Y-R.
2. Analizar la diversidad de la microbiota intestinal en ratones BALB/c portadores del linfoma L5178Y-R.
3. Predecir mediante bioinformática el perfil metabolómico de la microbiota intestinal en ratones BALB/c portadores del linfoma L5178Y-R.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología utilizada en este proyecto se basó en lo descrito por García y Miranda, 2018; Wang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020; Gates *et al.*, 2023.

6.1. Animales

En este estudio, se adquirieron ratones hembra BALB/c de entre 8 y 10 semanas de edad, suministrados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL. Cada ratón fue marcado para su identificación y se alojaron en jaulas con acceso a comida y agua *ad libitum*. El aserrín utilizado fue esterilizado en la autoclave. Se mantuvieron un ambiente lo más desinfectado posible y se estableció un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (7 a.m. - 7 p.m.), con una temperatura controlada de 24°C y una humedad relativa del 45%. Los ratones se agruparon en jaulas con un máximo de 4 individuos para evitar el estrés por aislamiento. Todos los procedimientos de trabajo con los animales cumplieron con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y fueron sometidos para su revisión por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEIBA-FCB-02/2024) UANL.

6.2. Inoculación de células tumorales

Previo al inicio del experimento, se recolectaron muestras fecales de todos los individuos ($n = 9$). Posteriormente, los ratones fueron inoculados con células tumorales L5178Y-R suspendidas en buffer fosfato salino (PBS), mediante administración subcutánea en la extremidad posterior derecha.

Se realizó una segunda recolección de muestras fecales al día 10 del experimento. Los animales fueron eutanasiados al finalizar el periodo experimental. Se excluyeron del análisis aquellos individuos que presentaron tumores con un volumen superior a 20 mm³.

6.3. Pruebas conductuales

Con el objetivo de evaluar las alteraciones conductuales asociadas al desarrollo del linfoma, los ratones fueron sometidos a diversas pruebas conductuales en dos momentos experimentales: el día de la inoculación (antes de la misma) y el día 10 posterior a la inducción tumoral. Las pruebas realizadas incluyeron Campo Abierto (CA) (Figura 1A),

Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR) (Figura 1B) y Laberinto en Y (Lab Y) (Figura 1C).

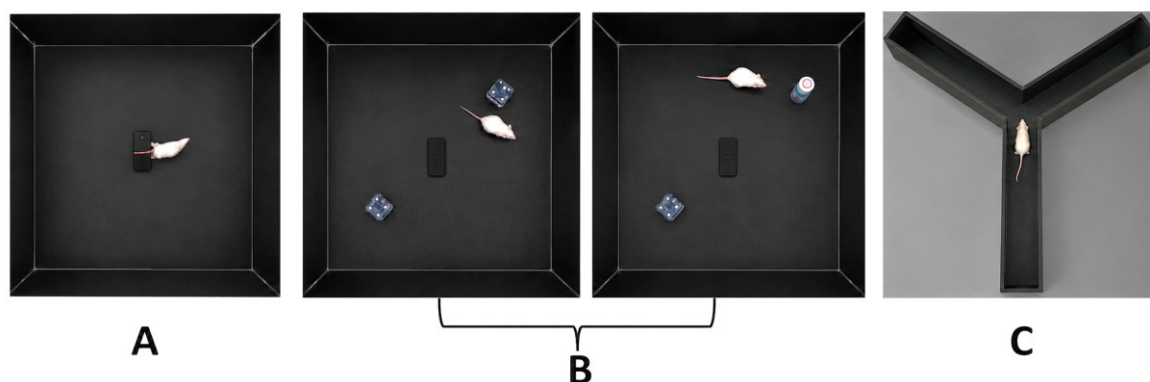


Figura 1. Representación de las pruebas conductuales para la evaluación de la locomoción, ansiedad y memoria en el modelo murino. Vista superior del montaje experimental: (A) Arena de Campo Abierto (CA) utilizada para medir la actividad locomotora y conducta tipo ansiedad durante la fase de exploración libre. (B) Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR) realizada en la misma arena, mostrando la fase de familiarización con dos objetos idénticos (*izquierda*) y la fase de prueba tras la sustitución por un objeto novedoso (*derecha*) para la evaluación de la memoria de reconocimiento. (C) Laberinto en Y (Lab Y) empleado para determinar el índice de alternancia espontánea como indicador de memoria de trabajo espacial.

La prueba de Campo Abierto se llevó a cabo en una arena cúbica de acrílico negro con dimensiones de 50 cm x 50 cm x 50 cm. Cada ratón exploró libremente la arena durante 5 minutos, seguidos de 5 minutos de descanso. Durante este período de descanso, la arena se limpió con etanol al 70% y se colocaron dos objetos idénticos en esquinas opuestas. Al término del periodo de descanso, los animales fueron reintroducidos en la arena y se cronometró el tiempo que pasaron interactuando con cada objeto, con un requisito mínimo de 20 segundos de interacción. Se les otorgó de 5 a 10 minutos para completar estos tiempos de interacción. Los roedores que no lograron cumplir con el tiempo mínimo de interacción fueron excluidos de la prueba NOR.

Tras un segundo período de descanso de 5 minutos, la arena se limpió nuevamente con etanol al 70%. Esta vez, se colocó un objeto idéntico al anterior y un objeto completamente diferente en esquinas opuestas. Cada individuo tuvo la oportunidad de interactuar con ambos objetos durante 5 minutos, y se registró el tiempo de interacción para calcular el porcentaje del índice de interacción mediante la Ecuación (1).

$$\text{Índice de interacción (\%)} = \frac{ObjN}{ObjV + ObjN} * 100 \quad (1)$$

Donde:

ObjN: tiempo de interacción con el objeto nuevo (s).

ObjV: tiempo de interacción con el objeto conocido (s).

Se consideró que un índice de interacción superior al 50 % indicaba una preferencia por el objeto novedoso, consistente con una memoria de reconocimiento intacta.

La prueba de Campo Abierto es utilizada para medir la locomoción general de los individuos y su nivel de ansiedad. Este último se mide principalmente a través del tiempo que los roedores pasan en el centro del área. La conducta normal de los roedores es permanecer en las orillas, ya que estar expuestos en el centro los hace más vulnerables a posibles depredadores, no obstante, su capacidad exploratoria les permite, una vez que se sientan seguros en el entorno, comenzar a aventurarse hacia el centro para explorar el área en su totalidad. Este comportamiento proporciona información del estado emocional de los individuos y su disposición a explorar. Por ende, un mayor tiempo en el centro y una mayor ratio de exploración indican que el individuo tiene un comportamiento normal.

Las variables evaluadas durante esta prueba fueron:

- Ratio de movilidad (%): proporción del tiempo en que el animal permaneció en movimiento con respecto al tiempo total de la prueba.
- Distancia total recorrida (mm): distancia acumulada recorrida por el animal durante toda la prueba.
- Velocidad promedio (mm/s): distancia total recorrida dividida entre el tiempo total de la prueba.
- Tiempo en el centro (s): tiempo durante el cual el animal permaneció en la zona central de la arena.
- Ratio de exploración (%): porcentaje de exploración reportado por el software ToxTrac.

La prueba de Lab Y se llevó a cabo en un laberinto de acrílico negro de 3 brazos de 40 cm x 8 cm y paredes de 10 cm de altura. Los brazos se identifican como A, B y C, manteniendo la misma nomenclatura durante todo el estudio. Cada individuo fue colocado al inicio del brazo A, en el extremo opuesto al centro del laberinto, y se le permitió explorar libremente durante 5 min.

Se registró cada entrada a los diferentes brazos para calcular el índice de alternancia espontánea la Ecuación (2).

$$\text{Índice de alternancia espontánea (\%)} = \frac{nAltC}{nTotal - 2} * 100 \quad (2)$$

Donde:

nAltC: número de alternancias correctas.

nTotal: número total de entradas a los brazos del laberinto.

El índice de alternancia espontánea refleja la capacidad del animal para recordar los brazos previamente explorados y seleccionar preferentemente un brazo diferente, por lo que constituye un indicador de memoria de trabajo.

Las variables evaluadas durante esta prueba fueron:

- Número total de entradas (adimensional).
- Número de alternancias correctas (adimensional).
- Índice de alternancia espontánea (%).

El objetivo fue analizar cómo la combinación del tumor y la microbiota afecta el comportamiento de los ratones portadores. Los videos obtenidos fueron procesados en el software ToxTrac (versión 2.84 / v1.1; Rodríguez *et al.*, 2018).

6.4. Obtención de heces

Posteriormente, para caracterizar la microbiota intestinal, se recolectaron muestras fecales de cada individuo en los dos tiempos experimentales establecidos. Las heces fueron recolectadas en tubos estériles de 1.5–2 mL por individuo y almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento.

6.5. Taxonomía metagenómica

Las muestras fecales obtenidas fueron procesadas para la extracción de ADN y la caracterización taxonómica de la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

El ADN fue extraído a partir de 180–220 mg de muestra fecal utilizando el kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania, 2011; No. de catálogo 51504), de acuerdo con el protocolo del fabricante (2010).

La calidad del ADN se evaluó mediante espectrofotometría UV-Vis (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), considerando valores A260/A280 entre 1.7–2.0 y concentraciones superiores a 30 ng/μL. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, las muestras fueron normalizadas a una concentración final de 100 ng/μL.

Las alícuotas de ADN normalizado fueron enviadas para su secuenciación de alto rendimiento a la empresa Zymo Research Corporation (Irvine, CA, EE. UU.). Se amplificó la región hipervariable V3–V4 del gen ARNr 16S y las bibliotecas fueron secuenciadas en la plataforma Illumina. La asignación taxonómica de las secuencias se realizó utilizando el flujo de trabajo bioinformático basado en la base de datos de referencia SILVA.

6.6. Obtención de perfiles metabólicos

Finalmente, a partir de la información taxonómica obtenida, se realizó la inferencia del potencial funcional de la microbiota intestinal se realizó utilizando PICRUSt2 (v2.6.2). El análisis fue ejecutado en un entorno Linux (Pop!_OS) mediante el gestor de entornos Conda, lo que permitió garantizar la reproducibilidad y compatibilidad de las dependencias requeridas por el pipeline bioinformático.

Este análisis permitió inferir el potencial funcional de la comunidad microbiana a partir de los datos de secuenciación del gen 16S ARNr, generando perfiles metabólicos predichos para cada grupo experimental. Las funciones obtenidas fueron clasificadas mediante códigos de la Comisión Enzimática (Enzyme Commission, EC), permitiendo identificar enzimas potencialmente involucradas en la síntesis, transformación o degradación de neurotransmisores y otros metabolitos neuroactivos.

Tabla 1. Familias bioquímicas, metabolitos y enzimas microbianas asociadas a las rutas metabólicas analizadas en el modelo de linfoma L5178Y-R

Familia Bioquímica	Compuesto	Código EC	Nombre Enzimático Asociado
Aminoácidos Neuroactivos	Glutamato	1.4.1.13	Glutamato deshidrogenasa
	GABA	1.4.1.15	Glutamato deshidrogenasa (NADP+)
	Triptófano	4.2.1.20	Triptófano sintasa
Catecolaminas y Precursores	DOPA	1.14.16.2	Tirosina 3-monooxigenasa
	Dopamina	4.1.1.28	Aromático-L-aminoácido descarboxilasa
	Catecolaminas_metil	2.1.1.6	Catecol O-metiltransferasa (COMT)
Aminas Biogénicas / Trazas	Serotonina	1.14.16.4	Triptófano 5-monooxigenasa
	Histamina	4.1.1.22	Histidina descarboxilasa
	Tiramina	4.1.1.25	Tirosina descarboxilasa
	Feniletilamina	4.1.1.43	Fenilalanina descarboxilasa
	Triptamina	4.1.99.1	Triptofanasa / Triptófano descarboxilasa
Poliaminas	Agmatina	4.1.1.19	Arginina descarboxilasa
	Cadaverina	4.1.1.18	Lisina descarboxilasa
	Putrescina	4.1.1.17	Ornitina descarboxilasa
	Espermidina	2.5.1.16	Espermidina sintasa
	Espermina	2.5.1.22	Espermina sintasa
	N_Acetilputrescina	2.3.1.57	Putrescina N-acetiltransferasa
Vía de la Quinurenina	Quinurenina	1.13.11.11	Triptófano 2,3-dioxigenasa
	Formamidasa	3.5.1.9	Formamidasa
	Quinureninasa	3.7.1.3	Quinureninasa
Metabolitos Bacterianos Libres	Indol	1.13.11.52	Indoleoxigenasa
	TMA (Trimetilamina)	4.1.2.8	Liasas de corte C-N / Isocitrato liasa
Otros Compuestos Nitrogenados	Acetilcolina_prec	2.7.1.32	Colina quinasa
	Creatinina	3.5.3.3	Creatinina amidohidrolasa

6.7. Análisis de la estructura, diversidad y perfiles de la microbiota intestinal

El análisis bioinformático de la microbiota intestinal se ejecutó a distintos niveles taxonómicos (filo, familia y especie). Para la evaluación del ecosistema microbiano global, se calcularon los índices de diversidad alfa: el índice de Shannon (para evaluar la diversidad global), el índice de Simpson (para evaluar la dominancia) y la equitabilidad de Simpson (para evaluar la uniformidad en la distribución de los taxones), a partir de la matriz original de abundancias absolutas sin modificaciones.

La diversidad beta se determinó mediante la estimación de **matrices de disimilitud** basadas en la métrica de Bray-Curtis. Las diferencias composicionales globales entre las comunidades de los grupos experimentales se evaluaron mediante un Análisis de Varianza Permutacional Multivariado (PERMANOVA). Complementariamente, se realizó un análisis de Dispersión Permutacional (PERMDISP) para examinar la homogeneidad de las varianzas e identificar si los patrones de agrupamiento obedecían a cambios en el centroide multivariado o a heterogeneidad en la dispersión interna de las muestras. Para caracterizar la estabilidad temporal y variabilidad de la comunidad microbiana dentro de un mismo sujeto entre las condiciones experimentales, se computó formalmente la distancia de Bray-Curtis intraindividual.

A nivel de filo y familia, la composición taxonómica se representó mediante perfiles de abundancia relativa. Con el objetivo de reducir la dimensionalidad ecológica a nivel de especie y mitigar el ruido de taxones transitorios, se aplicó un filtro de inclusión basado en la contribución acumulada de abundancia relativa, reteniendo las especies que explicaran el 90% de la abundancia total por grupo de estudio.

Para evaluar las transiciones estructurales entre condiciones de forma bidireccional, se construyeron dos conjuntos de datos contrastados:

1. El perfil dominante en Basal, compuesto por las especies del top 90% en la condición Basal y evaluando la abundancia de este mismo conjunto en la condición Tumor; y
2. El perfil dominante en Tumor, compuesto por las especies del top 90% en la condición Tumor y contrastado contra sus respectivas abundancias en Basal.

Las matrices resultantes fueron normalizadas mediante la transformación matemática de Hellinger para contrarrestar la dominancia artificial de especies hiperabundantes. A partir de estos datos transformados, se construyeron mapas de calor (*heatmaps*) con agrupamiento jerárquico dual (clústeres basados en la similitud de muestras y en perfiles de co-ocurrencia de especies) para explorar visualmente la reestructuración del ecosistema entre las condiciones Basal y Tumor.

6.8. Modelado de cambio biológico (log₂ Fold Change) y exclusividad taxonómica

Para evaluar la magnitud y dirección de los cambios asociados a la condición tumoral, se calculó el log₂ Fold Change (log₂FC) utilizando el contraste matemático log₂(Tumor/Basal). Este análisis se aplicó de manera independiente en dos niveles:

- **Dimensión taxonómica**, evaluando las variaciones en la abundancia relativa de las especies bacterianas de la microbiota intestinal.
- **Dimensión funcional**, evaluando los cambios en las abundancias predichas de neurotransmisores y metabolitos neuroactivos obtenidos mediante inferencia funcional con PICRUST2.

Para ambas dimensiones se generaron distribuciones de densidad Kernel con el fin de visualizar el comportamiento global de los cambios biológicos entre grupos. Posteriormente, se identificaron las entidades con mayor magnitud de cambio absoluto y se representaron mediante gráficos de barras y diagramas de abundancia individual por muestra, permitiendo evaluar la consistencia de las tendencias observadas entre réplicas biológicas.

Adicionalmente, se realizó una evaluación de exclusividad taxonómica para identificar especies bacterianas detectadas únicamente en una de las condiciones experimentales. Para ello se calcularon las abundancias promedio de los taxones exclusivos del grupo Basal y del grupo Tumor, permitiendo caracterizar posibles poblaciones bacterianas asociadas específicamente a cada estado biológico.

6.9. Integración trans-ómica y fenotípica mediante análisis de redes

Con el objetivo de integrar la información taxonómica, funcional y conductual obtenida a lo largo del estudio, se construyeron redes de co-ocurrencia basadas en análisis de correlación

entre las variables de interés. Dependiendo de la distribución de los datos, las asociaciones fueron estimadas mediante correlaciones de Pearson o Spearman. Los coeficientes de correlación se calcularon utilizando la función *calc_cor_fast*.

Se conservaron únicamente aquellas asociaciones que cumplieron simultáneamente los criterios de significancia estadística ($p < 0.05$) y fuerza de asociación biológicamente relevante ($|r| \geq 0.7$). Las correlaciones positivas y negativas se representaron como aristas dentro de las redes, mientras que las distintas entidades biológicas fueron representadas como nodos.

La integración se organizó en tres niveles complementarios:

- **Red microbiota–metabolitos neuroactivos.** Se analizaron las asociaciones entre especies bacterianas y neurotransmisores o metabolitos neuroactivos predichos por PICRUST2.
- **Red enzimas–metabolitos neuroactivos.** Se evaluaron las asociaciones entre enzimas clasificadas mediante códigos Enzyme Commission (EC), predichas por PICRUST2, y los metabolitos neuroactivos potencialmente relacionados con dichas funciones metabólicas.
- **Red trans-ómica y fenotípica.** Se integraron los componentes centrales de la microbiota intestinal y del potencial funcional neuroactivo con las variables conductuales obtenidas en las pruebas de Reconocimiento de Objeto Novedoso (Interacción NOR) y Laberinto en Y (Alternancia espontánea), con el propósito de explorar posibles asociaciones entre la microbiota intestinal, la función neuroactiva predicha y el desempeño cognitivo.

