



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

UNIDAD ACADÉMICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Caracterización metagenómica del microbioma del tracto gastrointestinal de
Crocodylus acutus en Sinaloa, México”**

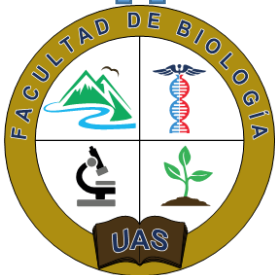
**Tesis que presenta:
Biol. José Uriel López Espinoza**

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

**Directores de tesis
Dr. Samuel Campista León
Dra. Luz Isela Peinado Guevara**

**Asesor externo
Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala**

**Asesores internos
Dr. Víctor Manuel Salomón Soto
Dra. Marisela Aguilar Juárez**



Culiacán, Sinaloa, México a 30 agosto de 2023



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

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

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

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



DEDICATORIA

A:

Mi madre, Manuela Espinoza Castillo y mi abuela, Rafaela Castillo Alcantar, por la infinita atención y cariño que han desbordado hacia mí, porque las palabras no bastan para agradecerles su apoyo y su comprensión en cualquier momento. Por lo que siempre estaré orgulloso de haber sido criado por dos mujeres tan excepcionales y eso es suficiente para siempre tener presente que son los pilares de mi existencia y que lo que soy y seré es gracias a ellas.

A:

Mi pareja, Cinthya Guadalupe Carrasco Saucedo por ser mi apoyo en todo momento. Gracias por tu comprensión, por motivarme a dar lo mejor de mí, brindarme tanto amor y, sobre todo, gracias por tener fe en mí cuando yo a veces no lo tenía. Te amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy respetuosa quisiera agradecer a mis dos directores de tesis, primero, al Dr. Samuel Campista León, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su disponibilidad y presencia en la resolución oportuna de problemas surgidos a lo largo de esta investigación. Segundo, a la Dra. Luz Isela Peinado Guevara por ser una excelente profesora y sobre todo una gran persona, por apoyarme en cualquier momento y hacerme sentir que yo puedo con todo, gracias a sus sugerencias y recomendaciones las cuales contribuyeron bastante para lograr este trabajo.

De igual manera, agradezco a mi asesor, el Dr. Víctor Manuel Salomón Soto, por su apoyo tan importante, tanto en el trabajo de campo como en el asesoramiento del escrito de tesis. También quiero expresar mi gratitud al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala y a su equipo de trabajo por su ayuda tanto en la redacción, en el procesamiento de las muestras y por brindarme un espacio en su laboratorio. De igual manera, agradezco a mi asesora, la Dra. Marisela Aguilar Juárez, por su amabilidad, comprensión y sus sugerencias apropiadas que contribuyeron en mejorar la redacción de este manuscrito de tesis.

A mis compañeros que conforman el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada por brindarme su tiempo y apoyarme con lo que necesité, especialmente para mis compañeros Joel Tohevaris Garcia Guerron y Ricardo Alan Herrera Sicairos por apoyarme tanto en la toma de muestra y sus posteriores análisis.

A la Unidad Académica Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme los espacios para realizar esta investigación y al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada con número de registro 1148188 durante el periodo 2021-2023.

Finalmente, no puedo dejar de lado, agradecer a mis familiares y amigos que se tomaron el tiempo para hacerme llegar su apoyo a través de sus comentarios de motivación.

Por todo, Gracias.

Índice general

Índice de Cuadros	V
Índice de Figuras	VI
Abreviaturas.....	VII
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Orden Crocodylia.....	4
2.1.1 Familia Gavialidae	5
2.1.2 Familia Alligatoridae.....	6
2.1.3 Familia Crocodylidae	6
2.2. Rol ecológico e importancia de los cocodrilos	7
2.3. Resiliencia de los cocodrilos.....	8
2. 1. Origen y evolución del término microbioma	9
2. 2. Microbiota del tracto gastrointestinal	9
2. 3. Coevolución y filosiombiosis de la microbiota intestinal.....	9
2. 4. Factores que configuran el microbioma del TGI	10
2. 5. Funciones de la microbiota intestinal	10
2. 6. Desbalance y enfermedad: la disbiosis	10
2. 7. Secuenciación: herramientas avanzadas para la caracterización microbiana	11
2. 7. 1. Evolución de las técnicas de clasificación bacteriana	11
2. 7. 2. Secuenciación genómica	11
2. 7. 3. Secuenciación de alto rendimiento (NGS)	11
2. 8. Impacto en las ciencias biológicas y metagenómica.....	12
2. 9. Metagenómica: explorando la diversidad microbiana	12
2. 9. 1. Metagenómica dirigida: abordajes específicos	13
2. 9. 2. Metagenómica “ <i>shotgun</i> ”: exploración profunda.....	13
2. 10. Estudios metagenómicos del microbioma del tracto gastrointestinal en especies de cocodrilos	14
2. 10. 1. Variabilidad del microbioma en caimanes americanos.....	14
2. 10. 2. Impacto de la anorexia en la microbiota de cocodrilos	15

2. 10. 3. Exploración de la microbiota en cocodrilos de agua salada.....	15
2. 10. 4. Impacto de la hibernación en el microbioma de caimanes chinos	15
2. 10. 5. Potencial antitumoral de la microbiota intestinal en cocodrilos	16
2. 10. 6. Diferencias en la microbiota en caimanes chinos juveniles y adultos	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
IV. JUSTIFICACIÓN.....	19
V. HIPÓTESIS	20
VI. OBJETIVOS.....	21
6. 1. Objetivo general.....	21
6. 2. Objetivos específicos	21
VII. METODOLOGÍA	22
7. 1. Selección del área de muestreo: Cocodrilera "Santa María"	22
7. 2. Tipo de estudio y selección de muestra	23
7. 3. Tipo de muestreo: conveniencia	23
7. 4. Selección de individuos y tamaño de la muestra	23
7. 5. Selección y evaluación de muestras.....	24
7. 5. 1. Criterios de inclusión	24
7. 5. 2. Criterios de exclusión.....	24
7. 5. 3. Criterios de eliminación	25
7. 5. 4. Captura y toma de medidas morfométricas.....	25
7. 5. 4. 1. Longitud Total (LT)	26
7. 5. 4. 2. Longitud Hocico-Cloaca (LHC).....	26
7. 6. Toma de muestra cloacal y oral en <i>C. acutus</i>	27
7. 6. 1. Obtención de muestra de cavidad cloacal (MC) y oral (MO).....	27
7. 6. 2. Preservación y transporte de muestras	28
7. 6. 3. Almacenamiento y análisis.....	28
7. 6. 4. Extracción de ADN genómico bacteriano.....	29
7. 6. 5. Evaluación de concentración y pureza del ADN genómico bacteriano	30
7. 7. Metodología para preparación de librerías y secuenciación metagenómica dirigida	32
7. 7. 1. Amplificación de la región V3 del Gen 16S mediante PCR.....	33
7. 7. 2. Adición de índices y primers, lavado con perlas magnéticas.....	33
7. 7. 3. Segunda PCR para formación de librerías	33

7. 7. 4. Normalización, cuantificación y agrupamiento de librerías.....	34
7. 7. 5. Secuenciación en secuenciador MiniSeq	34
7. 8. Análisis de calidad y filtrado de secuencias para metagenómica dirigida.....	34
7. 8. 1. Pre-procesamiento y análisis inicial.....	34
7. 8. 2. Medidas de control de calidad inicial.....	34
7. 8. 3. Fusión de lecturas y generación de variantes	35
7. 8. 4. Generación de base de datos y asignación taxonómica.....	35
7. 9. Análisis de diversidad microbiana	35
7. 9. 1. Evaluación de cobertura y normalización	35
7. 9. 2. Cálculo de Índices de Diversidad Alfa.....	36
7. 9. 3. Análisis de Diversidad Beta	36
7. 9. 4. Identificación de taxones bacterianos significativos	36
7. 10. Predicción de perfiles funcionales de la microbiota	36
7. 10. 1. Uso de Software PICRUSt2	36
7. 10. 2. Análisis de abundancia de genes ortológicos (KO)	37
7. 10. 3. Análisis de abundancia diferencial.....	37
7. 11. Lugar de realización.....	37
7. 12. Financiamiento.....	38
VIII. RESULTADOS	39
8. 1. Captura y medidas morfométricas	39
8. 2. Secuenciación y procesamiento de datos.....	41
8. 3. Caracterización bacteriana a nivel de género.....	41
8. 4. Diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal de <i>C. acutus</i> a través de la secuenciación del gen 16S ARNr	42
8. 4. 1. Composición filogenética y abundancia de filos bacterianos	42
8. 4. 2. Abundancia a nivel de familia y análisis de agrupamiento	43
8. 5. Comparación de comunidades bacterianas en el TGI de <i>C. acutus</i>	46
8. 5. 1. Suficiencia del muestreo y cobertura bacteriana.....	46
8. 5. 2. Diversidad microbiana y estimación de métricas.....	47
8. 5. 3. Equidad y distribución de abundancias bacterianas	48
8. 5. 4. Diversidad filogenética en la microbiota bacteriana	49
8. 5. 5. Análisis multivariados de diversidad beta.....	49
8. 5. 6. Influencia del sexo en la estructura bacteriana.....	50