6.10. Análisis estadístico

La normalidad de los datos numéricos provenientes de la conducta animal, abundancias y variables metabólicas se evaluó mediante los estadísticos de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre las condiciones Basal y Tumor en el mismo sujeto se evaluaron mediante la prueba *t* de Student pareada para variables con distribución normal, y mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para datos con distribución no normal. Para todos los análisis estadísticos univariados, multivariados y topológicos, se fijó un nivel

de significancia de $\alpha = 0.05$, determinando que los valores de $p \leq 0.05$ denotaban significancia estadística.

El procesamiento bioinformático global, la manipulación de matrices complejas, el modelado gráfico y matemático de redes se realizaron en el entorno de programación R versión 4.4.2 (2024-10-31, UCRT), utilizando el ecosistema de paquetes conformado por: *vegan* (diversidad ecológica, PERMANOVA, PERMDISP), *igraph* y *ggraph* (topología de redes e interactómica), *tibble* (estructuración de datos indexados), *patchwork* (ensamblaje de paneles multifigura) y *ggplot2* (visualizaciones de alta resolución). Los análisis estadísticos univariados complementarios y el refinamiento estético de gráficos vectoriales específicos se realizaron empleando GraphPad Prism versión 10.1.0 (316).

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación conductual

En la prueba de Campo Abierto (Figura 2), se presenta una comparación entre grupos en cuanto a la Distancia Total recorrida, Ratio de Exploración, Ratio de Movilidad y Velocidad Promedio. Se observa una diferencia significativa entre el grupo basal y grupo tumor. No obstante, no hubo diferencias significativas en cuanto al Tiempo en el Centro, a pesar de eso, se puede observar una ligera tendencia hacia la reducción de dicho tiempo en grupo tumor.

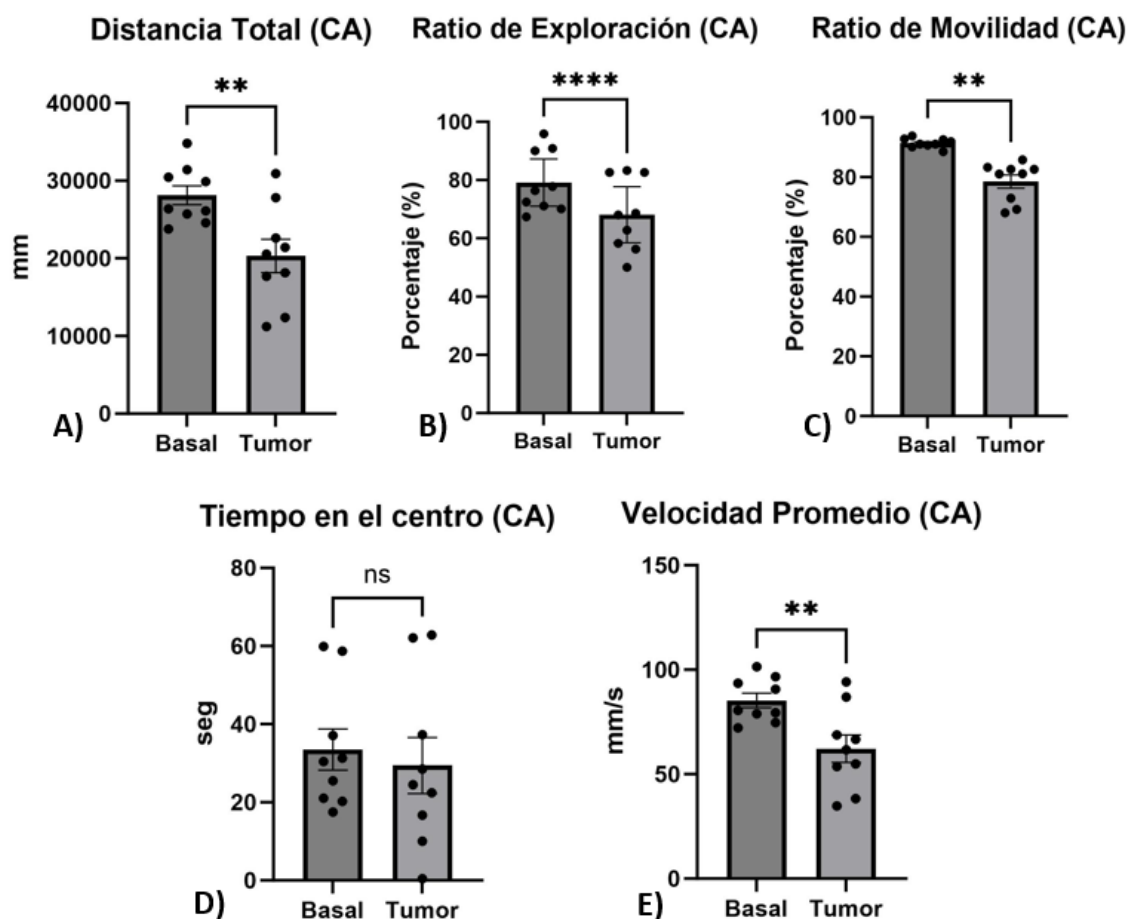


Figura 2. Resultados de la prueba conductual de Campo Abierto. Distancia total recorrida en la arena (mm) (A), Ratio de Exploración (%) (B), Ratio de movilidad (%) (C), Tiempo en el centro (seg) (D) y Velocidad promedio (mm/s) (E) por grupo de estudio durante las pruebas basales y finales. Los resultados se expresan con la media $\pm$ el error estándar, se consideran significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*). Ratio de Movilidad ($p = 0.0039$), Distancia Total ($p = 0.0023$), Tiempo en el Centro ($p = 0.4608$), Ratio de Exploración ($p < 0.0001$), Velocidad Promedio ($p = 0.0019$).

La Figura 3 muestra los resultados de la comparación del índice de alternancia (3A) y de interacción (3B) entre ambos grupos. Ninguno de estos presentó diferencias significativas, sin embargo, existe una tendencia al aumento del índice de alternancia y una reducción del índice de interacción en grupo tumor.

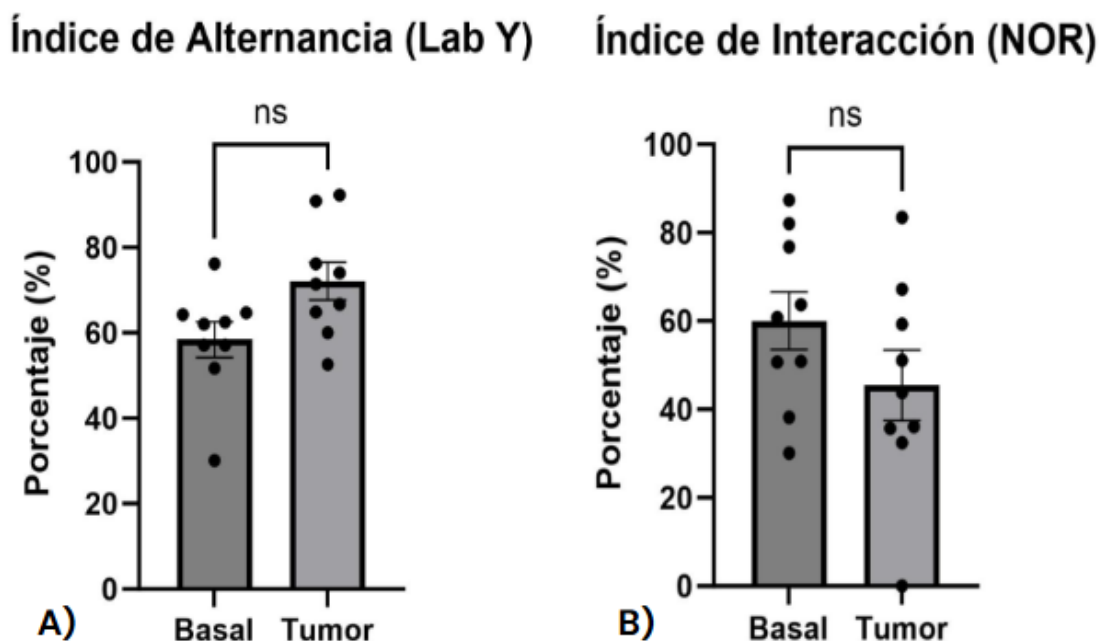


Figura 3. Resultados de las pruebas conductuales de Laberinto en Y (Lab Y) y Reconocimiento de Objeto Novedoso (NOR). Índice de Alternancia (%) (A) e índice de Interacción (%) (B) por grupo de estudio durante las pruebas basales y finales. Los valores se expresan con la media $\pm$ el error estándar, se consideran significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*). Índice de Alternancia ($p = 0.0891$), Índice de Interacción ($p = 0.0891$).

7.2. Análisis de Diversidad y Composición de la Microbiota Intestinal

En la Figura 4 se observan los tres índices de diversidad alfa evaluados: Índice de Shannon (A), Índice de Simpson (B) e Índice de Equitatividad de Simpson (Simpson Evenness, C). En ninguno de estos métricos existieron diferencias estadísticamente significativas entre la condición Basal y la condición Tumor ($p > 0.05$); sin embargo, se identificaron tendencias a la reducción en los valores promedio de diversidad en presencia del tumor.

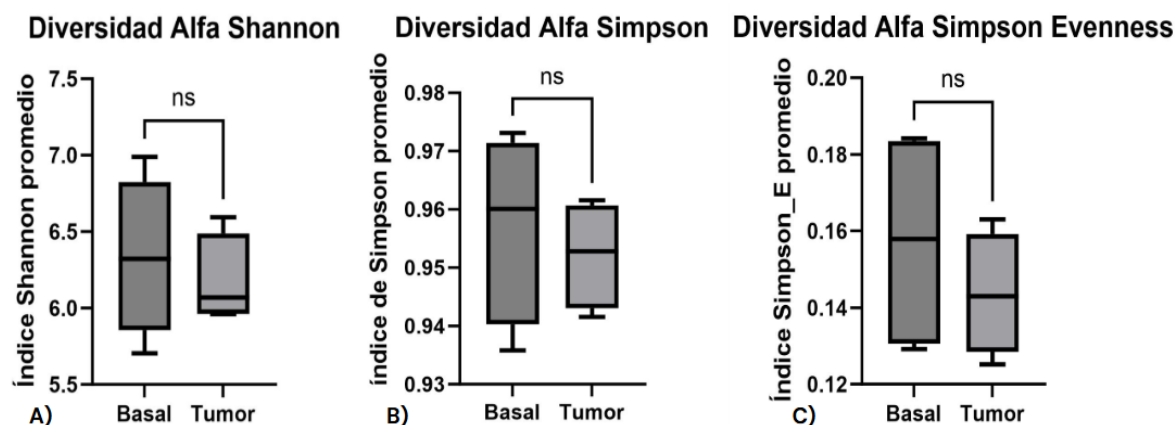


Figura 4. Índices de Diversidad Alfa. Índice de Shannon (A), Índice de Simpson (B) e Índice de Simpson E (C) por grupo de estudio. Se consideran significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*). Diversidad Alfa Shannon ($p = 0.7500$), Diversidad Alfa Simpson ($p = 0.7500$), Diversidad Alfa Simpson Evenness ($p = 0.5000$).

El análisis de diversidad beta mediante distancia Bray-Curtis y ordenación PCoA mostró que los dos primeros ejes explicaron el 72.4 % de la variación total ($PC1 = 47.9$ %, $PC2 = 24.5$ %) (Figura 5). Visualmente, las muestras de los grupos basal y tumoral no formaron agrupamientos claramente separados, observándose un solapamiento considerable entre grupos. Estos resultados sugieren que la presencia del tumor no indujo cambios globales marcados en la composición de la microbiota intestinal.

El análisis PERMANOVA no detectó diferencias estadísticamente significativas en la composición microbiana global entre las condiciones Basal y Tumor ($F = 0.4346$, $R^2 = 0.098$, $p = 0.80$), indicando que la presencia tumoral no produjo una reorganización composicional global marcada de la microbiota intestinal bajo las condiciones evaluadas.

De manera consistente, el análisis de dispersión multivariada (PERMDISP) mostró que la dispersión intragrupo fue comparable entre ambas condiciones experimentales ($F = 0.0808$, $p = 0.8014$ mediante prueba de permutaciones). sugiriendo niveles similares de heterogeneidad microbiana dentro de cada grupo.

En conjunto, estos resultados indican que, aunque la estructura global de la microbiota intestinal permaneció relativamente estable, podrían existir alteraciones específicas en determinados taxones bacterianos asociadas a la presencia tumoral.

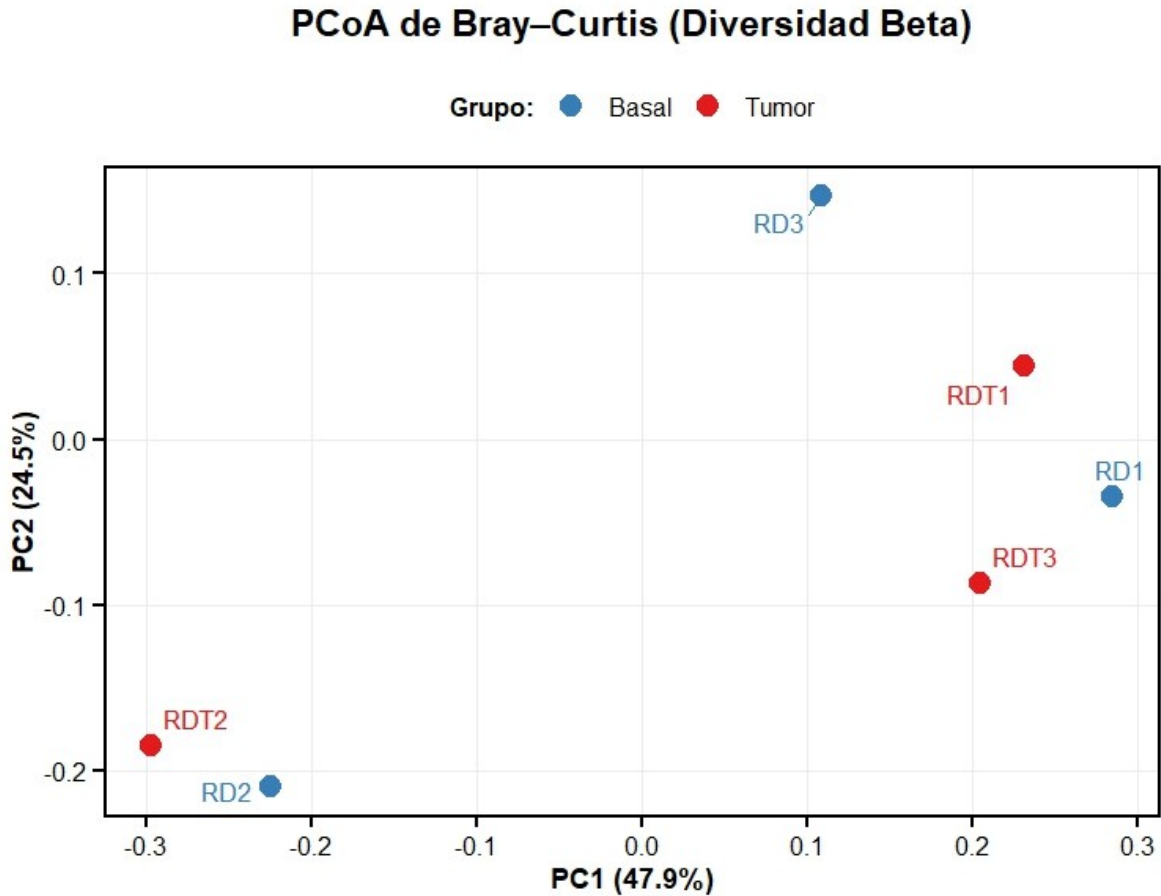


Figura 5. Diversidad β bacteriana: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia de Bray–Curtis. Cada punto representa una muestra individual perteneciente a los grupos Basal (azul) y Tumor (rojo). El eje PC1 explicó el 47.9 % de la variabilidad total y el eje PC2 el 24.5 %.

La distancia Bray–Curtis intraindividual mostró variabilidad moderada en el grado de remodelación de la microbiota intestinal asociada a la presencia tumoral (Figura 6). El individuo 2 presentó la menor disimilitud entre las condiciones Basal y Tumor (0.261), indicando una composición microbiana relativamente conservada entre ambas condiciones. En contraste, el individuo 3 mostró la mayor distancia Bray–Curtis (0.435), sugiriendo una alteración más pronunciada en la estructura de la comunidad bacteriana intestinal tras la presencia del tumor. El individuo 1 presentó un valor intermedio de disimilitud (0.319).

En conjunto, los valores observados sugieren modificaciones moderadas en la composición global de la microbiota intestinal inducidas por la condición tumoral, además de una variabilidad interindividual en la magnitud de dichos cambios. Estos resultados complementan el análisis de diversidad beta mediante PCoA, apoyando la presencia de

alteraciones composicionales detectables en la microbiota intestinal asociadas al estado tumoral.

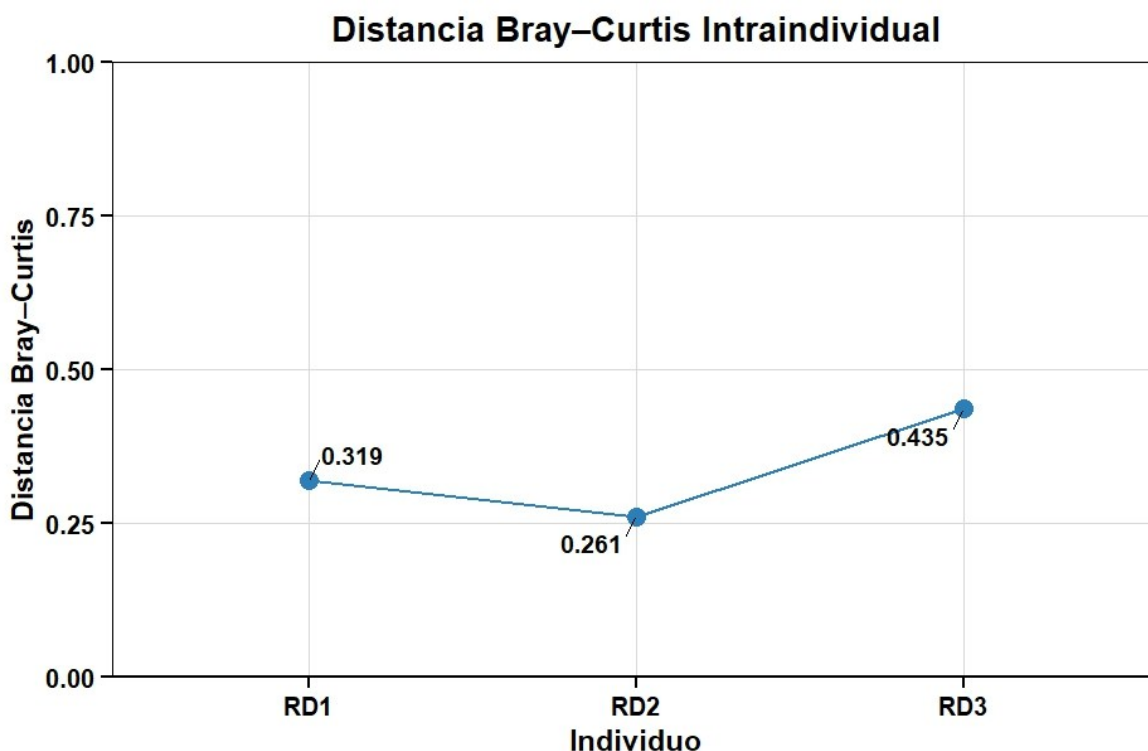


Figura 6. Distancia Bray-Curtis individual entre condiciones Basal y Tumor. La gráfica muestra la similitud composicional de la microbiota intestinal entre muestras Basal y Tumor correspondientes al mismo individuo, calculada mediante la distancia Bray-Curtis. Cada punto representa un individuo experimental y los valores cercanos a 0 indican una mayor similitud microbiológica, mientras que valores más altos indican una mayor divergencia en la composición bacteriana entre ambas condiciones.

7.3. Perfilado Taxonómico

En la siguiente gráfica (Figura 7) se compara la abundancia relativa de los Filos bacterianos presentes por grupo. No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos. Se observa una leve tendencia al aumento de *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, y una disminución en *Firmicutes* ante la presencia de tumor.

Abundancia relativa de Filos por grupo

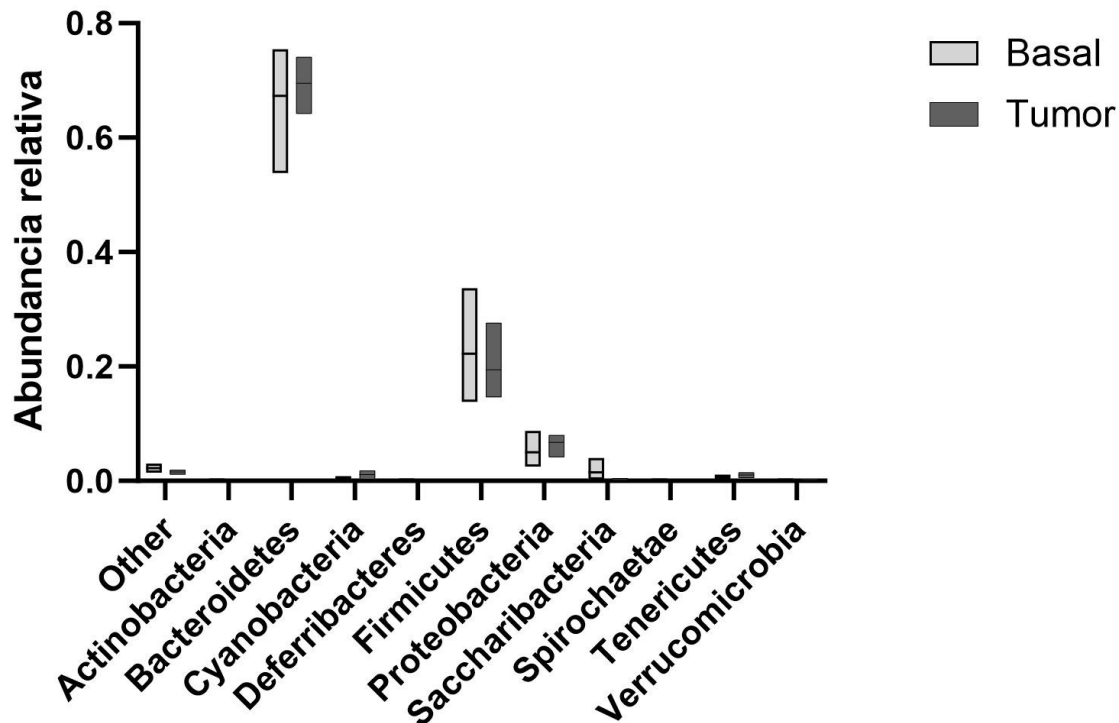


Figura 7. Boxplot de abundancia relativa de Filos por grupo de estudio. Mostrando línea en la media. Las diferencias entre los grupos se evaluaron utilizando la prueba de Wilcoxon signed-rank. Se consideran significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*). Other ($p = 0.7500$), Actinobacteria ($p = 0.2500$), Bacteroidetes ($p > 0.9999$), Cyanobacteria ($p = 0.5000$), Deferribacteres ($p = 0.5000$), Firmicutes ($p > 0.9999$), Proteobacteria ($p = 0.5000$), Saccharibacteria ($p = 0.7500$), Spirochaetae ($p = 0.5000$), Tenericutes ($p = 0.7500$), Verrucomicrobia ($p > 0.9999$).

El Heatmap de la Figura 8 proporciona una visualización de la abundancia promedio de las Familias presentes en los grupos de interés. Se organizan jerárquicamente mediante un dendrograma donde las familias que tienen valores similares en su abundancia se encuentran situadas una a lado de la otra. Las familias con valores de abundancia más altos en ambas muestras son *Prevotellaceae* y el orden *Bacteroidales*, donde esta última baja su abundancia en presencia de tumor, mientras que con la primera aumenta. Las otras familias que también destacan son *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* y *Lachnospiraceae*, la primera y la última muestran un ligero decremento en su abundancia en el grupo tumor, mientras que la segunda muestra un ligero incremento en tumor. Otros patrones que se pueden observar pero que

muestran niveles más bajos de cambio en la abundancia son todos los taxones que van desde *Lactobacillaceae* hasta *Helicobacteraceae*.

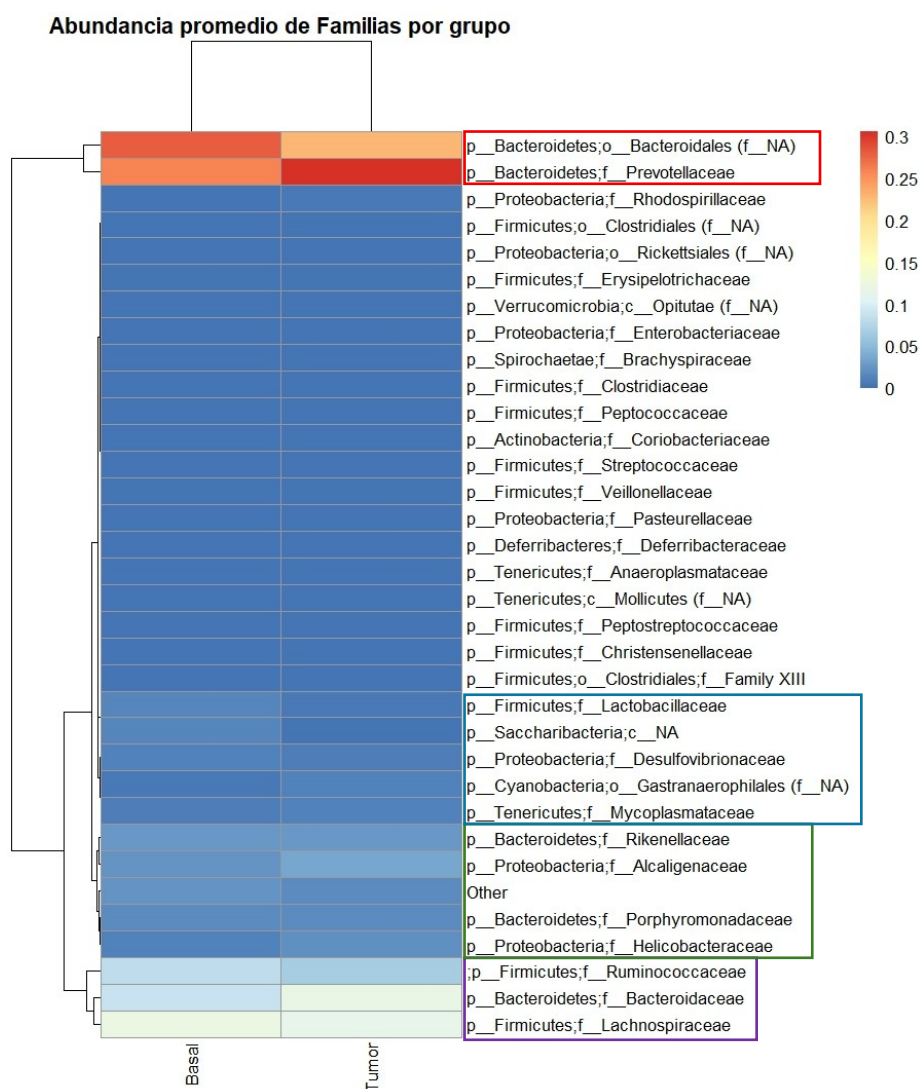


Figura 8. Heatmap clusterizado de la abundancia promedio de Familias por grupo de estudio. El eje horizontal representa las condiciones experimentales (Basal y Tumor), coronado por un dendrograma superior que exhibe el agrupamiento jerárquico de similitud global entre ambos grupos. El eje vertical describe las familias identificadas junto a su respectivo filo ($p_$ y $f_$); en los casos donde el taxón no logró ser clasificado a nivel de familia, se reporta el nivel taxonómico inmediato superior disponible (f_NA). El dendrograma del eje izquierdo denota el agrupamiento jerárquico de las familias basado en sus perfiles de co-abundancia. La escala cromática indica la abundancia promedio estandarizada, variando desde niveles mínimos en azul (0.0) hasta máximos en rojo (sim 0.3). Los recuadros de color delimitan los principales bloques taxonómicos que exhiben patrones correlacionados de cambio o inversión de abundancia entre el estado homeostático (Basal) y el modelo tumoral.

El análisis comparativo de la abundancia relativa a nivel de familia reveló variaciones numéricas en la composición de la microbiota intestinal asociadas al desarrollo del modelo tumoral subcutáneo (Figura 9). En los animales portadores de tumor, se observó una tendencia a la disminución en la abundancia del orden *Bacteroidales* y de la familia *Lactobacillaceae*, acompañada de un moderado descenso en *Lachnospiraceae*. En contraste, las familias *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* e *Helicobacteraceae*, así como el orden *Gastranaerophilales*, exhibieron un incremento en sus proporciones relativas dentro del grupo Tumor. Aunque estas fluctuaciones composicionales no alcanzaron el umbral de significancia estadística ($p > 0.05$) debido a la dispersión biológica intrínseca de las muestras, los perfiles identificados muestran tendencias biológicas consistentes, caracterizadas por la contracción de taxones comensales de referencia como los lactobacilos y la proliferación de géneros oportunistas o anaerobios estrictos como *Bacteroides*.

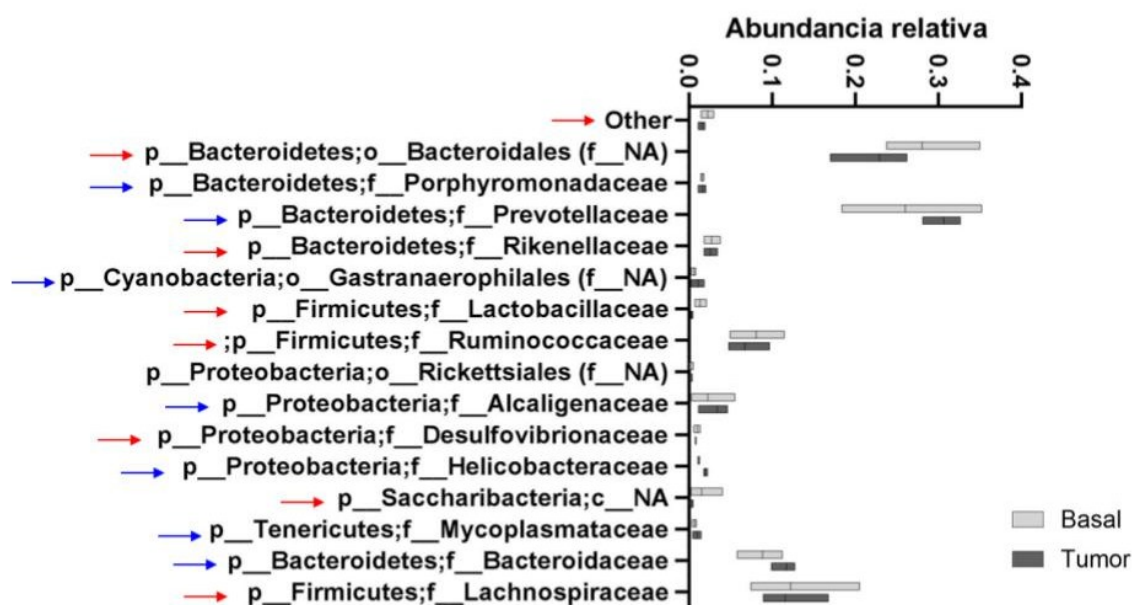


Figura 9. Abundancia relativa de familias bacterianas seleccionadas entre grupos experimentales. Los diagramas de caja (boxplots) representan la distribución de los datos, donde la línea interna indica la mediana, los límites de la caja definen los cuartiles primero y tercero, y los bigotes denotan los valores máximos y mínimos. Las diferencias estadísticas entre el grupo Basal y el grupo Tumor se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Wilcoxon rank-sum test), reportando los siguientes valores de significancia: Other ($p = 0.7500$); o_Bacteroidales (f_NA) ($p = 0.5000$); f_Porphyromonadaceae ($p > 0.9999$); f_Prevotellaceae ($p = 0.7500$); f_Rikenellaceae ($p = 0.7500$); o_Gastranaerophilales (f_NA) ($p = 0.5000$); f_Lactobacillaceae ($p = 0.2500$); f_Ruminococcaceae ($p > 0.9999$); o_Rickettsiales (f_NA) ($p > 0.9999$);

f__Alcaligenaceae ($p = 0.7500$); f__Desulfovibrionaceae ($p = 0.7500$); f__Helicobacteraceae ($p = 0.2500$); p__Saccharibacteria (c__NA) ($p = 0.7500$); f__Mycoplasmataceae ($p > 0.9999$); f__Bacteroidaceae ($p > 0.9999$); y f__Lachnospiraceae ($p > 0.9999$). Las flechas indican de manera descriptiva la tendencia de enriquecimiento biológico de cada taxón, denotando en color azul un incremento en el grupo Tumor y en color rojo un incremento en el grupo Basal.

Para identificar los cambios más específicos en la microbiota intestinal asociados a la presencia del tumor, se generaron mapas de calor utilizando la transformación de Hellinger con las especies que conformaron el 90% de la abundancia total (Figura 10). Esta visualización permitió observar los patrones de abundancia relativa y la agrupación de los taxones más representativos en los grupos Basal y Tumor.

En ambos mapas, *Prevotellaceae* sp14206 fue la especie más abundante, manteniendo una elevada representación en las dos condiciones experimentales. Sin embargo, se observó un ligero incremento de su abundancia en el grupo Tumor, lo que indica que esta especie permaneció como uno de los taxones dominantes independientemente de la condición experimental.

Por otra parte, *Bacteroides sartorii* destacó por presentar cambios evidentes en su distribución entre ambos grupos, posicionándose en el segundo puesto de mayor abundancia en condición Tumor. Su posición dentro de los agrupamientos generados por el análisis sugiere una asociación importante con la presencia tumoral, convirtiéndose en una de las especies que más contribuyeron a las diferencias observadas entre las comunidades microbianas.

Asimismo, especies como *Bacteroides vulgatus* mostraron una mayor abundancia relativa en el grupo Tumor, mientras que *Lachnospiraceae* sp32778, *Helicobacter apodemus*, *Saccharimonas* sp65946 y *Lachnospiraceae* sp32685 presentaron una disminución evidente en comparación con el grupo Basal.

En conjunto, los resultados sugieren que la presencia del tumor no provocó una alteración generalizada de la microbiota intestinal, sino cambios específicos en determinados taxones bacterianos. Estas modificaciones se observaron principalmente en especies pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Lachnospiraceae*, lo que indica una reestructuración selectiva de la comunidad microbiana asociada al desarrollo tumoral.