8. 5. 7. Biomarcadores taxonómicos asociados a muestras cloacales de juveniles y adultos	51
8. 5. 8. Biomarcadores taxonómicos asociados a muestras orales de juveniles y adultos	53
8. 5. 9. Biomarcadores taxonómicos asociados al sexo	54
8. 6. Predicciones de funciones metabólicas.....	56
8. 6. 1. Diferencias funcionales en muestras de cloaca de juveniles y adultos	58
8. 6. 2. Diferencias funcionales en muestras orales de juveniles y adultos.....	59
IX. DISCUSIÓN.....	61
X. CONCLUSIONES	67
XI. REFERENCIAS	70
XII. ANEXOS	85

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Detalles de las condiciones de PCR y de primers para la amplificación de V3.....	33
2	Datos morfométricos de individuos de <i>C. acutus</i> en cautiverio.....	40
3	Clasificación taxonómica de ASV por taxa.....	41

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Relaciones filogenéticas de cocodrilos existentes.....	5
2	Enfoques de la metagenómica.....	13
3	Cocodrilera “Santa María”	22
4	Captura y toma de medidas morfométricas.....	26
5	Toma de muestra de cloaca y cavidad bucal de <i>C. acutus</i>	27
6	Diseño experimental para la fabricación de librerías y secuenciación .	32
7	Gráfica de barras apiladas de los filos bacterianos.....	43
8	Gráfica de barras apiladas de las familias bacterianas dominantes.....	44
9	Mapa de calor agrupado jerárquicamente a nivel de familia.....	46
10	Curvas de rarefacción de en muestras de cloaca y cavidad oral de <i>C. acutus</i>	47
11	Métricas de diversidad alfa utilizadas en este estudio.....	48
12	NDMS y PCoA con distancia Unifrac no ponderada en muestras de cloaca y cavidad oral de <i>C. acutus</i>	50
13	NDMS y PCoA con distancia Unifrac no ponderada en muestras a nivel de sexo.....	51
14	LEfSe para muestras de cloaca de <i>C. acutus</i>	52
15	LEfSe para muestras orales de <i>C. acutus</i>	54
16	LEfSE a nivel de sexo.....	55
17	Gráfica de abundancias de perfiles funcionales en nivel superior.....	56
18	Gráfica de abundancias de perfiles funcionales en segundo nivel.....	57
19	Gráfica de abundancias de perfiles funcionales en tercer nivel.....	58
20	Diferencia de perfiles funcionales en muestras de cloaca.....	59
21	Diferencia de perfiles funcionales en muestras de orales.....	60

Abreviaturas

TGI:	Tracto Gastro Intestinal.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
LT:	Longitud total.
LHC:	Longitud hocico-cloaca.
MC:	Muestra de cavidad cloacal.
MO:	Muestra de cavidad oral.
ASV:	Variante de secuencias de amplicones.
OTU:	Unidades operacionales taxonómicas
NGS:	Secuenciación de nueva generación.
CIAD:	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa.
NMDS:	Escalamiento Multidimensional No Métrico.
PCoA:	Análisis de Coordenadas Principales.
ANOSIM:	Análisis de Similitudes.
LEfSe:	Análisis discriminante lineal de tamaño de efecto.
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto.
MCA	Muestras cloacales adultos.
MCS	Muestras cloacales juveniles.
MOA	Muestras orales adultos.
MOS	Muestras orales juveniles
AMC	Muestras cloacales machos.
AFC	Muestras cloacales hembras.
AMB	Muestras orales machos.
AFB	Muestras orales hembras.

Resumen

Introducción: Cada vez más estudios resaltan el papel fundamental de la microbiota del tracto gastro intestinal (TGI) en los vertebrados. A pesar del rol tan importante que realizan estas comunidades en animales y humanos, su diversidad en cocodrilos ha sido poco estudiada. De manera que, identificar la estructura de las comunidades microbianas en los cocodrilos, es crucial para comprender cómo la microbiota del TGI se ve involucrada en diversas actividades fisiológicas de estos ejemplares y como esta se ve afectada por factores tanto intrínsecos y extrínsecos. Por lo que el **objetivo** del presente estudio fue caracterizar la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas en la microbiota gastro-intestinal de *Crocodylus acutus*. **Metodología:** Se seleccionó el Cocodrilario "Santa María" en Sinaloa, México, como área de estudio, por su relevancia y manejo ético. Se realizó un muestreo por conveniencia que involucró la captura de 27 ejemplares (10 juveniles y 17 adultos). Se procedió a recolectar meticulosamente muestras cloacales y orales de cada individuo utilizando hisopos estériles, lo que resultó en un total de 54 muestras. Posteriormente, a cada una de las muestras se les extrajo y cuantificó ADN genómico bacteriano. Se prepararon librerías para la secuenciación masiva de la región hipervariable V3 del gen 16S ARNr. La asignación taxonómica bacteriana se llevó a cabo a partir de QIIME2 con la base de datos SILVA 138 como referencia. Se utilizó PICRUST2 para la predicción de perfiles funcionales involucrados en la microbiota del TGI de *C. acutus*. **Resultados:** La secuenciación generó 1,319,228 lecturas de alta calidad. Las cuales permitieron la identificaron de 38 filos bacterianos, con Proteobacteria dominante en todos los grupos. Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteriota prevalecieron en cloacas y cavidad oral de juveniles y adultos, respectivamente. Los análisis de Diversidad tanto alfa como beta, permitieron distinguir cómo las variables edad (juveniles y adultos) y sitio anatómico (cloaca y cavidad oral) influyen en las comunidades bacterianas del TGI en cocodrilos. Siendo ejemplares adultos más diversos en su comunidad bacteriana y como el sitio anatómico también juega un rol importante en la variabilidad de estas comunidades. Por otra parte, el sexo no influyó en la estructura bacteriana en adultos. En cuestión de la predicción funcional, se anotaron un total de 259 categorías funcionales, destacando rutas funcionales asociadas a metabolismo como las más abundantes entre los grupos. **Conclusión:** La secuenciación masiva del gen 16S ARNr demuestra como la estructura de las comunidades bacterianas en el TGI en *C. acutus* es influenciada por variables como la edad y ubicación anatómica. Estos resultados resaltan que distintas regiones del TGI pueden albergar composiciones bacterianas diferentes, lo que potencialmente se ve reflejado en funciones específicas y adaptaciones fisiológicas diferenciadas en los cocodrilos. Estos hallazgos avanzan en la comprensión de la interacción cocodrilo-microbiota.