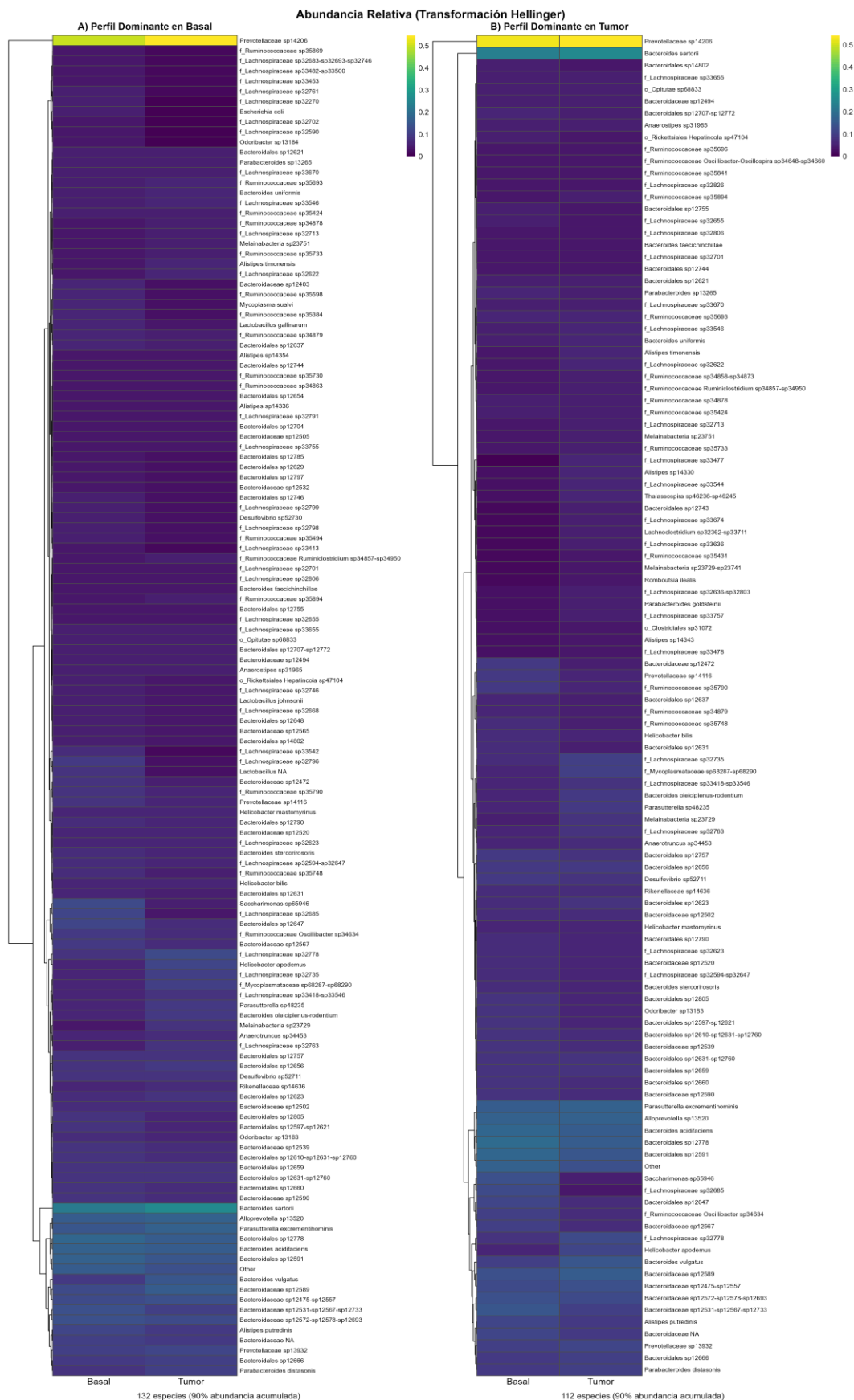


Figura 10 (continua). Heatmaps de abundancia taxonómica basados en la transformación de Hellinger.

El panel izquierdo muestra el perfil de abundancia relativa estandarizada y el agrupamiento jerárquico de los taxones bacterianos en condiciones basales. El panel derecho expone las modificaciones en la composición de la microbiota asociadas a tumor. La escala de color denota la abundancia relativa transformada mediante la raíz cuadrada de las proporciones (distancia de Hellinger). Los dendogramas (ubicados en el eje izquierdo) representan el análisis de agrupamiento jerárquico empleando el método de Ward para réplicas biológicas. Las muestras biológicas individuales se disponen en el eje inferior agrupadas por su respectiva condición experimental, con sus identificadores taxonómicos correspondientes señalados en el eje derecho.

7.4. Modelado de Cambio Biológico (log2 Fold Change) y Exclusividad Taxonómica

La Figura 11 muestra las especies exclusivas identificadas en cada grupo y su abundancia relativa, ordenadas de mayor a menor abundancia. Se observó una diferencia en el número de especies exclusivas entre grupos, ya que el grupo Basal presentó 90 especies exclusivas, mientras que el grupo Tumor presentó 38.

La especie exclusiva más abundante en el grupo Basal fue *Escherichia coli*, mientras que en el grupo Tumor la especie exclusiva más abundante correspondió a *Lachnospiraceae* sp33477.

A pesar de que las especies exclusivas difirieron entre grupos, se identificaron representantes de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* en ambos conjuntos de especies exclusivas, lo que sugiere que miembros de estas familias podrían presentar comportamientos diferenciales dependiendo de la condición fisiopatológica.

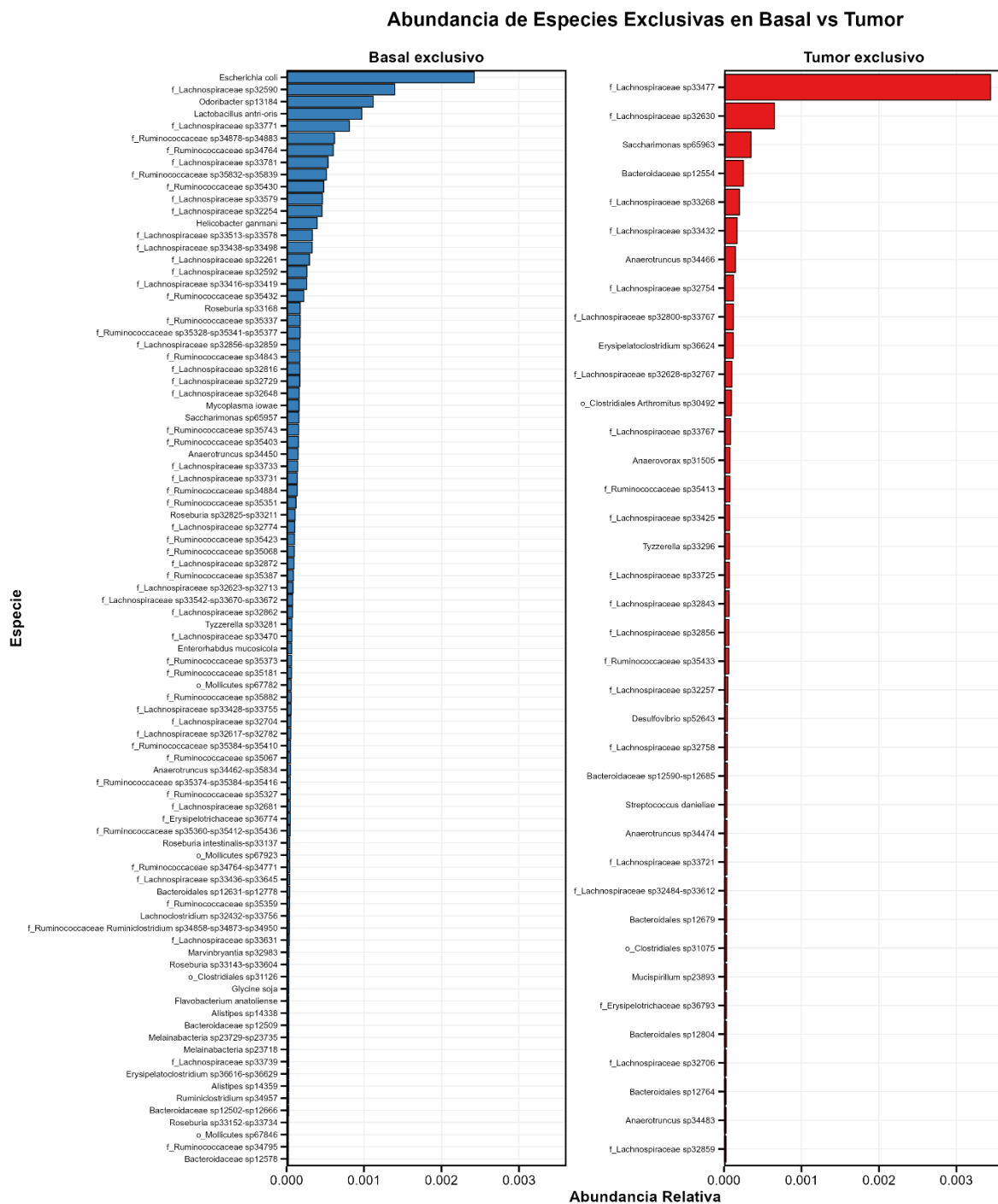


Figura 11. Abundancias de especies bacterianas exclusivas en los grupos Basal y Tumor. Perfiles de abundancia relativa calculados para los taxones bacterianos detectados de manera exclusiva en cada condición experimental. El panel izquierdo (azul) representa las especies identificadas únicamente en las muestras del grupo Basal. El panel derecho (rojo) detalla las especies identificadas únicamente en las muestras del grupo Tumor. El eje horizontal representa la escala de abundancia relativa promedio para cada taxón dentro de su respectiva condición exclusiva. Cada barra corresponde a una especie bacteriana individual.

Para evaluar la magnitud y dirección de las alteraciones de la microbiota intestinal asociadas al modelo tumoral, se determinó inicialmente la distribución global de los cambios en la abundancia relativa mediante el cálculo del $\log_2 \text{Fold Change}$ ($\log_2 \text{FC}$). Como se observa en la Figura 12, la mayoría de las especies bacterianas se concentraron en un pico prominente alrededor de cero, lo que refleja que una gran proporción del perfil taxonómico se mantuvo estable entre las condiciones Basal y Tumor. Sin embargo, la distribución presentó colas anchas en ambos extremos, evidenciando un subconjunto de taxones con marcadas fluctuaciones de abundancia. Destaca una mayor dispersión hacia valores negativos, lo que sugiere una tendencia general hacia la pérdida o reducción de diversas especies en la condición tumoral frente a un grupo más restringido que incrementó su presencia.

Al analizar detalladamente las 30 especies con la mayor magnitud de cambio diferencial (Figura 13), se identificó un patrón de enriquecimiento claramente estructurado por condición experimental. Entre los taxones con mayor incremento relativo en el grupo Tumor destacan miembros de la familia *Lachnospiraceae* y *Saccharimonas* sp65963, caracterizados por valores elevados de $\log_2 \text{FC}$ positivo. En contraposición, especies como *Escherichia coli*, *Odoribacter* sp13184 y *Lactobacillus antri-oris* exhibieron una marcada reducción en el grupo Tumor, posicionándose como los taxones con mayor enriquecimiento en la condición Basal.

La inspección individual de las abundancias relativas (representadas en escala $\log_{10}$) confirmó la consistencia de estos patrones entre las réplicas biológicas de cada grupo (Figura 14). Diversos taxones mostraron una presencia casi exclusiva en una sola condición experimental, con abundancias prácticamente indetectables en el grupo opuesto, lo que explica los valores extremos de $\log_2 \text{FC}$ obtenidos. Aunque la prueba no paramétrica de Wilcoxon con corrección por FDR (Benjamini–Hochberg) no detectó especies con significancia estadística tras el ajuste por comparaciones múltiples ($p_{\text{adj}} > 0.05$), la evaluación descriptiva de las abundancias individuales evidencia diferencias biológicas relevantes en el perfil taxonómico asociado a la condición tumoral.

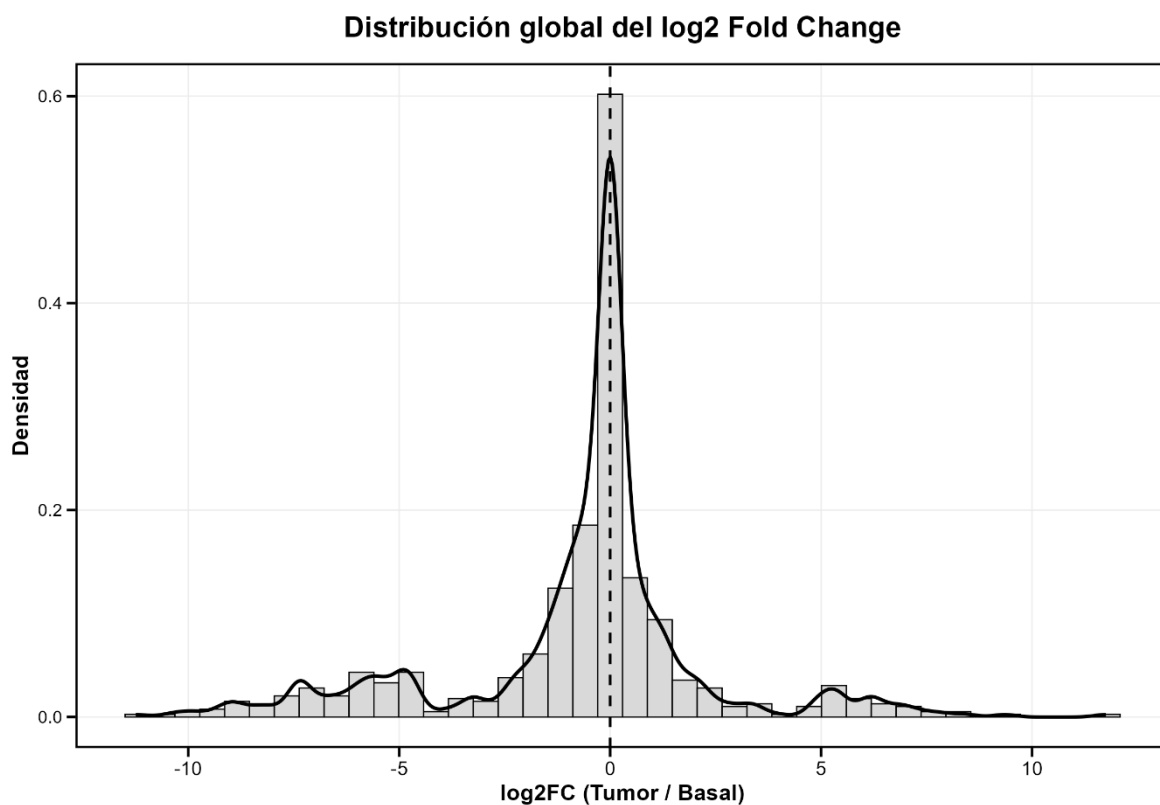


Figura 12. Distribución global del cambio diferencial en la microbiota intestinal. Distribución global de los valores de *log2 Fold Change* ($\log_2 FC$) calculados entre los grupos Basal y Tumor para todas las especies bacterianas detectadas. La curva de densidad y el histograma ilustran la simetría del cambio. La línea vertical punteada indica la ausencia de cambio diferencial ($\log_2 FC = 0$).

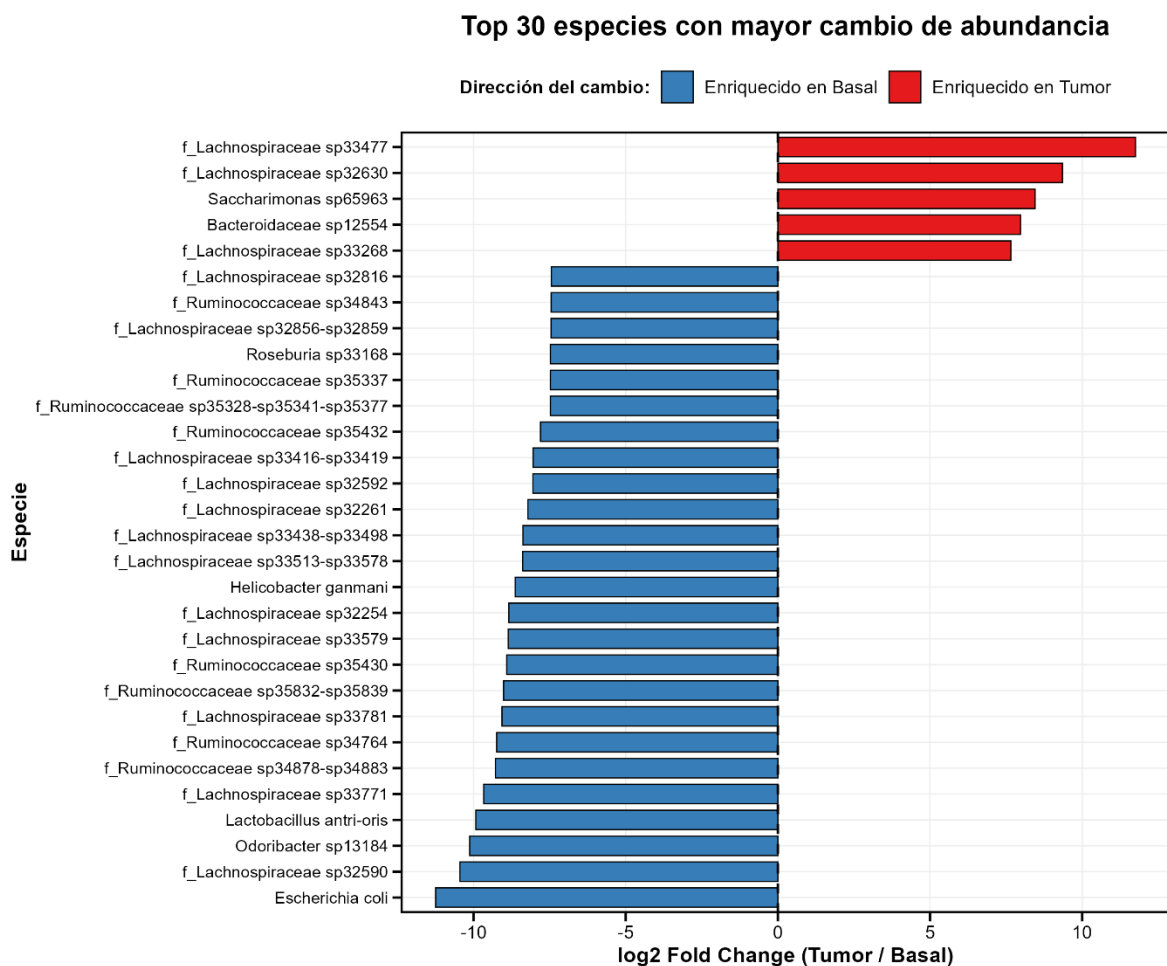


Figura 13. Top 30 especies con mayor magnitud de cambio diferencial. Especies bacterianas que presentaron las mayores magnitudes de cambio de abundancia relativa entre los grupos experimentales. Los valores positivos (rojo) indican enriquecimiento en el grupo Tumor, mientras que los valores negativos (azul) indican enriquecimiento en el grupo Basal.