Abstract

Introduction: More and more studies highlight the fundamental role of the microbiota of the gastrointestinal tract (GIT) in vertebrates. Despite the important role played by these communities in animals and humans, their diversity in crocodylians has been little studied. Therefore, identifying the structure of microbial communities in crocodylians is crucial to understand how the microbiota of the GIT is involved in various physiological activities of these specimens and how it is affected by both intrinsic and extrinsic factors. Therefore, the **objective** of the present study is to characterize the taxonomic and functional diversity of bacterial communities in the gastrointestinal microbiota of *Crocodylus acutus*. **Methodology:** The crocodile farm "Santa María" in Sinaloa, Mexico, was selected as the study area because of its relevance and ethical management. A convenience sampling was carried out involving the capture of 27 specimens (10 juveniles and 17 adults). Cloacal and oral samples were meticulously collected from each individual using sterile swabs, resulting in a total of 54 samples. Subsequently, bacterial genomic DNA was extracted and quantified from each sample. Libraries were prepared for mass sequencing of the V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene. Bacterial taxonomic assignment was carried out from QIIME2 with the SILVA 138 database as a reference. PICRUST2 was used for the prediction of functional profiles involved in the *C. acutus* TGI microbiota. **Results:** Sequencing generated 1,319,228 high quality reads. These allowed the identification of 38 bacterial phyla, with Proteobacteria dominant in all groups. Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteriota prevailed in cloacae and mouths of juveniles and adults, respectively. The alpha and beta diversity analyses allowed us to distinguish how variables such as age (juveniles and adults) and anatomical site (cloaca and mouth) influence the bacterial communities of the GIT in crocodiles. Adult specimens are more diverse in their bacterial community and the anatomical site also plays an important role in the variability of these communities. On the other hand, sex did not influence the bacterial structure in adults. In terms of functional prediction, a total of 259 functional categories were scored, highlighting functional pathways associated with metabolism as the most abundant among the groups. **Conclusion:** Massive sequencing of the 16S rRNA gene demonstrates how the structure of bacterial communities in the TGI in *C. acutus* is influenced by variables such as age and anatomical location. These results highlight those different regions of the TGI may harbor different bacterial compositions, potentially reflected in specific functions and distinct physiological adaptations in crocodylians. These findings advance the understanding of the crocodylian-microbiota interaction.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el campo de la microbiología ha revelado una diversidad sorprendente de comunidades microbianas en el tracto gastrointestinal (TGI) de vertebrados. Estas comunidades incluyen virus, arqueas, parásitos, hongos microscópicos y, sobre todo, bacterias, que potencialmente influyen en la salud y la fisiología de sus hospederos (Hou et al., 2022; Mondot et al., 2013; Mukherjee et al., 2018).

La microbiota intestinal de los vertebrados, en particular en el TGI, ha emergido como un elemento clave para mantener la homeostasis del huésped, desempeñando un papel crucial en diversas actividades fisiológicas (Coman y Vodnar, 2020). Sus efectos abarcan desde la regulación del sistema inmunológico hasta la protección contra microorganismos patógenos y toxinas (Al-Rashidi, 2022). Además, contribuye al mantenimiento de la mucosa intestinal, al almacenamiento de energía y a una variedad de funciones metabólicas, ya que muchas bacterias presentes en el TGI tienen la capacidad de metabolizar moléculas que el huésped no podría digerir por sí mismo (Sędzikowska y Szablewski, 2021; Yang et al., 2020).

A pesar de los avances en la comprensión de la relación entre la microbiota intestinal y la salud en humanos, gran parte de la investigación se ha centrado en mamíferos, especialmente en humanos, con énfasis en su influencia en condiciones como la obesidad, la diabetes y el cáncer (Hou et al., 2022; Mukherjee et al., 2018; Redondo-Useros et al., 2020; Sędzikowska y Szablewski, 2021). Sin embargo, surge un interés creciente en explorar la composición de las comunidades bacterianas en una variedad de especies de vertebrados, tanto en vida silvestre como en cautiverio, para identificar microorganismos relevantes para la salud humana (Alberdi et al., 2021; Guo et al., 2019; McKenzie et al., 2017).

Dentro de los vertebrados, los reptiles, en particular el orden Crocodylia, presentan características únicas que los convierten en sujetos de investigación intrigantes. Estas especies exhiben una notable resiliencia, sobreviviendo en ambientes altamente contaminados y enfrentando desafíos ambientales (Siddiqui et al., 2021). A pesar de estar expuestas a condiciones adversas, como aguas contaminadas con metales pesados y radiación, estas especies demuestran una longevidad excepcional de hasta 80-100 años (Gholamhosseini et al., 2021; Khan et al., 2021; Lázaro et al., 2015; Schneider et al., 2012). La resistencia excepcional de estos reptiles ha sido atribuida en parte a su sistema inmunológico altamente adaptado (Siddiqui et al., 2022). Sin embargo, dada la influencia significativa del microbioma del TGI en la regulación inmunológica de los vertebrados, se plantea la hipótesis de que el microbioma de los cocodrilos desempeña un papel fundamental en su resiliencia y homeostasis (Siddiqui et al., 2021).

Aunque se han realizado algunos estudios sobre la microbiota intestinal de cocodrilos, la caracterización exhaustiva de estas comunidades microbianas es aún limitada (Keenan y Elsey, 2015; Keenan et al., 2013; Khan et al., 2021; Lin et al., 2019; Tang et al., 2019; Willson et al., 2019). Por lo tanto, es imperativo investigar la composición de estas comunidades bacterianas en cocodrilos, lo que permitirá comprender mejor su contribución a diversas funciones fisiológicas y su posible papel en la resiliencia de estas especies (Groussin et al., 2020; Scheelings et al., 2020).

Entre las herramientas disponibles para identificar bacterias, la metagenómica se ha consolidado como la técnica de elección para caracterizar la diversidad microbiana en ecosistemas específicos (Liu et al., 2021). Esta técnica, que analiza el material genético de microorganismos sin requerir su cultivo, brinda acceso a información genómica tanto de microorganismos cultivables como no cultivables (Liu et al., 2021). De esta manera, se revela

una fuente valiosa de recursos para determinar la diversidad microbiana (Mantilla Martínez y Torres Sáez, 2019).

Además de proporcionar una visión funcional de las comunidades, la metagenómica permite el estudio de los genes y sus posibles roles metabólicos, ya sea mediante la secuenciación del genoma completo o la predicción de perfiles funcionales (Douglas et al., 2020).

Dentro de los marcadores moleculares empleados para identificar y clasificar bacterias mediante secuenciación de alto rendimiento, destaca el gen 16S ARNr (Johnson et al., 2019). Este gen de aproximadamente 1,500 pb codifica una porción de la subunidad ribosomal 30S y contiene nueve "regiones hipervariables" (V1-V9) que exhiben diversidad de secuencias entre especies bacterianas y permiten la identificación al comparar con bases de datos de secuencias disponibles (Zeng et al., 2017).

En este contexto, el presente trabajo busca expandir el conocimiento actual sobre el microbioma del tracto gastrointestinal del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), enfocándose en la caracterización de las comunidades microbianas mediante la secuenciación de la región hipervariable V3 del gen 16S ARNr. El objetivo es identificar posibles diferencias significativas en la composición de las comunidades bacterianas que conforman la microbiota intestinal de cocodrilos criados en granjas, contribuyendo así a una comprensión más completa de su función en la resiliencia de estos arcosaurios.

II. ANTECEDENTES

2.1. Orden Crocodylia

El orden Crocodylia agrupa a las especies de saurópsidos más grandes que existen en la actualidad. Los cocodrilos, pertenecen a la clase Sauropsida y son notables por sus características morfológicas distintivas. Entre estas características se incluyen cuerpos largos y robustos, patas cortas y fuertes adaptadas para nadar, y hocicos alargados y poderosos (Ristevski, 2019). Además de su tamaño imponente, los cocodrilos son conocidos por su capacidad para adaptarse a diversos hábitats acuáticos y terrestres en todo el mundo (Pough, 2022).

Los cocodrilos, son considerados fósiles vivientes ya que se estima que han existido durante los últimos 85 millones de años, siendo una de las especies que sobrevivieron con éxito a uno de los eventos de extinción masiva más importante para la vida como lo conocemos, que fue el evento del cretácico terciario (Siddiqui et al., 2021). Hoy en día se reconocen alrededor de 26 especies de cocodrilos distribuidos en tres familias (Figura 1).

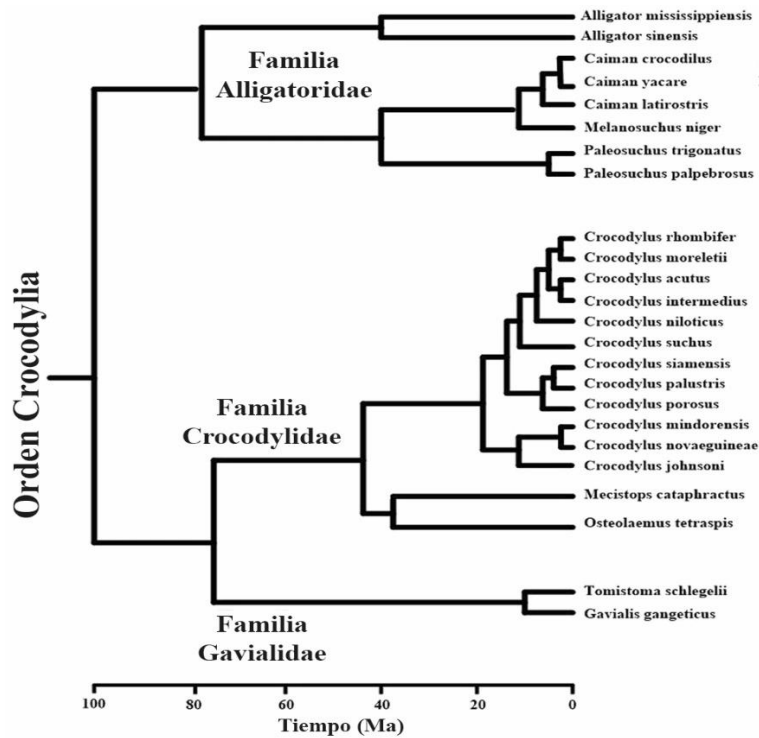


Figura 1. Relaciones filogenéticas de cocodrilos existentes. Modificado de Merchant et al. (2018).

2.1.1 Familia Gavialidae

De acuerdo a estudios moleculares, la Familia Gavialidae está conformada por dos especies representativas de dos géneros que son el gavial (*Gavialis gangeticus*) y el falso gavial (*Tomistoma schlegelii*) (Pough, 2022). Hoy en día, su distribución geográfica radica solamente en el sudeste asiático, habitando ríos y cuerpos de agua dulce (Rafferty, 2020).

La característica más distintiva y notable que diferencia a los gaviales de otros cocodrilos es su hocico inusualmente largo y delgado, que se asemeja a una especie de nariz puntiaguda (Ristevski, 2019). Esta peculiar morfología del hocico se ha desarrollado como una adaptación altamente especializada que les permite capturar peces de manera eficiente, ya que, en su etapa adulta, se especializan en una dieta exclusivamente piscívora (Panda et al., 2023).

2.1.2 Familia Alligatoridae

Los Alligatoridae son una familia de cocodrilianos de agua dulce la cual está compuesta por cuatro géneros (*Alligator*, *Caiman*, *Melanosuchus* y *Paleosuchus*) y ocho especies en total (Oliveria et al., 2021). A excepción del caimán chino (*Alligator sinensis*), todas estas especies se encuentran en las Américas (Pough, 2022). Donde, se pueden encontrar en hábitats de agua dulce, como ríos, lagos y pantanos. Entre las especies más conocidas de esta familia se encuentran el caimán de anteojos (*Caiman crocodilus*) y el caimán americano (*Alligator mississippiensis*), que son emblemáticos de la fauna de América del Sur y América del Norte, respectivamente (Oliveria et al., 2021).

Una característica distintiva de los caimanes y aligátorees es la forma de sus hocicos, que son relativamente anchos en comparación con otros cocodrilos como tal. Además, presentan una peculiaridad en la disposición de sus dientes: los dientes de la mandíbula inferior encajan en fosas en la mandíbula superior, de manera que no son visibles cuando el cocodrilo tiene la boca cerrada (Ristevski, 2019). Esta adaptación dental les permite atrapar y sujetar a sus presas de manera eficiente, especialmente cuando se trata de animales acuáticos.

2.1.3 Familia Crocodylidae

La familia crocodyliae compuesta por tres géneros (*Osteolaemus*, *Mekosuchus* y *Crocodylus*) y 16 especies presentan una distribución global, principalmente en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Meredith et al., 2011). Un hallazgo tanto fósil como molecular sugiere que los cocodrilos emigraron desde África hacia las Américas en un periodo que abarca los últimos 7 millones de años, un fenómeno que ha dejado una huella interesante en la evolución de estas criaturas (Meredith et al., 2011).

Algunas especies de cocodrilos son conocidas por llevar a cabo largas migraciones, siendo el cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*) y el cocodrilo de agua salada (*Crocodylus porosus*) son dos ejemplos notables (Pough, 2022). Estos cocodrilos son capaces de realizar largos viajes a través del océano y han colonizado islas que se encuentran a más de 1,000 kilómetros de la costa continental más cercana (Rossi et al., 2020). El cocodrilo de agua salada, se destaca como la especie de cocodrilo más grande que existe en la actualidad, con machos de gran tamaño que pueden superar los 6 m de longitud y alcanzar un peso de hasta 1,000 kg (Pough, 2022).

2.2. Rol ecológico e importancia de los cocodrilos

Los Crocodylia cumplen funciones de suma importancia dentro de sus ecosistemas y pueden ser consideradas como especies clave. Ya que pueden considerarse como centinelas ambientales en la degradación de los ecosistemas o la contaminación ambiental, dado que pueden acumular sustancias tóxicas y metales pesados en sus órganos y tejidos (Rueda et al., 2007).

También, pueden modificar el aspecto y la dinámica del ambiente, desde la estructura del paisaje hasta los flujos hídricos en los que habitan. En el sentido de que sus desplazamientos cotidianos mantienen abiertos canales secundarios, lo que ayuda al flujo libre del agua, también se ha reportado que las excavaciones que efectúan los cocodrilos cerca de las riberas resultan cruciales para otras formas de vida (Pantano et al., 2011).

Por otra parte, los cocodrilos se encuentran en la cúspide de la cadena alimenticia en los ecosistemas dulceacuícolas tropicales de manera que su existencia tiene un efecto directo en

la regulación homeostática de las poblaciones de muchos otros tipos de animales tanto acuáticos y terrestres (Rueda et al., 2007).

Desde un punto de vista antropogénico, los cocodrilos han sido objeto de interés desde tiempos inmemoriales. Como una figura mitológica para distintas culturas y en la actualidad su importancia radica principalmente como un recurso para la obtención de carne y pieles para la industria del cuero y en el área del turismo como atractivo para las personas en zoológicos y santuarios (Lin et al., 2019).

Además de su importancia en los ecosistemas, los Crocodylia también han despertado un considerable interés en el campo de la medicina. Esto se debe a que su sangre y suero poseen potenciales terapéuticos en áreas como el tratamiento del cáncer y el desarrollo de agentes antimicrobianos (Siddiqui et al., 2021).

2.3. Resiliencia de los cocodrilos

Una de las características de los cocodrilos que ha llamado la atención de los investigadores en los últimos años, es su resiliencia ya que estas especies pueden residir en ambientes contaminados; y a menudo habitan en aguas que contienen metales pesados; exposición frecuente a la radiación; se alimentan de carne podrida y, aun así, pueden tener una vida útil de hasta 100 años (Siddiqui et al., 2021).

En gran medida, su resistencia se debe a su sistema inmunológico altamente adaptado, sin embargo a partir de los estudios exhaustivos en la descripción del microbioma así como su función e importancia de estos microorganismos en la asociación simbiótica en animales vertebrados, investigadores han planteado la hipótesis que el microbioma del TGI de estas

especies está involucrado de una manera directa en la resiliencia del cocodrilo, ya que estos microorganismos pueden secretar compuestos bioactivos con actividades antimicrobianas que juegan un papel importante en la contribución a la homeostasis y resistencia contra agentes infecciosos (Siddiqui et al., 2021).

2. 1. Origen y evolución del término microbioma

El término "microbioma" fue acuñado por Lederberg y McCray (2001) para referirse a la "comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbiotes y patogénicos que literalmente comparten nuestro espacio corporal". A lo largo del tiempo, el concepto ha evolucionado, dando lugar a las definiciones actuales de "microbiota" y "microbioma". Actualmente, "microbiota" se refiere a la comunidad de microorganismos, mientras que "microbioma" abarca no solo los microorganismos en sí, sino también su hábitat, información genética y el contexto ambiental que los rodea (Marchesi y Ravel, 2015).