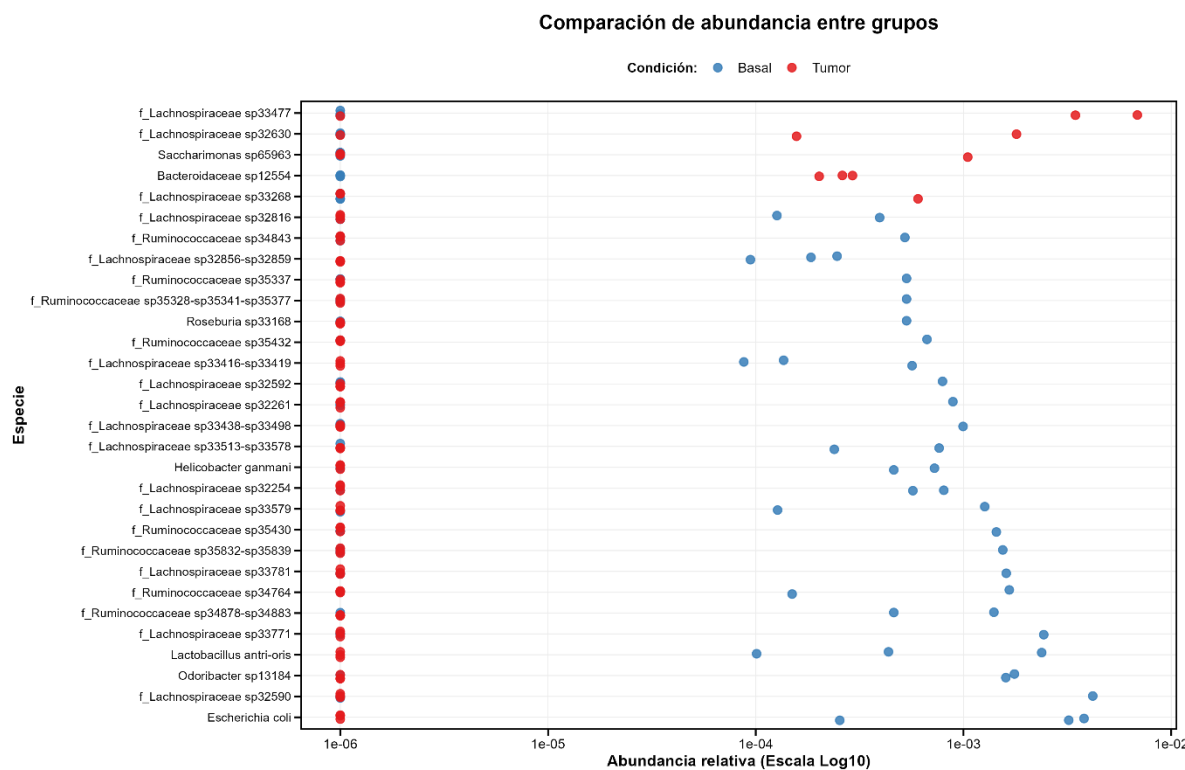


Figura 14. Comparación de la abundancia relativa individual por grupo experimental. Abundancia relativa individual en escala $\log_{10}$ para las 30 especies con mayor magnitud de cambio. Cada punto representa una muestra individual correspondiente a los grupos Basal (azul) y Tumor (rojo). La comparación estadística entre grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon con corrección por tasa de descubrimiento falso (FDR) mediante el método de Benjamini-Hochberg.

7.5. Obtención de Perfiles Metabólicos (PICRUST2)

El análisis funcional predicho mediante PICRUST2 reveló modificaciones específicas en metabolitos neuroactivos asociados a la presencia del tumor (Figura 15, 16 y 17). La distribución global de los valores de $\log_2\text{FC}$ mostró una concentración principal alrededor de valores cercanos a cero, con un ligero desplazamiento hacia valores positivos, indicando que la mayoría de los metabolitos presentó cambios moderados entre grupos (Figura 15). No obstante, la presencia de colas en ambos extremos de la distribución evidenció la existencia de metabolitos con alteraciones más pronunciadas, particularmente algunos compuestos enriquecidos en el grupo Basal.

El análisis diferencial mostró que putrescina y espermidina fueron los metabolitos con mayor incremento relativo en el grupo Tumor, seguidos por histamina, formamidasa, creatinina y

agmatina (Figura 16). Por el contrario, glutamato, triptófano, N-acetilputrescina, cadaverina y triptamina presentaron mayores abundancias relativas en el grupo Basal, siendo triptamina y cadaverina los metabolitos con las disminuciones más marcadas en presencia del tumor.

La visualización de las abundancias individuales confirmó la consistencia de estos patrones entre réplicas biológicas (Figura 17). Los metabolitos más abundantes en ambos grupos fueron glutamato, triptófano y agmatina, mientras que creatinina presentó las menores abundancias relativas. En conjunto, estos resultados sugieren que la condición tumoral se asoció con modificaciones selectivas del potencial funcional neuroactivo de la microbiota intestinal, particularmente en rutas relacionadas con poliaminas biogénicas y metabolitos derivados del metabolismo de aminoácidos.

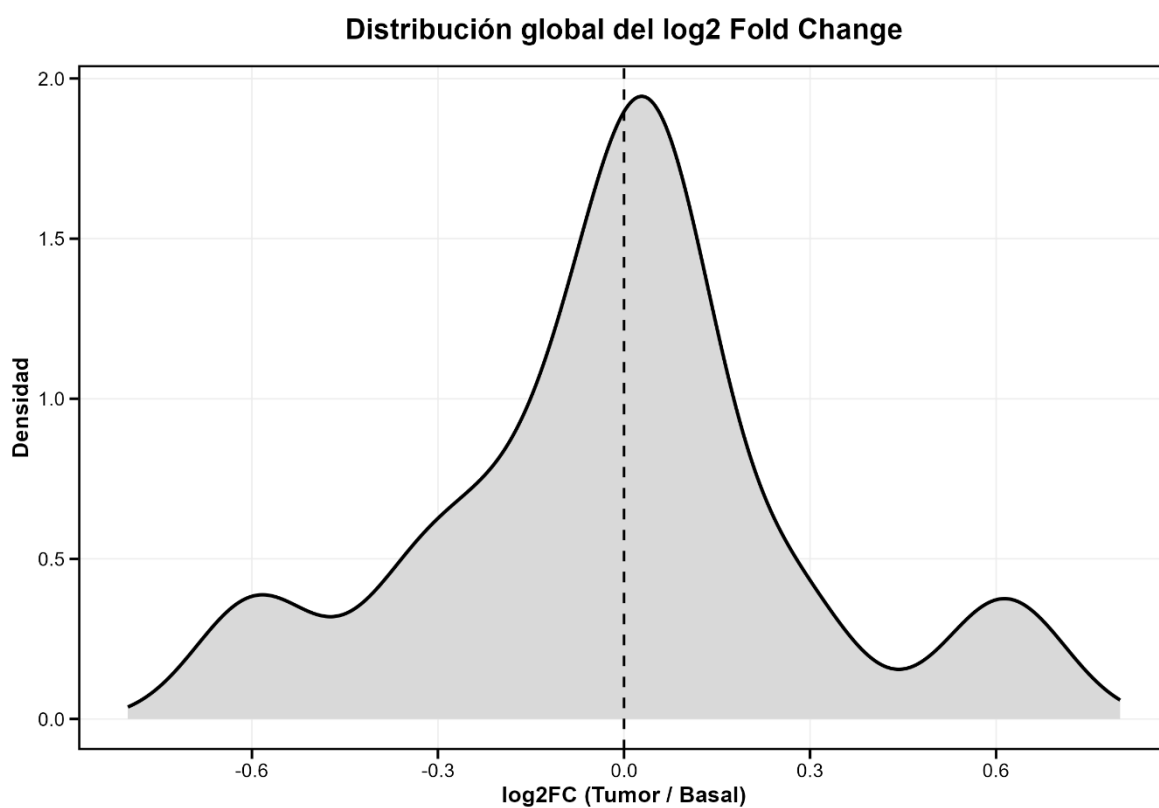


Figura 15. Distribución global del log2 Fold Change en el potencial funcional neuroactivo. Perfil del potencial funcional neuroactivo de la microbiota intestinal asociado al modelo tumoral. Distribución global de los valores *log2 Fold Change* ($\log_2 FC$) calculados entre los grupos Basal y Tumor para las especies bacterianas/funciones con potencial neuroactivo detectadas. La línea punteada indica ausencia de cambio diferencial ($\log_2 FC = 0$). La predicción metabólica funcional fue ejecutada mediante el algoritmo PICRUST2.

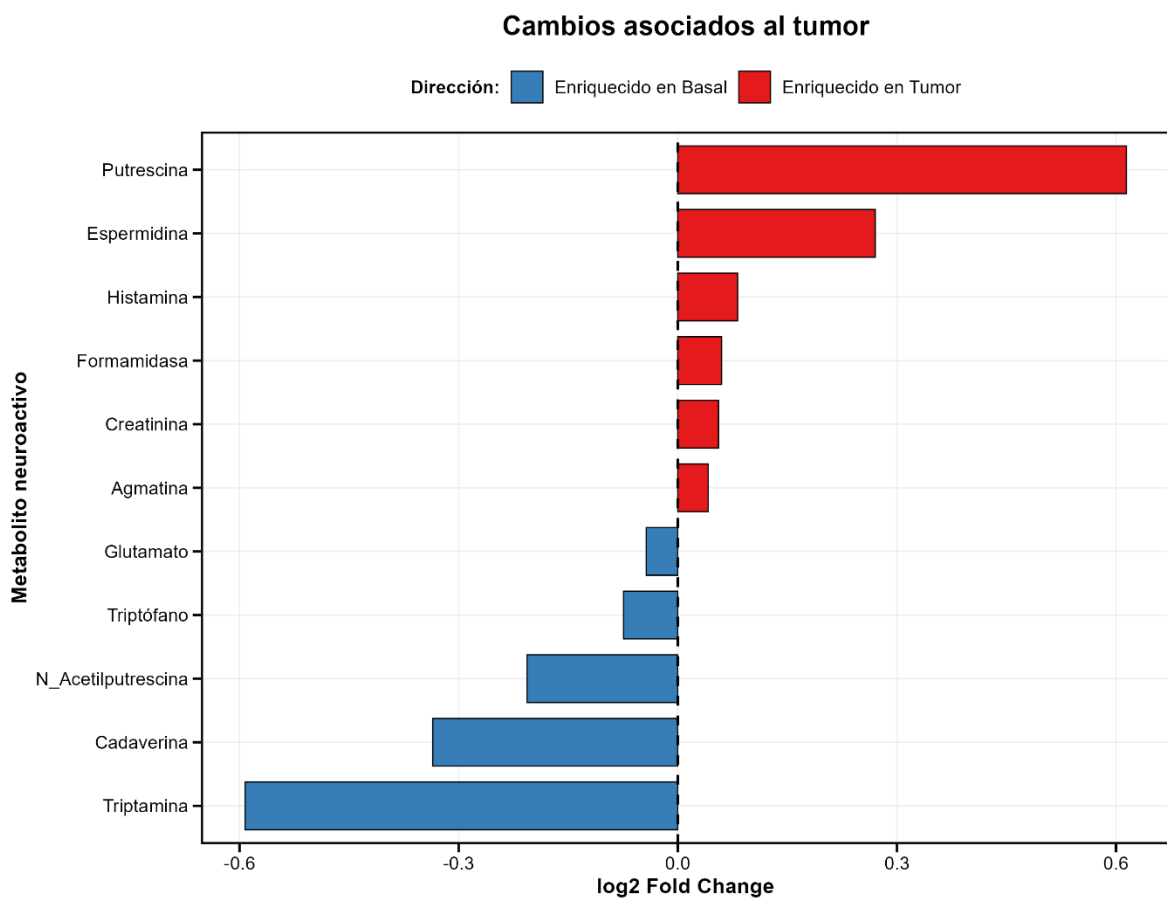


Figura 16. Magnitud de cambio diferencial en metabolitos neuroactivos. Especies bacterianas/funciones con mayor magnitud de cambio diferencial de abundancia funcional asociada a metabolitos neuroactivos entre grupos. Los valores positivos indican enriquecimiento en Tumor (rojo) y los valores negativos enriquecimiento en Basal (azul). La predicción metabólica funcional fue ejecutada mediante el algoritmo PICRUSt2.

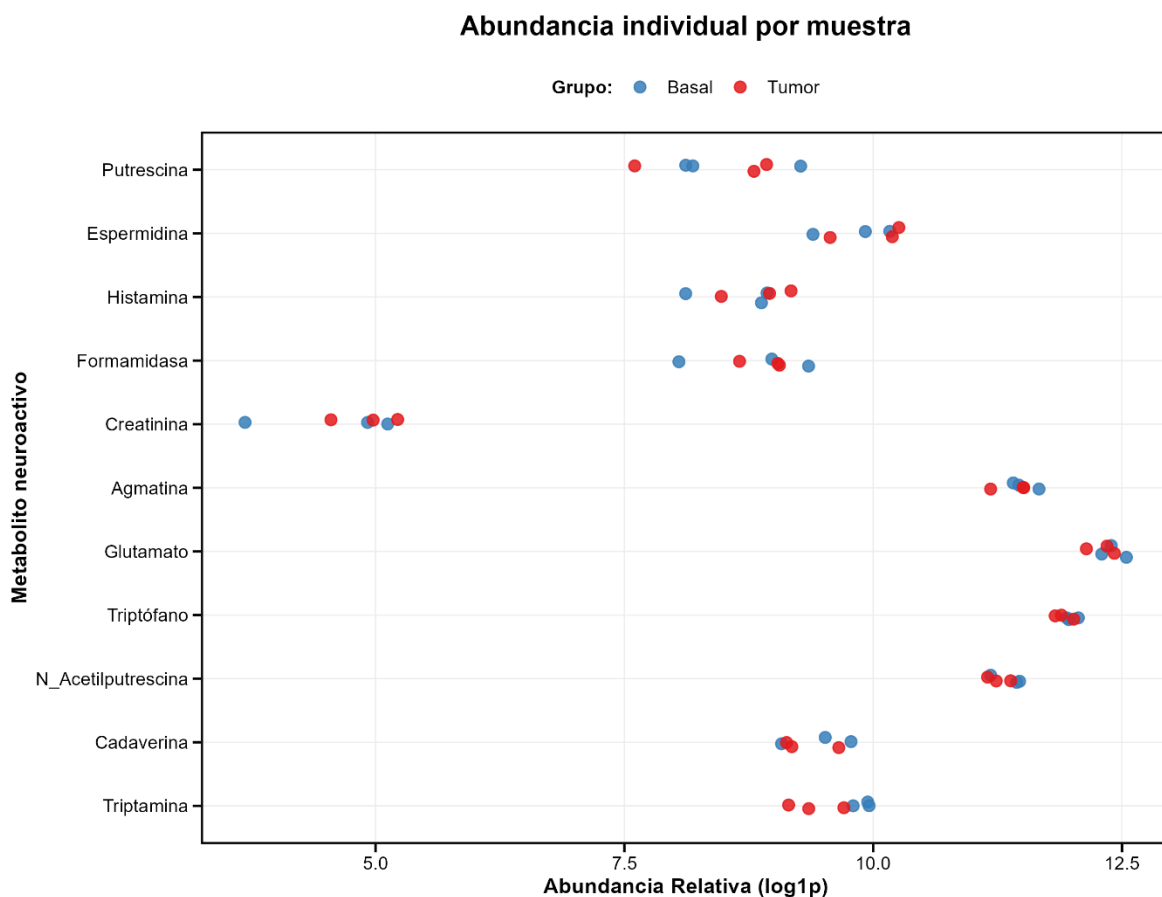


Figura 17. Abundancia relativa individual de metabolitos neuroactivos por muestra. Abundancia relativa individual de las especies/funciones seleccionadas en muestras Basales y Tumoraes representadas en escala $\log_{1p}$. Cada punto corresponde a una muestra individual. Los colores indican el grupo experimental: Basal (azul) y Tumor (rojo). La predicción metabólica funcional fue ejecutada mediante el algoritmo PICRUST2.

7.6. Integración Trans-Ómica y Fenotípica mediante Análisis de Redes

El análisis integrado de los cambios taxonómicos y funcionales mediante valores de $\log_2$ Fold Change (Tumor/Basal) mostró una reorganización de la microbiota intestinal asociada a la presencia del tumor (Figura 18). Los mayores cambios se observaron principalmente a nivel taxonómico, donde varias bacterias presentaron modificaciones marcadas en su abundancia relativa entre los grupos experimental y control.

Dentro de los microorganismos enriquecidos en el grupo Tumor destacaron principalmente secuencias pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae* y otros taxones bacterianos no clasificados, los cuales mostraron los mayores incrementos relativos. En contraste, bacterias como *Saccharimonas* sp., *Lactobacillus* sp. y *Escherichia coli* presentaron una disminución

relativa en el grupo Tumor, sugiriendo una modificación en la estructura de la comunidad microbiana asociada a la condición tumoral.

En el componente funcional, las diferencias fueron menos pronunciadas que las observadas a nivel taxonómico; sin embargo, se identificaron cambios específicos en enzimas bacterianas predichas mediante PICRUST2. Entre las funciones enriquecidas en el grupo Tumor destacó principalmente la histidina descarboxilasa, enzima involucrada en la conversión de histidina a histamina, así como la espermidina sintasa, relacionada con la biosíntesis de espermidina.

Además, se observaron incrementos menores en enzimas como la creatininasa y la formamidasa, indicando cambios en el potencial funcional de rutas relacionadas con el metabolismo de compuestos nitrogenados y aminas biógenas.

Por otro lado, varias funciones presentaron una menor representación relativa en el grupo Tumor, incluyendo la triptófano sintasa, la putrescina descarboxilasa, la agmatina ureohidrolasa/descarboxilasa asociada, la lisina descarboxilasa, la glutamato deshidrogenasa, la putrescina acetiltransferasa y la triptófano descarboxilasa/triptaminasa.

En conjunto, estos resultados indican que la presencia del tumor se asocia con una modificación de la composición microbiana acompañada de cambios en el potencial funcional de enzimas involucradas en rutas metabólicas relacionadas con aminas biógenas, poliaminas y metabolismo de aminoácidos. Particularmente, el aumento relativo de enzimas como histidina descarboxilasa y espermidina sintasa, junto con la disminución de enzimas relacionadas con el metabolismo del triptófano y glutamato, sugiere una posible reconfiguración del potencial metabólico microbiano con relevancia en la comunicación microbiota–intestino–cerebro.