2. 2. Microbiota del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) en vertebrados emerge como un sitio primordial para la colonización microbiana, representando una de las interfaces más amplias entre el huésped y los factores ambientales (Yang et al., 2020). Se estima que, a lo largo de la vida promedio de un humano, aproximadamente 60 toneladas de alimentos pasan a través del TGI, llevando consigo una vasta cantidad de microorganismos provenientes del entorno (Thursby y Juge, 2017).

2. 3. Coevolución y filosiombiosis de la microbiota intestinal

El concepto de coevolución se destaca en la relación entre los microorganismos, que incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos y arqueas, y sus anfitriones vertebrados en el TGI. Esta coevolución ha dado lugar a una simbiosis altamente beneficiosa conocida como

"filosimbiosis", donde la microbiota y el hospedero han interactuado durante milenios para mutuamente prosperar (Groussin et al., 2020).

2. 4. Factores que configuran el microbioma del TGI

La microbiota intestinal alberga trillones de microorganismos, presentando una diversidad genética que supera al genoma del hospedero en al menos 100 veces (Thursby y Juge, 2017). Esta diversidad es influenciada por diversos factores exógenos, tales como la dieta, la edad, el sexo y el origen geográfico (Coman y Vodnar, 2020). Además, la anatomía del TGI desempeña un papel crítico en la colonización. La compleja estructura de pliegues, invaginaciones y variaciones de pH en el TGI crea nichos ecológicos diversos y cambiantes, capaces de albergar una rica variedad de microorganismos (Hou et al., 2022; Thursby y Juge, 2017).

2. 5. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal en vertebrados realiza un amplio espectro de funciones fisiológicas de gran relevancia para el hospedero (Thursby y Juge, 2017). Estas funciones son esenciales para regular el sistema inmunológico, proporcionar protección contra agentes patógenos, fortalecer la barrera intestinal y facilitar la absorción eficiente de nutrientes (Thursby y Juge, 2017). Sin embargo, para que estos procesos ocurran de manera óptima, se requiere un equilibrio en el ecosistema microbiano del intestino, conocido como "eubiosis", que se caracteriza por la prevalencia de especies beneficiosas para el organismo (Al-Rashidi, 2022).

2. 6. Desbalance y enfermedad: la disbiosis

La disbiosis, un desequilibrio en la composición normal de la microbiota del TGI, debe ser subrayada como un fenómeno crucial a considerar (Al-Rashidi, 2022). Se ha establecido una relación entre la disbiosis y diversas enfermedades, en su mayoría trastornos

gastrointestinales, obesidad, diabetes tipo I y ciertos tipos de cáncer (Han et al., 2018; Hou et al., 2022; Mondot et al., 2013; Sędzikowska y Szablewski, 2021).

2. 7. Secuenciación: herramientas avanzadas para la caracterización microbiana

2. 7. 1. Evolución de las técnicas de clasificación bacteriana

A lo largo de la historia, diversas técnicas han sido empleadas para el estudio y clasificación de bacterias, desde métodos convencionales como medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas, hasta pruebas serológicas y tinciones específicas (Duquenne, 2018). Si bien estas aproximaciones han proporcionado información valiosa sobre la microbiota cultivable, su precisión y aplicabilidad han sido superadas con el tiempo por métodos más sofisticados, como las pruebas moleculares basadas en la extracción y secuenciación de ADN genómico (Jo et al., 2020).

2. 7. 2. Secuenciación genómica

Los inicios de la secuenciación datan de la década de los 70, cuando Maxam y Gilbert propusieron el método de secuenciación química, seguido por el método de terminación de la cadena de Sanger (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977). Esta última técnica revolucionó el campo al permitir secuencias más extensas en menor tiempo y con mayor confiabilidad. A lo largo del tiempo, la secuenciación ha evolucionado y se ha convertido en un pilar fundamental en el estudio de ADN y ARN (Buermans y den Dunnen, 2014).

2. 7. 3. Secuenciación de alto rendimiento (NGS)

La secuenciación de alto rendimiento, o Next Generation Sequencing (NGS), marca un hito en la secuenciación genómica al abordar fragmentos cortos de ADN (denominados lecturas o reads) de manera masiva y en paralelo (Jo et al., 2020). Esta revolución tecnológica ha resultado en una significativa ampliación de la capacidad de secuenciación, la reducción de

los tiempos de trabajo y los costos por base secuenciada (Buermans y den Dunnen, 2014). Un abanico de plataformas con características diversas ha emergido, habilitando el estudio y manejo de información en la prevención, diagnóstico, tratamiento y monitoreo de enfermedades diversas (Liu et al., 2012).

2. 8. Impacto en las ciencias biológicas y metagenómica

Las tecnologías de secuenciación han transformado el panorama de las ciencias biológicas, proporcionando una ventana única hacia sistemas biológicos previamente inaccesibles. Con su alta eficiencia, reproducibilidad y rapidez, se han diversificado las aplicaciones, incluyendo la caracterización de la diversidad y funciones de microbiomas complejos en diversos entornos (Ghurye et al., 2016).

2. 9. Metagenómica: explorando la diversidad microbiana

Dentro de este contexto, la metagenómica surge como un campo interdisciplinario que fusiona la genética molecular, la ecología microbiana y el análisis de datos (Ferravante et al., 2021). El término "metagenómica" fue acuñado por Handelsman et al. (1998) para describir el análisis de secuencias de ADN de genomas microbianos en comunidades ambientales. Esta disciplina se subdivide en dos enfoques cruciales para la obtención de secuencias genómicas (Figura 2): la metagenómica dirigida, que se basa en secuenciación de marcadores moleculares específicos (16S, ITS, etc.) y la metagenómica shotgun, que se enfoca en secuenciación de genomas completos (West et al., 2019).

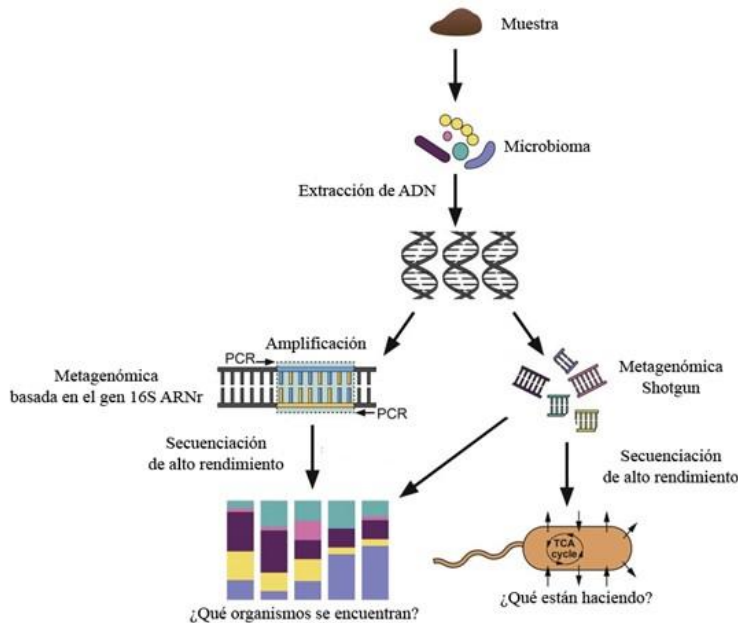


Figura 2. Enfoques de la metagenómica. Modificado de West et al. (2019).

2. 9. 1. Metagenómica dirigida: abordajes específicos

La metagenómica dirigida, o secuenciación de amplicones, se fundamenta en la amplificación y secuenciación de marcadores específicos para determinar la composición microbiana en muestras de diversos entornos (Yuan et al., 2015). En este contexto, el gen 16S ARNr, codificador de la subunidad menor del ARNr, emerge como el marcador por excelencia para la identificación bacteriana, al ofrecer universalidad, múltiples regiones hipervariables y aplicaciones filogenéticas (Fischer et al., 2016; Huse et al., 2008; Yuan et al., 2015).

2. 9. 2. Metagenómica “shotgun”: exploración profunda

Por otro lado, la metagenómica “shotgun” aborda el estudio integral de genes de organismos presentes en una muestra, incluyendo especies eucariotas, procariotas y virus (Quince et al., 2017). Este método permite evaluar tanto la composición como las funciones microbianas,

proporcionando un entendimiento más completo de los ambientes estudiados (Joseph y Pe'er, 2021; Quince et al., 2017).

La secuenciación ha revolucionado la comprensión de la microbiota y la diversidad microbiana. La metagenómica emerge como una disciplina esencial, desplegando técnicas de secuenciación para explorar desde marcadores moleculares hasta genomas completos, abriendo ventanas hacia la diversidad y las funciones de los microorganismos en diversos ecosistemas.

2. 10. Estudios metagenómicos del microbioma del tracto gastrointestinal en especies de cocodrilos

La investigación de los microbiomas intestinales en cocodrilos ha arrojado luz sobre la compleja interacción entre estos reptiles y su microbiota. A través de análisis metagenómicos, se ha explorado la composición, función y variabilidad de la microbiota en distintas especies y contextos. Estos estudios han proporcionado información valiosa sobre cómo factores como el entorno, la salud y la dieta pueden influir en la estructura y función del microbioma intestinal de estos animales.

2. 10. 1. Variabilidad del microbioma en caimanes americanos

Keenan et al. (2013) realizaron un análisis comparativo de la microbiota gastrointestinal en caimanes americanos (*Alligator mississippiensis*) de vida silvestre y criados en granjas. Sus resultados evidenciaron variaciones en la composición de los microbiomas entre ambos grupos. A pesar de las diferencias, se observó una estructura central dominada por filos como Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacterias, que, aunque más comunes en mamíferos, también se presentan en cocodrilos.

2. 10. 2. Impacto de la anorexia en la microbiota de cocodrilos

Lin et al. (2019) emplearon secuenciación de nueva generación para explorar la microbiota en cocodrilos de la especie *Crocodylus siamensis*, tanto en individuos sanos como en aquellos con anorexia. Descubrieron que la diversidad microbiana en cocodrilos anoréxicos es menor que en individuos saludables. Cambios específicos en la composición bacteriana se observaron en ambos grupos, incluyendo la abundancia diferencial de varias especies. Además, funciones microbianas relacionadas con el metabolismo y la transducción de señales se vieron afectadas en cocodrilos anoréxicos.

2. 10. 3. Exploración de la microbiota en cocodrilos de agua salada

Willson et al. (2019) caracterizaron la microbiota en cocodrilos de agua salada (*Crocodylus porosus*) destinados a uso comercial. Encontraron similitudes notables en la composición bacteriana con cocodrilos de agua dulce. La alta abundancia de bacterias "patógenas", sin consecuencias aparentes para la salud del huésped, plantea interrogantes intrigantes y sugiere investigaciones futuras sobre las interacciones entre el microbioma y el sistema inmunológico del huésped.

2. 10. 4. Impacto de la hibernación en el microbioma de caimanes chinos

Los trabajos de Tang et al. (2019) se centraron en los efectos de la hibernación en la microbiota del caimán chino (*Alligator sinensis*). Identificaron fluctuaciones estacionales significativas en la composición, estructura y funciones del microbioma en cocodrilos que hibernan en comparación con los activos. Los filos Proteobacteria, Bacteroidota y Firmicutes dominaron el core de la microbiota en ambas fases.

2. 10. 5. Potencial antitumoral de la microbiota intestinal en cocodrilos

Khan et al. (2021) aislaron y caracterizaron bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de *Crocodylus porosus* y evaluaron la actividad antitumoral de metabolitos secundarios producidos por estas bacterias. Sus hallazgos indicaron que los metabolitos secundarios provenientes de la microbiota intestinal de estos cocodrilos presentan actividad antitumoral contra diversos linajes de células cancerígenas.

2. 10. 6. Diferencias en la microbiota en caimanes chinos juveniles y adultos

Mediante secuenciación del gen 16S ARNr, Hu et al. (2022) caracterizaron la composición taxonómica de la microbiota en caimanes chinos adultos y juveniles. Sus resultados destacaron diferencias en los filos más abundantes entre ambos grupos. Además, observaron que el sexo influye en la composición de la microbiota en los caimanes juveniles, pero no en los adultos.

En conjunto, estos estudios han revelado la diversidad y adaptabilidad del microbioma intestinal en especies de cocodrilos. La influencia de factores como la dieta, la salud, la actividad y el entorno en la composición y función del microbioma proporciona una visión integral de la compleja relación entre estos reptiles y sus microorganismos intestinales.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tracto gastrointestinal (TGI) de los cocodrilos alberga una comunidad bacteriana diversa y única que desempeña un papel esencial en la salud y el funcionamiento de estos reptiles. Aunque los estudios sobre la microbiota en mamíferos y aves han proliferado en los últimos años, la investigación en torno a la comunidad bacteriana en el TGI de los cocodrilos ha sido limitada y subestimada en comparación con otros grupos taxonómicos.

Los cocodrilos son depredadores ancestrales que han sobrevivido a lo largo de millones de años en una variedad de hábitats, desde ríos hasta humedales. A medida que estas especies interactúan con su entorno, se enfrentan a microorganismos diversos y condiciones ambientales cambiantes que probablemente influyan en la composición y la función de su microbiota intestinal. Sin embargo, la comprensión de cómo estas bacterias interactúan con sus anfitriones y se adaptan a sus nichos ecológicos específicos es aún incipiente.

La ecología microbiana del TGI en cocodrilos se enfrenta a preguntas fundamentales que requieren respuestas sólidas. ¿Cómo se forma y varía la comunidad bacteriana en el TGI de diferentes especies de cocodrilos en respuesta a factores ambientales y biológicos? ¿Cuál es el papel de la microbiota en la salud y la resistencia a enfermedades en estos reptiles? Además, a medida que los cocodrilos se enfrentan a amenazas como la pérdida de hábitat y el cambio climático, es crucial comprender cómo estos factores impactan en su microbioma y cómo estos cambios pueden tener efectos cascada en su ecología y supervivencia.

La investigación sobre la comunidad bacteriana en el TGI de los cocodrilos no solo aporta conocimiento fundamental sobre la ecología microbiana y la biología de estos reptiles, sino que también tiene aplicaciones en la conservación y el manejo de especies amenazadas. Una comprensión más profunda de la microbiota podría ayudar a identificar indicadores de salud

en poblaciones silvestres y cautivas, y potencialmente informar prácticas de manejo y cuidado.

En el panorama científico actual, existe una oportunidad inexplorada para investigar la comunidad bacteriana en el TGI de los cocodrilos desde una perspectiva integral, considerando tanto los aspectos ecológicos como los biológicos y evolutivos. A través de una combinación de técnicas de secuenciación de próxima generación y enfoques funcionales, esta tesis de maestría tiene como objetivo llenar este vacío de conocimiento, revelando la diversidad, función y dinámica de la microbiota en el TGI de los cocodrilos y su importancia en la ecología de estos icónicos reptiles.

Pregunta de Investigación:

La pregunta central que orienta esta tesis de maestría es: ¿Cuál es la composición, función y variabilidad de la comunidad bacteriana en el tracto gastrointestinal de *C. acutus*, tomando en cuenta variables como el estadio del desarrollo, el sitio anatómico del TGI y el sexo de los ejemplares?

IV. JUSTIFICACIÓN

La investigación del microbioma en vertebrados es esencial para comprender su papel en las actividades fisiológicas del hospedero y la coexistencia de estas poblaciones microbianas a lo largo del tiempo. Los cocodrilos, como saurópsidos con una historia evolutiva de 85 millones de años, presentan un modelo biológico excepcional para explorar el microbioma del tracto gastrointestinal (TGI). Este enfoque puede arrojar luz sobre la historia evolutiva de la filosisimbiosis en arcosaurios y proporcionar conocimientos sobre cómo la microbiota del TGI ha coevolucionado con su hospedero.

La peculiaridad de los cocodrilos como especies con determinación de sexo dependiente de la temperatura, en lugar de cromosomas sexuales, ofrece una oportunidad única para estudiar cómo el dimorfismo sexual influye en la composición del microbioma del TGI en especies como *C. acutus*.

Este trabajo también puede establecer una base sólida para futuras investigaciones centradas en los metabolitos secundarios producidos por las bacterias del TGI de cocodrilos. La presencia de metabolitos con potencial terapéutico, como actividad antitumoral o antimicrobiana, podría ser de gran relevancia médica y farmacológica. Además, la falta de conocimiento sobre la diversidad y función de las comunidades microbianas en el TGI del cocodrilo americano resalta la importancia de esta investigación como una primera exploración de la estructura y diversidad bacteriana en esta especie.