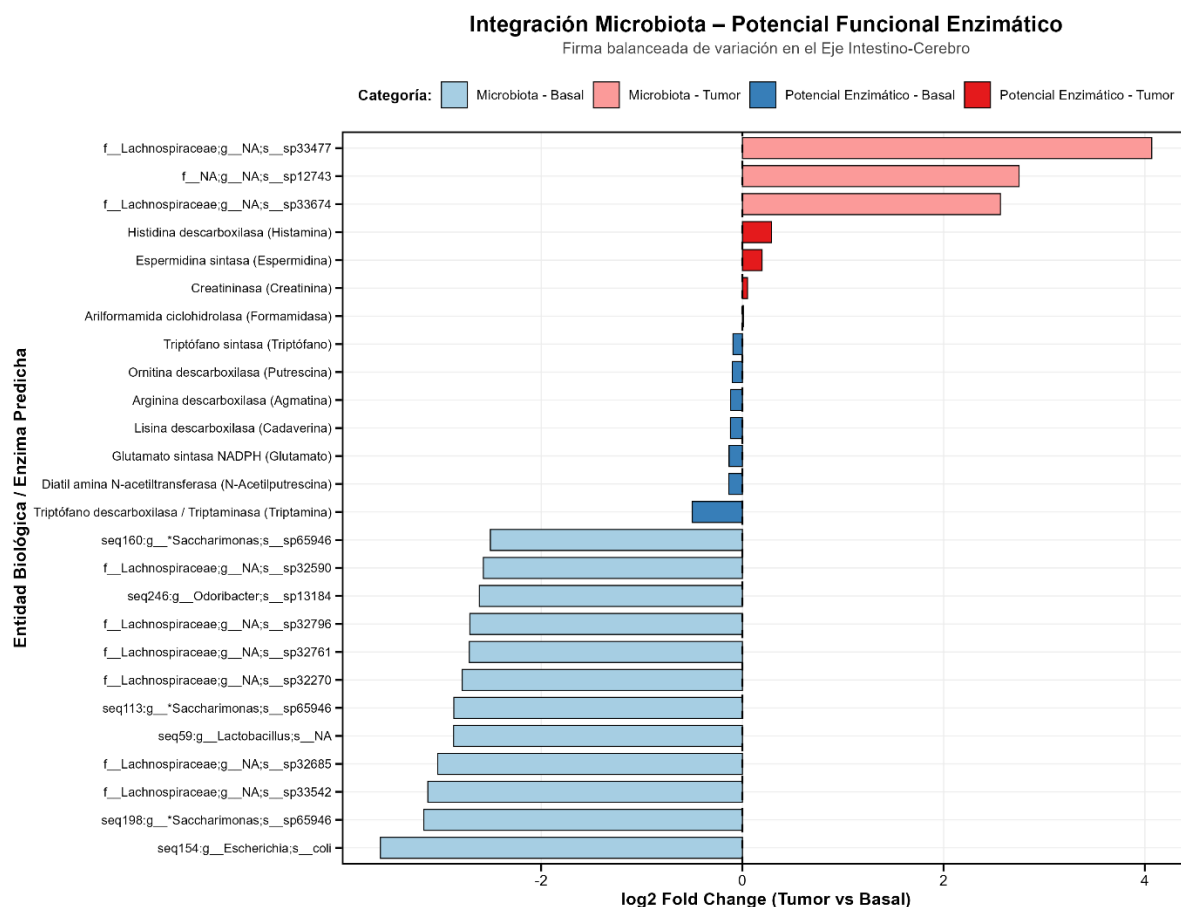


Figura 18. Integración de la estructura de la microbiota intestinal y el potencial funcional enzimático asociado al modelo tumoral. Análisis integrado de los cambios observados entre las condiciones Basal y Tumor mediante valores de $\log_2$ Fold Change (Tumor/Basal). Los valores positivos indican enriquecimiento relativo en el grupo Tumor (barras rojas), mientras que los valores negativos indican una mayor representación en el grupo Basal (barras azules). Las barras en tonalidad clara (rojo y azul claro) representan los cambios en la abundancia relativa de las entidades microbiológicas, mientras que las barras en tonalidad oscura (rojo y azul oscuro) corresponden al potencial funcional enzimático predicho mediante PICRUST2 (expresadas como números EC y asociadas con rutas metabólicas de relevancia neuroactiva). La magnitud de cada barra refleja la intensidad del cambio entre las condiciones experimentales.

Con el objetivo de explorar la relación entre la composición de la microbiota intestinal y el potencial funcional neuroactivo predicho mediante PICRUST2, se construyó una red de co-ocurrencia trans-ómica integrando taxones bacterianos, funciones metabólicas y metabolitos neuroactivos (Figura 19 y Figura 20). La ampliación de la red permitió visualizar con mayor detalle la organización de las interacciones, mostrando una estructura modular compuesta

por grupos de microorganismos asociados con funciones metabólicas y metabolitos específicos.

La red mostró que los metabolitos neuroactivos no se distribuyeron de manera aislada, sino que se integraron en diferentes módulos de interacción con múltiples taxones bacterianos (Figura 19). Dentro de estos módulos destacaron metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y poliaminas, como putrescina, espermidina, agmatina, cadaverina y N-acetilputrescina, los cuales presentaron una elevada conectividad con diversos microorganismos, principalmente miembros de la familia *Lachnospiraceae*, además de otros taxones intestinales (Figura 19). La presencia de múltiples asociaciones positivas y negativas refleja patrones diferenciales de covariación entre microorganismos y metabolitos, indicando que las relaciones dentro de la red presentan comportamientos heterogéneos.

Los metabolitos derivados del triptófano, incluyendo triptamina y triptófano, formaron módulos específicos asociados con determinados grupos bacterianos (Figura 19) y funciones metabólicas relacionadas con su transformación (Figura 20). Por otra parte, la histamina presentó una organización más independiente respecto al núcleo principal de la red, formando un módulo particular asociado con la ruta de histidina descarboxilasa (Figura 19 y Figura 20).

La integración de la información funcional permitió identificar asociaciones entre enzimas bacterianas predichas y metabolitos neuroactivos (Figura 20). Entre las funciones con mayor relevancia dentro de la red destacaron la histidina descarboxilasa, relacionada con histamina; la triptofanasa, relacionada con triptamina; la espermidina sintasa y la putrescina acetiltransferasa, asociadas con el metabolismo de poliaminas; además de funciones involucradas en el metabolismo de triptófano y glutamato, como triptófano sintasa y glutamato deshidrogenasa (Figura 20).

En conjunto, la red evidencia una organización compleja de asociaciones entre microorganismos, funciones metabólicas predichas y metabolitos neuroactivos (Figura 19 y Figura 20). La presencia recurrente de miembros de *Lachnospiraceae* (Figura 19) y la alta conectividad de las rutas relacionadas con poliaminas (Figura 19 y Figura 20) sugieren que estas funciones podrían representar componentes relevantes dentro de la reorganización funcional de la microbiota intestinal asociada al contexto tumoral. Estos resultados apoyan

la existencia de alteraciones coordinadas en el eje microbiota–intestino–cerebro, aunque las asociaciones observadas representan relaciones de covariación y no interacciones causales directas.

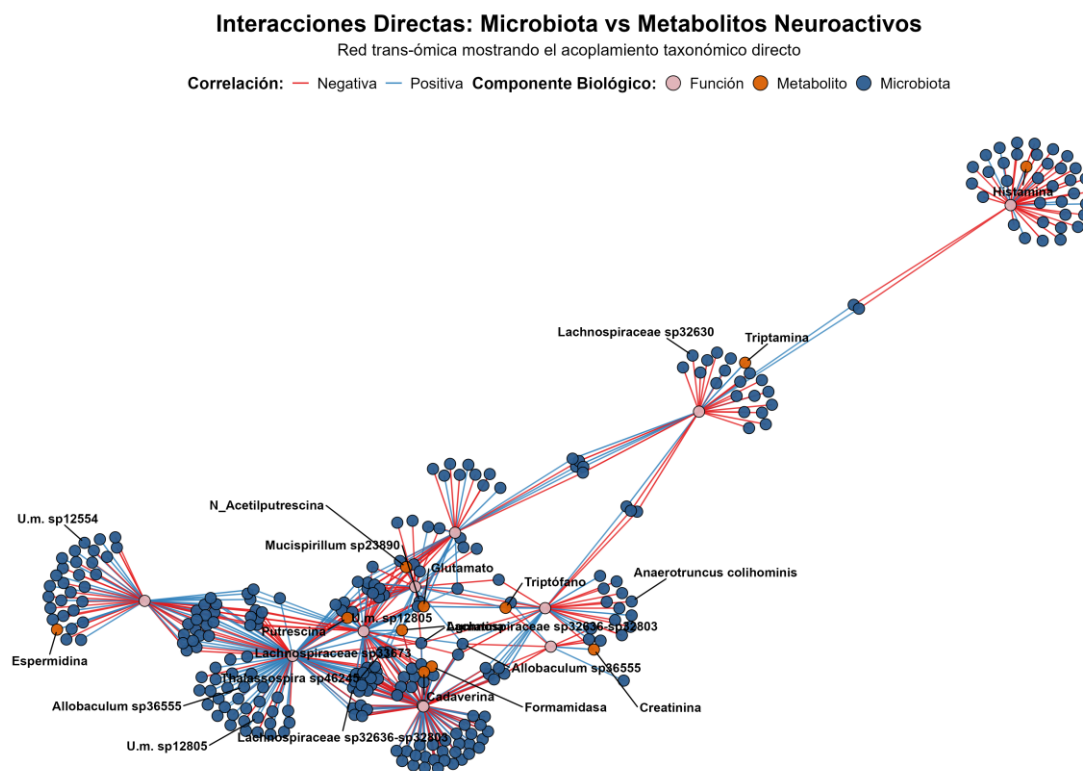


Figura 19. Interacciones Directas: Microbiota vs Metabolitos Neuroactivos. Redes de co-ocurrencia trans-ómica de las interacciones en el eje microbiota–intestino–cerebro. Análisis de redes basado en correlaciones estadísticas para integrar componentes taxonómicos, funcionales y metabólicos asociados al potencial neuroactivo de la microbiota intestinal. Red de interacción directa entre taxones bacterianos y metabolitos neuroactivos predichos mediante PICRUSt2. Los nodos se clasifican según su componente biológico en funciones enzimáticas (rosa), metabolitos (naranja) y taxones bacterianos (azul). Las aristas representan asociaciones de correlación entre entidades biológicas; las líneas azules indican correlaciones positivas y las líneas rojas correlaciones negativas. La organización de la red permite identificar posibles relaciones funcionales entre la composición microbiana intestinal y rutas metabólicas potencialmente involucradas en la comunicación del eje microbiota–intestino–cerebro.

Maquinaria Funcional: Enzimas Bacterianas vs Metabolitos Neuroactivos

Red de acoplamiento funcional basada en códigos EC traducidos

Correlación: — Negativa — Positiva Componente Biológico: ● Función ● Metabolito ● Microbiota

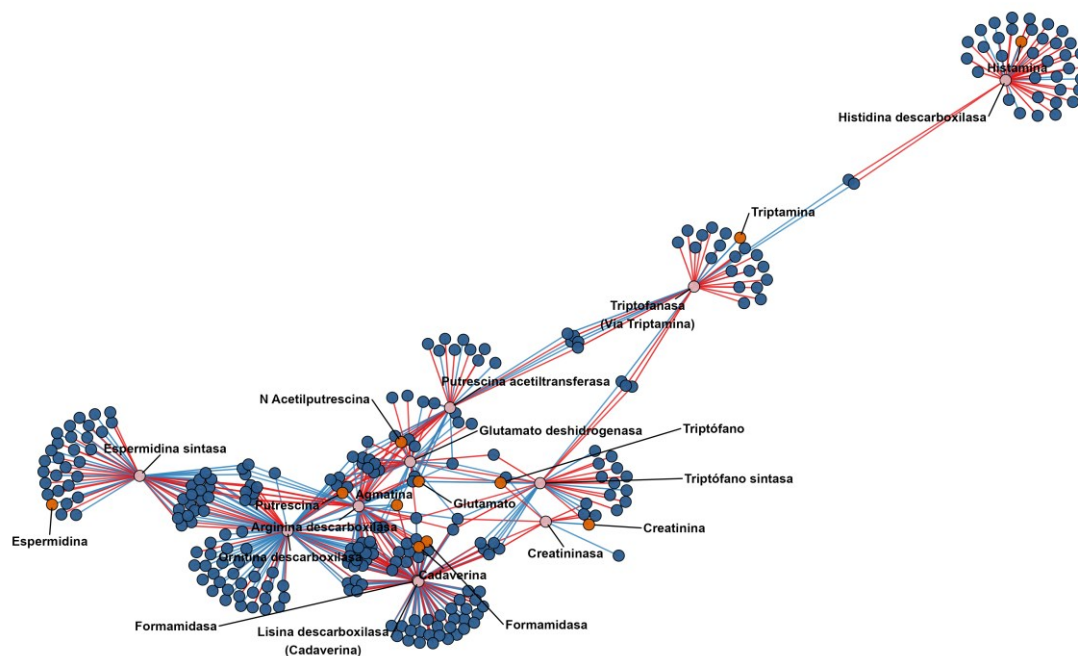


Figura 20. Maquinaria Funcional: Enzimas Bacterianas vs Metabolitos Neuroactivos. Redes de co-ocurrencia trans-ómica de las interacciones en el eje microbiota-intestino-cerebro. Análisis de redes basado en correlaciones estadísticas para integrar componentes taxonómicos, funcionales y metabólicos asociados al potencial neuroactivo de la microbiota intestinal. Red de interacción funcional que vincula enzimas bacterianas específicas con sus respectivos metabolitos neuroactivos. Los nodos se clasifican según su componente biológico en funciones enzimáticas (rosa), metabolitos (naranja) y taxones bacterianos (azul). Las aristas representan asociaciones de correlación entre entidades biológicas; las líneas azules indican correlaciones positivas y las líneas rojas correlaciones negativas. La organización de la red permite identificar posibles relaciones funcionales entre la composición microbiana intestinal y rutas metabólicas potencialmente involucradas en la comunicación del eje microbiota-intestino-cerebro.

Con el propósito de identificar posibles asociaciones entre la microbiota intestinal, el potencial neuroactivo predicho y el desempeño conductual, se construyó una red de co-ocurrencia basada en correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las variables biológicas y fenotípicas evaluadas (Figura 21).

La red reveló que las variables conductuales ocuparon posiciones centrales dentro de la estructura de interacción. En particular, la variable correspondiente a la prueba de

reconocimiento de objetos novedosos (Interaccion_NOR) se asoció con diversos componentes microbianos y metabólicos. Se observaron correlaciones negativas entre Interaccion_NOR y *Bacteroides sartorii*, así como con el metabolito neuroactivo triptamina. Asimismo, se detectó una asociación negativa con *Odoribacter* sp13184; sin embargo, esta interacción estuvo representada por una arista de menor grosor, lo que sugiere una menor intensidad relativa dentro de la red. En contraste, *Parabacteroides distasonis* mostró una asociación positiva con Interaccion_NOR, aunque igualmente representada por una conexión de menor peso visual en comparación con las asociaciones principales.

Por otra parte, la alternancia espontánea en el laberinto en Y (Alternancia_LabY) se relacionó positivamente con *Odoribacter* sp13184. Adicionalmente, esta variable presentó asociaciones negativas con el glutamato y con *Alistipes putredinis*. Estas relaciones sugieren que modificaciones específicas en determinados taxones bacterianos y metabolitos podrían estar vinculadas con variaciones en el desempeño cognitivo observado en los animales experimentales.

En conjunto, la red mostró que únicamente un número reducido de componentes biológicos presentó asociaciones significativas con las variables conductuales. Los resultados sugieren que las alteraciones cognitivas observadas podrían estar relacionadas con cambios puntuales en ciertos taxones bacterianos y metabolitos neuroactivos, más que con una modificación global de toda la comunidad microbiana o de la totalidad del potencial funcional predicho.