En conjunto, esta tesis se propone no solo avanzar en la comprensión del papel del microbioma en los cocodrilos, sino también abrir nuevas perspectivas en la evolución, biología y aplicaciones terapéuticas derivadas de las interacciones entre las comunidades microbianas y los vertebrados.

V. HIPÓTESIS

El sexo, el estadio de desarrollo, y el sitio anatómico influyen en la composición y función de las comunidades bacterianas del tracto gastrointestinal de *C. acutus*.

VI. OBJETIVOS

6. 1. Objetivo general

Caracterizar la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas que comprende la microbiota gastro-intestinal de *Crocodylus acutus* mediante análisis metagenómicos.

6. 2. Objetivos específicos

1. Identificar la microbiota intestinal de *C. acutus*.
2. Determinar diferencias en la microbiota intestinal de acuerdo al sexo, el estadio del desarrollo y el sitio anatómico.
3. Predecir perfiles funcionales del microbioma intestinal de *C. acutus*.

VII. METODOLOGÍA

7. 1. Selección del área de muestreo: Cocodrilera "Santa María"

En este proyecto, se eligió la Cocodrilera "Santa María" como el área de muestreo en el estado de Sinaloa, México. Las coordenadas son $25^{\circ} 5'57.17''N$ $108^{\circ} 3'24.09''O$ (Figura 3). Este cocodrilaro controlado, situado a 2 km del pueblo La Reforma, Angostura, es un hábitat adecuado para la especie *Crocodylus acutus* en cautiverio. Ofrece un entorno seguro y accesible para la investigación. La selección se basó en su relevancia para el estudio, su manejo ético y en colaboración con personal especializado. El cocodrilaro es vital para obtener datos confiables y valiosos para la investigación científica.

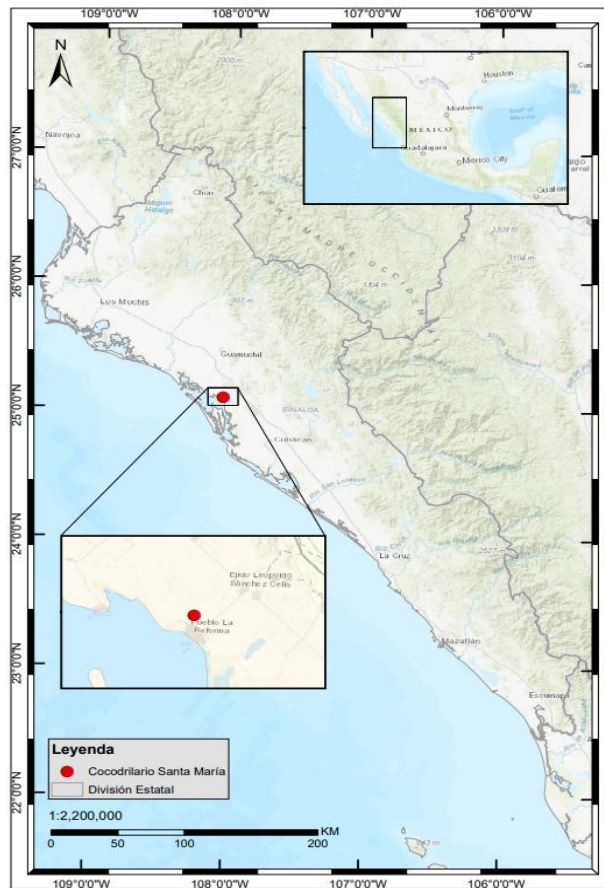


Figura 3. Cocodrilaro "Santa María". Ubicación geográfica del cocodrilaro "Santa María", en La Reforma, Angostura con $25^{\circ} 5'57.17''N$ $108^{\circ} 3'24.09''O$ (Por Google earth INEGI, 2022).

7. 2. Tipo de estudio y selección de muestra

El enfoque metodológico de esta investigación se caracterizó por ser de naturaleza exploratoria, descriptiva, transversal y observacional. El objetivo principal radicó en la observación detallada y la descripción de la diversidad bacteriana, un fenómeno central en el microbioma intestinal de la especie *Crocodylus acutus*. Se inscribe en un diseño transversal, donde la evaluación se llevó a cabo en un único momento, evitando análisis a lo largo del tiempo y enfocándose en un punto específico.

7. 3. Tipo de muestreo: conveniencia

La elección del método de muestreo recae en la conveniencia, un enfoque que se adapta a la captura de especímenes de *Crocodylus acutus* en cautiverio. Este tipo de muestreo, guiado por la viabilidad logística y el acceso a los individuos, permitió obtener datos representativos para el estudio en cuestión. La consideración de factores como la ubicación geográfica, la facilidad de captura y la colaboración con entidades especializadas aseguran la calidad y relevancia de los resultados obtenidos.

7. 4. Selección de individuos y tamaño de la muestra

La selección de individuos se realizó en el sitio de muestreo, capturando un total de 27 ejemplares de *Crocodylus acutus*. De esta población, se distinguen 10 individuos en etapa juvenil y 17 adultos. Cada uno de estos cocodrilos aportó dos muestras destinadas al análisis metagenómico. Estas muestras son la Muestra de Cavidad Cloacal (MC) y la Muestra de Cavidad Oral (MO). En consecuencia, se conformó una muestra total de tamaño "n" igual a 54, considerando la multiplicación de los 27 individuos por las dos muestras obtenidas de cada especie.

7. 5. Selección y evaluación de muestras

Para asegurar la integridad y validez de los resultados, se establecieron criterios rigurosos tanto para la inclusión como para la exclusión y eliminación de muestras en este estudio exhaustivo de *Crocodylus acutus*.

7. 5. 1. Criterios de inclusión

La selección de muestras se orienta hacia la inclusión de aquellas que cumplan con condiciones específicas que garantizan la representatividad y pertinencia de los datos recolectados. Para ser consideradas en el análisis, las muestras deben satisfacer los siguientes criterios:

7. 5. 1. 1. Origen preciso

Las muestras fueron obtenidas exclusivamente de la cavidad cloacal y cavidad oral de *Crocodylus acutus*. Estas dos ubicaciones son de interés primordial debido a su importancia en el estudio del microbioma y su relevancia para la comprensión del ecosistema microbiano presente en el cocodrilo.

7. 5. 2. Criterios de exclusión

La calidad y confiabilidad de los datos son esenciales en la investigación científica, lo que conlleva a la necesidad de establecer criterios rigurosos para la exclusión de ciertas muestras que no cumplieron con los estándares requeridos:

7. 5. 2. 1. Fuente inadecuada

Se excluyeron aquellas muestras que no se originen específicamente en la cavidad cloacal o cavidad bucal de *Crocodylus acutus*, ya que no reflejarían el enfoque del estudio en estas áreas anatómicas específicas.

7. 5. 3. Criterios de eliminación

Para garantizar la integridad de los resultados y la calidad de los datos obtenidos, se aplicaron criterios de eliminación que aseguraron la validez de las muestras procesadas:

7. 5. 3. 1. Contaminación indicativa

Se eliminaron muestras que mostraron señales de contaminación debido a una mala toma de muestra. Porque la presencia de contaminantes podría distorsionar los resultados y conducir a conclusiones erróneas.

7. 5. 3. 2. Procesamiento inadecuado

Las muestras que no fueron procesadas de manera adecuada durante la fase experimental se eliminaron. La correcta manipulación y preservación de las muestras son cruciales para obtener datos confiables y precisos.

7. 5. 4. Captura y toma de medidas morfométricas

La captura de los ejemplares de cocodrilo (*Crocodylus acutus*) se llevó a cabo mediante una técnica de manipulación directa, cuyo procedimiento ha sido documentado con precisión (Domínguez-Laso et al., 2011). Esta técnica implica la utilización de un lazo de acero y una pértiga, combinados con cuerdas de tensión, para asegurar la sujeción óptima del animal en dos puntos cruciales: la cola y el hocico. La ejecución de este proceso fue guiada por un principio fundamental: evitar en todo momento el contacto con la mandíbula del cocodrilo. El lazo de acero fue hábilmente posicionado alrededor del cuello del cocodrilo, garantizando su captura segura y precisa (Figura 4).