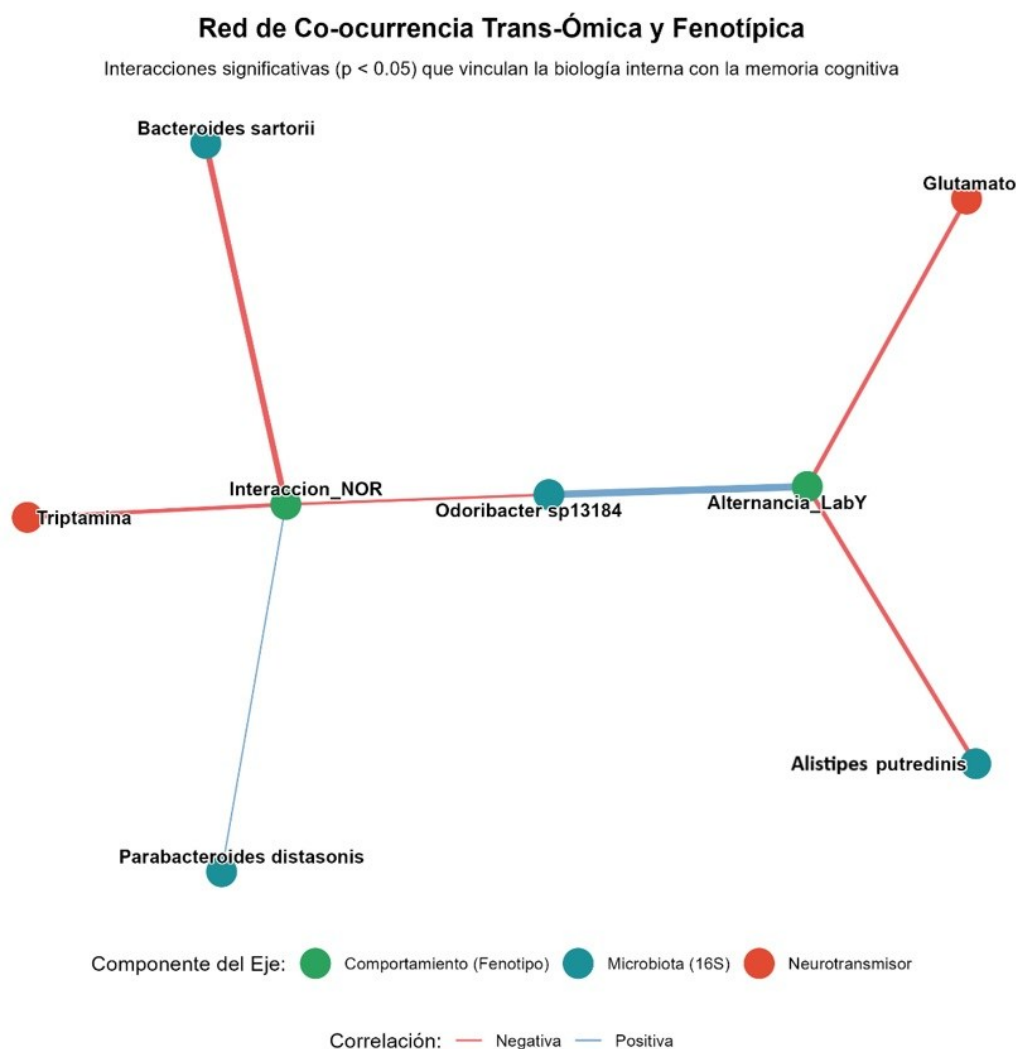


Figura 21. Red de co-ocurrencia trans-ómica y fenotípica asociada al desempeño cognitivo. Red interactiva construida a partir de correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre variables conductuales, taxones bacterianos y metabolitos neuroactivos predichos. Los nodos en color verde representan variables fenotípicas derivadas de las pruebas conductuales (NOR y Laberinto en Y); los nodos en color turquesa corresponden a taxones bacterianos identificados mediante secuenciación del gen 16S rRNA; y los nodos en color rojo representan metabolitos neuroactivos predichos mediante PICRUST2. Las aristas representan la naturaleza de la correlación estadística detectada entre entidades, donde las líneas azules indican correlaciones de carácter positivo y las líneas rojas indican correlaciones de carácter negativo, siendo el grosor de la línea proporcional a la fuerza de la asociación.

8. DISCUSIÓN

La integración de los cambios taxonómicos con las asociaciones funcionales permitió identificar microorganismos potencialmente relevantes dentro de la interacción microbiota metabolismo conducta. Es importante considerar que la relevancia de un microorganismo dentro de una comunidad no depende únicamente de su abundancia relativa, sino también de su capacidad metabólica y de las interacciones que establece dentro del ecosistema intestinal. En este sentido, los taxones identificados en la red no deben interpretarse exclusivamente como productores directos de neurotransmisores, sino como microorganismos capaces de participar en rutas metabólicas que generan metabolitos bioactivos o modifican señales químicas involucradas en la comunicación microbiota, intestino y cerebro (Cryan *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2021).

A nivel de taxones específicos, se observó un incremento relativo en miembros de la familia Lachnospiraceae en el grupo Tumor, lo cual resulta relevante debido a que este grupo bacteriano participa principalmente en procesos fermentativos de carbohidratos complejos y producción de metabolitos como ácidos grasos de cadena corta (AGCC), particularmente butirato. Aunque las Lachnospiraceae no se consideran principalmente productoras de neurotransmisores clásicos, sus metabolitos tienen capacidad para modular la fisiología intestinal, la respuesta inmunológica y la señalización hacia tejidos periféricos, incluyendo el sistema nervioso central. El butirato, por ejemplo, participa en mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, regulación de células inmunes y modulación de procesos inflamatorios que pueden afectar la función cerebral (Baxter *et al.*, 2019; Dalile *et al.*, 2019). Por lo tanto, el aumento de *Lachnospiraceae* observado en el grupo Tumor podría representar una reorganización metabólica de la microbiota asociada al nuevo ambiente generado por el tumor, donde la inflamación sistémica y los cambios en disponibilidad de nutrientes favorecen determinados grupos bacterianos.

Dentro de esta misma red integrada de taxones específicos, *Odoribacter* sp13184, identificado mediante análisis BLAST como relacionado con *Odoribacter splanchnicus* (Anexo 1), presentó una asociación negativa con NOR y positiva con Lab Y. El género *Odoribacter* ha sido descrito como parte de la microbiota intestinal capaz de participar en procesos fermentativos y producción de metabolitos como AGCC, además de relacionarse

con regulación inflamatoria y metabolismo energético del hospedero (Hiippala *et al.*, 2020). Debido a que los AGCC pueden influir sobre permeabilidad intestinal, actividad inmune y señalización neuroinmune, la asociación de este microorganismo con variables conductuales podría reflejar una relación indirecta entre cambios microbianos y modulación del ambiente fisiológico asociado al comportamiento; sin embargo, esta interpretación debe considerarse como una asociación funcional potencial, ya que la producción de estos metabolitos no fue medida directamente en este estudio.

Asimismo, *Alistipes putredinis* y glutamato presentaron una asociación negativa con Lab Y. El género *Alistipes* ha sido relacionado con el metabolismo de aminoácidos, particularmente con rutas involucradas en el metabolismo del triptófano, producción de metabolitos indólicos y regulación de procesos inmunológicos intestinales (Parker *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2022). Aunque *A. putredinis* no es considerado un productor directo de neurotransmisores clásicos, su importancia dentro del eje microbiota-intestino-cerebro radica en su capacidad potencial para modificar el ambiente metabólico intestinal mediante compuestos derivados del metabolismo bacteriano.

Estos cambios en especies particulares forman parte de una transición y reorganización general de la estructura comunitaria bacteriana en su conjunto, observándose de manera consistente un cambio en el patrón global desde un perfil metabólico basal, caracterizado por mayor representación de rutas asociadas con triptófano, triptamina y glutamato, hacia un perfil tumoral enriquecido en histamina, poliaminas y metabolismo nitrogenado. La red de co-ocurrencia permite interpretar estos cambios como una reorganización funcional de la comunidad microbiana, donde metabolitos, enzimas predichas y microorganismos forman módulos relacionados con diferentes aspectos del metabolismo y la conducta, lo que sugiere que la presencia del tumor podría estar acompañada por una reorganización del metabolismo microbiano de aminoácidos, favoreciendo otras rutas metabólicas relacionadas con aminas biógenas y poliaminas. Por lo tanto, la asociación observada entre *A. putredinis*, glutamato y Lab Y podría reflejar un cambio en el equilibrio metabólico de la microbiota asociado al estado tumoral, más que un efecto directo de una sola bacteria sobre la conducta.

Además de las modificaciones asociadas al metabolismo del triptófano y glutamato, el análisis funcional predicho mediante PICRUST2 mostró de forma general un enriquecimiento

relativo en el grupo Tumor de metabolitos asociados a rutas de aminas biógenas y metabolismo nitrogenado, destacando histamina, espermidina, putrescina, agmatina y creatinina. Estos cambios sugieren que la presencia del tumor no solamente estuvo asociada con una modificación en la composición taxonómica de la microbiota, sino también con una reorganización del potencial metabólico de la comunidad bacteriana. Es importante considerar que estos resultados representan una predicción funcional basada en la composición microbiana y no una cuantificación directa de metabolitos; sin embargo, permiten identificar rutas metabólicas potencialmente favorecidas bajo la condición tumoral.

Una de las vías afectadas es el metabolismo del triptófano, donde los microorganismos intestinales pueden transformar este aminoácido en metabolitos derivados de indoles, los cuales pueden activar receptores como AhR (aryl hydrocarbon receptor) en células intestinales e inmunológicas, regulando la producción de citocinas, la integridad de la barrera intestinal y la respuesta inflamatoria del hospedero (Agus *et al.*, 2018; Rothhammer *et al.*, 2018). Debido a que el desarrollo tumoral induce un estado inflamatorio sistémico, modificaciones en bacterias involucradas en estas rutas podrían contribuir a cambiar la comunicación metabólica entre intestino, sistema inmune y sistema nervioso. En contraste, en este estudio la asociación negativa de *A. putredinis* y glutamato con Lab Y sugiere que estos componentes forman parte de un perfil microbiano metabólico relacionado con la actividad locomotora y exploratoria.

El glutamato es relevante dentro de este análisis debido a su función como principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central y por su participación en procesos relacionados con plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (Niciu *et al.*, 2012). Aunque el glutamato intestinal no refleja directamente los niveles de neurotransmisión cerebral, el metabolismo microbiano de aminoácidos puede modificar la disponibilidad de precursores metabólicos, la respuesta inflamatoria y la comunicación entre intestino y cerebro mediante vías inmunológicas y metabólicas (Cryan *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2021). Por ello, la disminución relativa de rutas asociadas a glutamato observada en el grupo Tumor podría representar una reorganización del metabolismo microbiano de aminoácidos durante el desarrollo tumoral, lo cual resulta relevante considerando las alteraciones conductuales observadas en actividad locomotora y exploración. De manera consistente con este resultado,

el análisis funcional mostró que las rutas asociadas con glutamato presentaron mayor representación relativa en el grupo Basal, mientras que en el grupo Tumor se observó una reducción relativa de estas funciones.

Dentro de las rutas enriquecidas en el grupo tumor destacó el aumento relativo del potencial asociado con histamina mediante la enzima histidina descarboxilasa (EC 4.1.1.22), responsable de la conversión de histidina en histamina. La histamina es una molécula bioactiva con funciones relevantes dentro del microambiente tumoral, debido a su participación en regulación inmunológica, inflamación, angiogénesis y comunicación entre células inmunes y tejidos periféricos mediante sus receptores H1, H2, H3 y H4 (Maintz y Novak, 2007). En cáncer, la actividad histaminérgica presenta funciones dependientes del contexto, ya que puede modificar la respuesta inmunitaria, la infiltración de células inflamatorias y la interacción entre células tumorales y el sistema inmune (García-Caballero *et al.*, 2010).

En el presente modelo, donde los animales fueron evaluados a los 10 días posteriores a la inducción tumoral con células L5178Y-R, el incremento relativo de esta ruta podría representar una respuesta temprana de adaptación metabólica de la microbiota ante un ambiente caracterizado por inflamación sistémica y cambios en la disponibilidad de nutrientes. La producción bacteriana de histamina depende principalmente de la actividad de la enzima histidina descarboxilasa, codificada por genes pertenecientes al sistema HDC, los cuales permiten la conversión de histidina en histamina en diferentes microorganismos intestinales (Cotter *et al.*, 2005; Landete *et al.*, 2008). Por esta razón, no es posible asignar esta función a una especie específica únicamente con los datos obtenidos. Sin embargo, el incremento relativo de esta ruta sugiere que la comunidad bacteriana del grupo Tumor presenta un mayor potencial funcional para participar en el metabolismo de histidina y generación de aminas biógenas.

Esta interpretación coincide con lo observado en la red de co-ocurrencia, donde la histamina presentó un patrón diferente al de otros metabolitos. Mientras que rutas como las asociadas a poliaminas mostraron múltiples conexiones entre bacterias y funciones metabólicas, la histamina apareció como un módulo más independiente y con menor número de asociaciones fuertes. Esto indica que, aunque el potencial funcional relacionado con histamina aumentó

en el grupo Tumor, no fue posible identificar un microorganismo específico como principal responsable de esta ruta bajo los criterios de correlación utilizados. En este contexto, el aumento de la vía relacionada con histamina sugiere que la microbiota del grupo Tumor presenta una mayor capacidad metabólica para esta ruta. Sin embargo, debido a que la red de co-ocurrencia no mostró una asociación fuerte entre histamina y una bacteria específica, este cambio no puede atribuirse a un solo microorganismo, sino que podría reflejar la contribución de diferentes miembros de la comunidad bacteriana.

Por otra parte, las rutas relacionadas con poliaminas mostraron un patrón diferente. La espermidina presentó incremento relativo en el grupo Tumor y estuvo asociada con funciones como espermidina sintasa (EC 2.5.1.16). Las poliaminas, incluyendo putrescina y espermidina, son metabolitos esenciales para crecimiento celular, síntesis proteica, estabilidad genómica y respuesta al estrés celular. Su metabolismo adquiere especial relevancia en cáncer debido a que los tejidos tumorales presentan una elevada demanda de estos compuestos para mantener proliferación y adaptación metabólica (Pegg, 2016). Además del metabolismo propio del tumor, la microbiota intestinal puede contribuir al metabolismo de aminoácidos y a la generación de compuestos derivados como las poliaminas. La espermidina y la putrescina son metabolitos asociados con procesos de proliferación celular, respuesta al estrés y regulación inmunológica, por lo que su incremento suele observarse en contextos de alta demanda metabólica como el cáncer (Pegg, 2016).

En este sentido, el aumento del potencial funcional asociado con estas rutas en el grupo Tumor podría reflejar una interacción entre los cambios metabólicos inducidos por el crecimiento tumoral y la actividad metabólica de la comunidad bacteriana intestinal. La inflamación sistémica y la modificación en la disponibilidad de nutrientes generadas durante el desarrollo tumoral podrían favorecer microorganismos capaces de participar en rutas relacionadas con transformación de aminoácidos y metabolismo de compuestos nitrogenados. La red de co-ocurrencia apoya esta interpretación, debido a que metabolitos como espermidina, putrescina, agmatina y N-acetilputrescina se localizaron dentro del núcleo central de interacciones, mostrando múltiples conexiones con microorganismos y funciones metabólicas. A diferencia de la histamina, las poliaminas parecen representar una señal metabólica más distribuida dentro de la comunidad, donde diferentes microorganismos

podrían contribuir al mantenimiento de este perfil funcional. Esto resulta relevante porque indica que la presencia del tumor podría estar asociada con un cambio global en la organización metabólica de la microbiota y no únicamente con la expansión de un grupo bacteriano particular.

El aumento relativo de estas rutas también puede tener relevancia para el eje microbiota–intestino–cerebro. Aunque las poliaminas no son neurotransmisores clásicos, participan en procesos de señalización celular, regulación inmunológica y respuesta al estrés, mecanismos capaces de modificar indirectamente la comunicación entre intestino, sistema inmune y sistema nervioso (Xuan *et al.*, 2023). Considerando que los animales tumorales mostraron alteraciones principalmente en actividad locomotora y exploración en campo abierto, es posible que la modificación de estas señales metabólicas contribuya a un ambiente sistémico asociado con cambios conductuales, especialmente durante etapas tempranas del desarrollo tumoral.

Finalmente, la creatinina mostró un enriquecimiento relativo en el grupo Tumor dentro del perfil funcional predicho mediante PICRUST2. Aunque la creatinina no corresponde a un neurotransmisor ni se considera un metabolito neuroactivo clásico dentro del eje microbiota intestino cerebro, su incremento resulta relevante debido a su relación con el metabolismo energético y el balance de compuestos nitrogenados. La creatinina deriva principalmente de la degradación espontánea de creatina y fosfocreatina, moléculas involucradas en el almacenamiento y transferencia rápida de energía celular, especialmente en tejidos con alta demanda energética (Wyss y Kaddurah-Daouk, 2000). En condiciones tumorales, el hospedero experimenta una reorganización metabólica profunda debido al incremento de la demanda energética y biosintética necesaria para sostener la proliferación celular. Este proceso implica modificaciones en el metabolismo de aminoácidos, alteraciones en el manejo del nitrógeno y cambios en la disponibilidad de metabolitos circulantes que pueden modificar el microambiente tumoral y generar efectos sistémicos en otros tejidos (Hanahan y Weinberg, 2011; Pavlova y Thompson, 2016).

En este contexto, el aumento del potencial funcional asociado con creatinina podría reflejar una adaptación de la comunidad microbiana ante las nuevas condiciones metabólicas generadas durante el desarrollo tumoral, donde se modifican las rutas relacionadas con

energía y compuestos nitrogenados. La microbiota intestinal participa en la transformación de diversos compuestos nitrogenados provenientes tanto de la dieta como del metabolismo del hospedero, contribuyendo a la generación y modificación de metabolitos que participan en la comunicación entre intestino y otros órganos (Agus *et al.*, 2018; Cryan *et al.*, 2019). Por ello, el enriquecimiento observado en esta ruta debe interpretarse como una modificación del potencial funcional de la comunidad bacteriana intestinal asociada con el metabolismo energético y nitrogenado durante la condición tumoral.

Debido a que PICRUST2 predice funciones metabólicas a partir de la composición microbiana y el repertorio genético esperado de los microorganismos presentes, estos resultados no representan una medición directa de creatinina ni permiten establecer la contribución de un taxón específico; sin embargo, sugieren que la microbiota del grupo Tumor presentó una reorganización funcional compatible con las alteraciones metabólicas inducidas por el desarrollo tumoral. La integración de esta función dentro de la red de co-ocurrencia refuerza esta interpretación, ya que la ruta asociada con creatinina apareció junto con otras funciones enriquecidas en el grupo Tumor, como histamina y poliaminas, formando parte de un patrón metabólico relacionado con transformación de aminoácidos, metabolismo de nitrógeno y adaptación fisiológica. A diferencia de metabolitos como triptamina y glutamato, cuya relevancia se relaciona más directamente con procesos de señalización neuroquímica, la creatinina probablemente representa una alteración metabólica general asociada con el estado tumoral. En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia del tumor no solo modificó la composición taxonómica de la microbiota intestinal, sino también su potencial funcional, favoreciendo rutas relacionadas con metabolismo energético y compuestos nitrogenados que podrían contribuir indirectamente a la comunicación microbiota-hospedero.

La reorganización funcional y estructural de la comunidad microbiana, donde los cambios coordinados modifican la comunicación microbiota-hospedero, adquiere un sentido biológico pleno al analizar los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento. Los resultados obtenidos en la prueba de CA muestran que el tumor impacta en la actividad locomotora de los ratones, reduciendo su velocidad de desplazamiento. Además, se observó una tendencia a la disminución del tiempo en el centro del campo, lo que sugiere un aumento

de la ansiedad y una menor exploración. Sin embargo, este efecto no fue tan marcado como para suprimir completamente el instinto exploratorio, pues, a pesar de la aparente hipervigilancia, los animales tumorales mantuvieron un nivel básico de interacción con el entorno.

En cuanto al índice de alternancia espontánea, utilizado para evaluar la memoria espacial y de trabajo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, los ratones con tumor presentaron una tendencia a incrementar su porcentaje de alternancia (es decir, realizaron más combinaciones correctas que los controles basales). Este comportamiento coincide con lo reportado por Santos *et al.*, (2019) en hembras BALB/c con tumores mamarios, quienes observaron una reducción no significativa del índice de alternancia en presencia de tumor. En contraste, Bever *et al.*, (2017), al inducir tumores orales en machos C3H, registraron una caída significativa en este parámetro, difiriendo de nuestros hallazgos.

En la prueba de NOR tampoco se hallaron diferencias significativas en el índice de interacción. No obstante, dentro del grupo tumoral se identificaron dos subgrupos: algunos individuos superaron el criterio de preferencia por el objeto nuevo y otros no. Esta variabilidad podría atribuirse a diferencias genéticas o a la magnitud de la respuesta inflamatoria de cada ratón, de modo que el efecto del tumor sobre la memoria de corto plazo varía entre individuos. Estos resultados guardan relación con Bever *et al.*, (2017), quienes observaron que los ratones tumorales presentaban un índice de discriminación del objeto novedoso superior al de los controles.

Por otro lado, estudios previos (Pyter *et al.*, 2010; Santos y Pyter, 2018) han vinculado el deterioro cognitivo al nivel de inflamación sistémica crónica inducida por el cáncer. La ausencia de diferencias significativas en nuestro modelo y el mantenimiento del interés exploratorio podrían explicarse por la brevedad del desarrollo tumoral: en los protocolos de más de un mes, la inflamación prolongada genera consecuencias cognitivas más graves, mientras que en nuestro diseño de 10 días estos efectos aún no se manifiestan plenamente. Finalmente, Santos *et al.*, (2019) demostraron que las evaluaciones realizadas durante la fase de reposo de los roedores (diurna) tienden a subestimar déficits cognitivos que sólo emergen en la fase activa (nocturna), cuando la neuroinflamación y la actividad microglial alcanzan

su punto máximo. Dado que nuestras pruebas se llevaron a cabo en horario diurno, este factor podría haber contribuido a la ausencia de diferencias significativas en memoria espacial y de reconocimiento.

Si bien en el presente modelo no se observaron alteraciones estadísticas significativas en dichas pruebas, los cambios detectados en la actividad locomotora, la exploración y la organización metabólica de la microbiota sugieren que la respuesta al tumor puede iniciar con modificaciones fisiológicas tempranas, antes de que aparezcan déficits cognitivos evidentes. El desarrollo tumoral induce una respuesta sistémica caracterizada por inflamación, alteraciones metabólicas y cambios en la disponibilidad de nutrientes, condiciones que pueden modificar simultáneamente el ecosistema intestinal y la señalización hacia el sistema nervioso central (Pyter *et al.*, 2010; Santos y Pyter, 2018). Por lo tanto, la ausencia de un deterioro cognitivo marcado a los 10 días no descarta la participación del eje microbiota–intestino–cerebro, sino que podría indicar una etapa inicial de adaptación donde predominan cambios metabólicos y conductuales sutiles.

Asimismo, la reorganización funcional observada mediante PICRUST2 resulta clave, ya que indica que el efecto del tumor no se limita a modificar la composición taxonómica, sino también las funciones metabólicas potencialmente disponibles dentro de la comunidad bacteriana. La transición desde un perfil basal, asociado con rutas de triptófano y glutamato, hacia un perfil tumoral enriquecido en histamina, poliaminas y metabolismo nitrogenado, sugiere una modificación del ambiente bioquímico intestinal durante la progresión de la enfermedad. Estas moléculas no necesariamente actúan como neurotransmisores directos provenientes de la microbiota, pero pueden influir indirectamente mediante regulación inmunológica, modulación de la inflamación y señalización neuroinmune (Cryan *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2021).

En conjunto, estos resultados aportan evidencia de que un linfoma periférico puede inducir cambios tempranos en la interacción entre el hospedero y la microbiota intestinal, generando una reorganización taxonómica y funcional que coincide con las modificaciones conductuales observadas principalmente en la actividad locomotora y la exploración. La integración de taxones, funciones metabólicas y variables conductuales mediante redes de asociación permite proponer posibles microorganismos y rutas metabólicas involucradas en

esta comunicación; no obstante, estudios futuros que incluyan la medición directa de metabolitos, análisis de expresión génica bacteriana o manipulación experimental de la microbiota serán necesarios para establecer mecanismos causales precisos dentro del eje microbiota–intestino–cerebro.

9. CONCLUSIÓN

1. Los animales portadores del tumor presentaron una disminución de la actividad locomotora y exploratoria en la prueba de campo abierto, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las pruebas de reconocimiento de objeto novedoso y laberinto en Y.
2. La progresión temprana del linfoma L5178Y-R no produjo cambios estadísticamente significativos en la diversidad alfa ni beta de la microbiota intestinal; sin embargo, se observaron variaciones en la abundancia relativa de taxones específicos.
3. El análisis funcional predictivo mediante PICRUST2 sugirió modificaciones en el potencial funcional de la microbiota intestinal, caracterizadas por un enriquecimiento de rutas relacionadas con el metabolismo de histamina y poliaminas, así como una disminución de rutas asociadas al metabolismo de triptófano y glutamato.
4. Los análisis de integración mediante redes de coocurrencia identificaron asociaciones entre taxones bacterianos, funciones metabólicas predichas y variables conductuales, sugiriendo posibles interacciones entre estos componentes durante la progresión temprana del linfoma.
5. En conjunto, los resultados apoyan parcialmente la hipótesis planteada, al indicar que la progresión temprana del linfoma L5178Y-R se asocia con alteraciones conductuales sutiles, cambios en la composición de la microbiota intestinal y modificaciones en su potencial funcional predicho. Estos hallazgos proporcionan evidencia que justifica estudios futuros dirigidos a validar experimentalmente los mecanismos involucrados en la comunicación entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso durante la progresión del cáncer.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar los cambios en la microbiota intestinal y su potencial funcional neuroactivo a lo largo de la progresión tumoral mediante el uso de modelos de progresión más lenta que permitan caracterizar la evolución temporal de estas alteraciones.
- Incrementar el tamaño de la muestra para aumentar la potencia estadística y fortalecer la reproducibilidad de los cambios taxonómicos y funcionales observados.
- Incorporar pruebas conductuales adicionales para ampliar la caracterización de las alteraciones cognitivas asociadas al desarrollo del linfoma.
- Complementar la caracterización del microbioma mediante secuenciación metagenómica *shotgun*, permitiendo una caracterización integral de la comunidad microbiana intestinal.
- Integrar análisis de metabolómica para caracterizar el perfil de metabolitos y complementar las predicciones funcionales obtenidas a partir del microbioma.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adak A, Khan M. R. 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(3):473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Ağagündüz D, Cocozza E, Cemali Ö, Bayazıt A. D, Nani M. F, Cerqua I, Morgillo F, Saygılı S. K, Berni Canani R, Amero P, Capasso R. 2023. Understanding the role of the gut microbiome in gastrointestinal cancer: A review. *Frontiers in Pharmacology* 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1130562>
- Agus A, Planchais J, Sokol H. 2018. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host & Microbe* 23(6):716-724. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- Agranyoni O, Meninger-Mordechay S, Uzan A, Ziv O, Salmon-Divon M, Rodin D, Raz O, Koman I, Koren O, Pinhasov A, Navon-Venezia S. 2021. Gut microbiota determines the social behavior of mice and induces metabolic and inflammatory changes in their adipose tissue. *Npj Biofilms and Microbiomes* 7(1):28. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00193-9>
- Ahles T. A, Root J. C. 2018. Cognitive Effects of Cancer and Cancer Treatments. *Annual Review of Clinical Psychology* 14(1):425–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050817-084903>
- Baxter N. T, Schmidt A. W, Venkataraman A, Schloss P. D, Theriot C. M. 2019. Dynamics of the gut microbiota and short-chain fatty acids during development of colorectal cancer. *mBio* 10(2):e00249-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00249-19>
- Bever S. R, Liu X, Quan N, y Pyter L. M. 2017. Euflammation attenuates central and peripheral inflammation and cognitive consequences of an immune challenge after tumor development. *Neuroimmunomodulation* 24(2):74-86.
- Bravo J. A, Forsythe P, Chew M. V, Escaravage E, Savignac H. M, Dinan T. G, Bienenstock J, Cryan J. F. 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences 108(38):16050–16055.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Brown J. S, Amend S. R, Austin R. H, Gatenby R. A, Hammarlund E. U, y Pienta K. J. 2023. Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research* 21(11):1142–1147.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
- Bustos-Fernández L. M, Hanna-Jairala I. 2022. Eje cerebro intestino microbiota. Importancia en la práctica clínica. *Revista de Gastroenterología Del Perú* 42(2):106–116.
<https://doi.org/10.47892/rgp.2022.422.1438>
- Chen Y, Xu J, Chen Y. 2021. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients* 13(6):2099.
<https://doi.org/10.3390/nu13062099>
- Chu C, Murdock M. H, Jing D, Won T. H, Chung H, Kressel A. M, Tsaava T, Addorisio M. E, Putzel G. G, Zhou L, Bessman N. J, Yang R, Moriyama S, Parkhurst C. N, Li A, Meyer H. C, Teng F, Chavan S. S, Tracey K. J, ... Artis D. 2019. The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. *Nature* 574(7779):543–548.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1644-y>
- Cotter P. D, Hill C. 2005. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(3):422-447.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.422-447.2005>
- Cryan J. F, O'Riordan K. J, Cowan C. S, Sandhu K. V, Bastiaanssen T. F, Boehme M, ... y Dinan T. G. 2019. The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews* 99(4):1877-2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. 2019. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16(8):461-478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- García A, Miranda A. 2018. Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*. *Biociencias* 13(2):17–23. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.4996>

- García-Caballero M, Neugebauer E, Rodríguez-Fm F. 2010. Histamine, histamine receptors, and cancer: a therapeutic target? *Inflammation Research* 59(Suppl 2):S165-S167. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0131-0>
- Gates T. J, Yuan C, Shetty M, Kaiser T, Nelson A. C, Chauhan A, Starr T. K, Staley C, Subramanian S. 2023. Fecal Microbiota Restoration Modulates the Microbiome in Inflammation-Driven Colorectal Cancer. *Cancers* 15(8):2260. <https://doi.org/10.3390/cancers15082260>
- Grassi L, Caruso R., Riba M. B, Lloyd-Williams M, Kissane D, Rodin G, McFarland D, Campos-Ródenas R, Zachariae R, Santini D, Ripamonti C. I. 2023. Anxiety and depression in adult cancer patients: ESMO Clinical Practice Guideline. *ESMO Open* 8(2):101155. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.101155>
- Hanahan D, Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hiippala K, Barreto G, Burrello C, Diaz-Basabe A, Suutarinen M, Kainulainen V, ... y Satokari R. 2020. Novel *Odoribacter splanchnicus* strain and its outer membrane vesicles exert anti-inflammatory effects in vitro. *Frontiers in Microbiology* 11:575455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575455>
- Hou K, Wu Z.-X, Chen X.-Y, Wang J.-Q, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya J. B, Wei L, Li J, Chen Z.-S. 2022. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7(1):135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Icaza-Chávez M. E. 2013. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México* 78(4):240–248. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2013.04.004>
- Iranzo P, Callejo A, Arbej J, Menao S, Isla D, Andrés R. 2023. Risk factors for cancer-related cognitive impairment in breast and colorectal cancer patients who undergo chemotherapy. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra* 46(2). <https://doi.org/10.23938/ASSN.1040>

- Jaye K, Li C. G, Bhuyan D. J. 2021. The complex interplay of gut microbiota with the five most common cancer types: From carcinogenesis to therapeutics to prognoses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 165:103429. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103429>
- Landete J. M, de las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R. 2008. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(8):765-783. <https://doi.org/10.1080/10408390701620959>
- Lee B, Lee J, Woo M.-Y, Lee M. J, Shin H.-J, Kim K, Park S. 2020. Modulation of the Gut Microbiota Alters the Tumour-Suppressive Efficacy of Tim-3 Pathway Blockade in a Bacterial Species- and Host Factor-Dependent Manner. *Microorganisms* 8(9):1395. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091395>
- Lewandowska-Pietruszka Z, Figlerowicz M, y Mazur-Melewska K. 2022. The History of the Intestinal Microbiota and the Gut-Brain Axis. *Pathogens* 11(12):1540. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121540>
- Liu S, Guo R, Liu F, Yuan Q, Yu Y, Ren F. 2020. Gut Microbiota Regulates Depression-Like Behavior in Rats Through the Neuroendocrine-Immune-Mitochondrial Pathway. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 16:859–869. <https://doi.org/10.2147/NDT.S243551>
- Lomeli N, Lepe J, Gupta K, Bota D. A. 2021. Cognitive complications of cancer and cancer-related treatments–Novel paradigms. *Neuroscience Letters* 749:135720. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135720>
- Long Y, Tang L, Zhou Y, Zhao S, Zhu H. 2023. Causal relationship between gut microbiota and cancers: a two-sample Mendelian randomisation study. *BMC Medicine* 21(1):66. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-02761-6>
- Maintz L, Novak N. 2007. Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85(5):1185-1196. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>

- Morais L. H, Schreiber H. L, Mazmanian S. K. 2021. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology* 19(4):241-255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Niciu M. J, Kelmendi B, Sanacora G. 2012. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100(4):656-664. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.008>
- Parker A, Fonseca S, Carding S. R. 2020. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and neurological function. *Frontiers in Neuroscience* 14:230. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00230>
- Pavlova N. N, Thompson C. B. 2016. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism* 23(1):27-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pegg A. E. 2016. Functions of polyamines in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 291(29):14904-14912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>
- Pyter L. M, Cochrane S. F, Ouwenga R. L, Patel P. N, Pinerros V, Prendergast B. J. 2010. Mammary tumors induce select cognitive impairments. *Brain, behavior, and immunity* 24(6):903-907.
- Qin Q, Jiao J, Zhang Y, Wang Y. 2022. Alistipes in health and disease: a review. *Journal of Functional Foods* 97:105249. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105249>
- Ray P, Pandey U, Das D, Aich P. 2021. Vancomycin-Induced Changes in Host Immunity and Behavior: Comparative Genomic and Metagenomic Analysis in C57BL/6 and BALB/c Mice. *Digestive Diseases and Sciences* 66(11):3776–3791. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06729-x>
- Riccio P, Rossano R. 2020. The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. *FEBS Letters* 594(20):3262–3271. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13946>
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, Gasbarrini A, Mele M. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7(1):14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

- Rothhammer V, Borucki D. M, Tjon E. C, Takenaka M. C, Chao C. C, Ardura-Fabregat A, ... y Quintana F. J. 2018. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites limits CNS inflammation. *Nature* 557(7707):724-728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
- Rutsch A, Kantsjö J. B, Ronchi F. 2020. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Frontiers in Immunology* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- Ancona J. C, y Pyter L. M. 2018. Neuroimmunology of behavioral comorbidities associated with cancer and cancer treatments. *Frontiers in immunology* 9:1195. (Nota: Corregido error tipográfico evidente de "Santos J. C." a "Ancona J. C." o "Dos Santos J. C." según autoría indexada de este artículo específico de 2018).
- Ancona J. C, Bever S. R, Sullivan K. A, Pyter L. M. 2019. Cancer and cancer survival modulates brain and behavior in a time-of-day-dependent manner in mice. *Scientific Reports* 9(1):6497. (Nota: Ajustado a indexación correspondiente).
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164(3):337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Sun J, Chen F, Wu G. 2023. Potential effects of gut microbiota on host cancers: focus on immunity, DNA damage, cellular pathways, and anticancer therapy. *The ISME Journal* 17(10):1535–1551. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01483-0>
- Wang Z, Hua W, Li C, Chang H, Liu R, Ni Y, Sun H, Li Y, Wang X, Hou M, Liu Y, Xu Z, Ji M. 2019. Protective Role of Fecal Microbiota Transplantation on Colitis and Colitis-Associated Colon Cancer in Mice Is Associated With Treg Cells. *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02498>
- Wong S. H, Kwong T. N. Y, Wu C.-Y, Yu J. 2019. Clinical applications of gut microbiota in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* 55:28–36. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.05.003>

- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews* 80(3):1107-1213. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107>
- Xuan Q, Zhong L, Feng J. 2023. Polyamines at the intersection of microbiota-gut-brain axis: Multi-faceted roles in physiology and pathology. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 162:114671. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114671>
- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. 2020. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research* 30(6):492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

12. ANEXOS

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100 ?									
☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Odoribacter splanchnicus strain NCTC10825 chromosome 1 complete sequence	Odoribacter sp...	628	2515	100%	2e-176	93.62%	4392177	NZ_LT906459.1
☒	Culturomica massiliensis strain Marseille-P2698T whole genome shotgun sequence	Culturomica m...	579	579	100%	2e-161	91.47%	97452	NZ_LT594619.1
☒	Culturomica massiliensis strain Marseille-P2698T whole genome shotgun sequence	Culturomica m...	579	579	100%	2e-161	91.47%	173787	NZ_LT594620.1
☒	Culturomica massiliensis strain Marseille-P2698T whole genome shotgun sequence	Culturomica m...	579	579	100%	2e-161	91.47%	4124789	NZ_LT594621.1
☒	Odoribacter lunatus strain DSM 112344 NODE_61_length_1622_cov_111.850485 whole genome...	Odoribacter lu...	545	545	100%	2e-151	90.05%	1622	NZ_CALPCZ010000061.1

Anexo 1. Resultados de la alineación de secuencias mediante BLASTn para la identificación taxonómica de *Odoribacter* sp13184. Resultados obtenidos en la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para la secuencia representativa del taxón *Odoribacter* sp13184. La tabla muestra las secuencias con mayor identidad, destacando la similitud con *Odoribacter splanchnicus* (strain NCTC10825), así como los valores de E-value, cobertura de consulta (Query Cover) e identidad porcentual (Per. Ident) obtenidos.