Cada individuo capturado fue sometido a una serie de medidas morfométricas esenciales, con el propósito de recopilar información precisa para el análisis posterior. Dos medidas clave fueron tomadas:

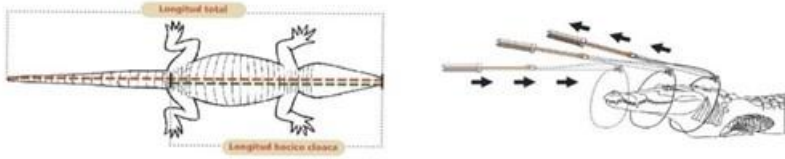


Figura 4. Método de captura y toma de medidas morfométricas. Modificado de Domínguez-Laso et al. (2011).

7. 5. 4. 1. Longitud Total (LT)

Esta medida se obtuvo desde el extremo del cráneo o la punta del hocico hasta el punto de inicio de la cloaca. Las mediciones se realizaron con una cinta métrica de alta precisión (0.1 mm), y se llevaron a cabo en posición de decúbito dorsal (vientre hacia arriba) para asegurar la exactitud.

7. 5. 4. 2. Longitud Hocico-Cloaca (LHC)

Se tomó la medida desde el extremo superior de la cloaca hasta el extremo superior del hocico. Esta medida también se realizó con la cinta métrica de alta precisión, siguiendo las indicaciones de Domínguez-Laso et al. (2011).

De acuerdo con la investigación previa de García-Grajales et al. (2007), la Longitud Total (LT) de los ejemplares de *Crocodylus acutus* se utilizó para su clasificación en dos categorías distintas:

Juveniles (30-90 cm)

Adultos (>180 cm)

7. 6. Toma de muestra cloacal y oral en *C. acutus*

En el presente estudio, se realizó una cuidadosa toma de muestras de *Crocodylus acutus* para un análisis detallado de su microbioma. Cada individuo capturado se consideró una fuente invaluable de información, y se obtuvieron dos tipos de muestras para un análisis exhaustivo: Muestra de Cavidad Cloacal (MC) y Muestra de Cavidad Oral (MO) (Figura 5).



Figura 5. Toma de muestra microbiológica.

7. 6. 1. Obtención de muestra de cavidad cloacal (MC) y oral (MO)

Se implementaron medidas meticulosas para garantizar la integridad y representatividad de las muestras de cavidad cloacal. Previamente al hisopado cloacal, se llevó a cabo un proceso de limpieza en la zona exterior de la cloaca de cada cocodrilo. Utilizando agua destilada estéril y torundas impregnadas con alcohol al 70%, se eliminaron posibles contaminantes externos. Este procedimiento fue esencial para asegurar que las muestras recolectadas reflejaran principalmente microorganismos autóctonos asociados a la cloaca, excluyendo la interferencia de microorganismos ambientales o transitorios (Colston et al., 2015).

La obtención de muestras de cavidad oral se realizó mediante un hisopado bucal con un enfoque riguroso en la asepsia. Utilizando hisopos estériles, se tomaron muestras

representativas de la microbiota oral de cada ejemplar. Cada hisopo, cuidadosamente manejado, se colocó en un medio de transporte adecuado para la preservación del ADN genómico bacteriano (ADNg), utilizando los medios proporcionados por Norgen Biotek Corp. (Cat. # 68800).

7. 6. 2. Preservación y transporte de muestras

Una vez recolectadas las muestras, se implementaron medidas para garantizar su preservación y evitar cualquier degradación. Las muestras fueron colocadas en una hielera previamente esterilizada, manteniendo una temperatura controlada entre 2-8 °C. Con un enfoque en la integridad de las muestras, se aseguró que las condiciones de temperatura y transporte fueran óptimas para mantener la estabilidad de los componentes microbiológicos.

7. 6. 3. Almacenamiento y análisis

Las muestras recolectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Las cuales, se mantuvieron en condiciones adecuadas de almacenamiento para preservar su integridad genómica. Al concluir el proceso de muestreo, las muestras preservadas fueron transportadas al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) con sede en Mazatlán, Sinaloa, México.

En el CIAD, las muestras se sometieron a análisis moleculares posteriores. Estos análisis incluyeron una serie de enfoques metodológicos avanzados, como la extracción y cuantificación de ADN genómico bacteriano (ADNg), que permitirían desentrañar la composición y diversidad microbiana en las muestras de cavidad cloacal y oral de *C. acutus*.

La ejecución precisa y cuidadosa de esta metodología garantizó que las muestras se mantuvieran libres de contaminación, preservando así la autenticidad de los datos microbiológicos obtenidos a lo largo del estudio.

7. 6. 4. Extracción de ADN genómico bacteriano

En la extracción del ADN genómico se utilizó el método basado en el buffer Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), tal como fue propuesto por Azmat et al. en 2012, con el objetivo de obtener ADN de alta calidad a partir de las muestras provenientes de la cloaca y cavidad oral de *Crocodylus acutus*.

El procedimiento consistió de una serie de etapas interrelacionadas, cada una diseñada para maximizar la eficiencia y la pureza del ADN extraído. La primera fase involucró la preparación de las muestras recolectadas, las cuales se depositaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL, asegurando un ambiente libre de contaminación. Para desencadenar la digestión enzimática, se añadió EDTA 0.5 M y lisozima, y se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. Una centrifugación breve de 2 min a 15,000 rpm permitió desechar el sobrenadante y retener la fracción celular de interés.

Posteriormente, se adicionó el buffer CTAB, seguido de la incorporación de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL. La mezcla se agitó cuidadosamente para asegurar una distribución uniforme de los reactivos. La digestión se llevó a cabo en un termoblock ajustado a 55 °C, permitiendo que las células se degraden de manera eficiente. Una vez que se alcanzó la digestión deseada, se procedió a la extracción del ADN mediante la adición de LiCl 5M y RNAsa, seguido de una mezcla con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). En esta etapa, la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se sometió a una centrifugación a 13,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se recogió y se

transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, constituyendo el material que contiene el ADN deseado.

La fase de precipitación y purificación del ADN es crucial para eliminar impurezas y contaminantes que podrían afectar la calidad de los resultados. Por lo que se agregó acetato de sodio 3 M pH 5.2 y etanol 100% frío a la solución, seguido de una incubación a -20 °C durante aproximadamente 1 h. A través de una centrifugación a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, el ADN sedimenta y se recuperó el sobrenadante, eliminando los componentes no deseados.

La fase final del proceso implicó la resuspensión del ADN sedimentado en etanol al 70%, seguido de una centrifugación a máxima velocidad durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet de ADN se dejó secar en una campana de flujo laminar, resguardado de contaminantes. Una vez seco, se añadió agua de 18Ω estéril para resuspender el pellet, generando una solución concentrada de ADN apta para análisis posteriores.

Cada muestra resultante fue almacenada a -20 °C, asegurando condiciones de conservación óptimas para futuros análisis y experimentos. El éxito de esta extracción de ADN genómico bacteriano radicó en su meticulosa ejecución y en el cumplimiento de cada paso con rigurosidad, garantizando la integridad del ADNg bacteriano.

7. 6. 5. Evaluación de concentración y pureza del ADN genómico bacteriano

Para asegurar la calidad de las muestras, se llevó a cabo una cuantificación utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11. Para este proceso, se colocó 1 µL de muestra en el espectrofotómetro para medir la relación 260/280 nm de absorbancia, que reveló tanto la concentración como la pureza del ADN. Un valor óptimo cercano a 1.8 indicó pureza y la absorbancia a 260 nm reflejó la concentración. Después de la evaluación, el ADN se ajustó

a una concentración de 20 ng/ μ L para la preparación de librerías y análisis subsiguientes. Este enfoque riguroso garantizó que las muestras fueran aptas para las etapas futuras de la investigación, respaldando así la calidad y precisión de los resultados obtenidos.

7. 7. Metodología para preparación de librerías y secuenciación metagenómica dirigida

Una vez ajustada la concentración de ADNg, se prepararon las librerías siguiendo el protocolo de Illumina *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (part # 15044223 Rev.B), la cual consistió de las siguientes etapas (Figura 6):

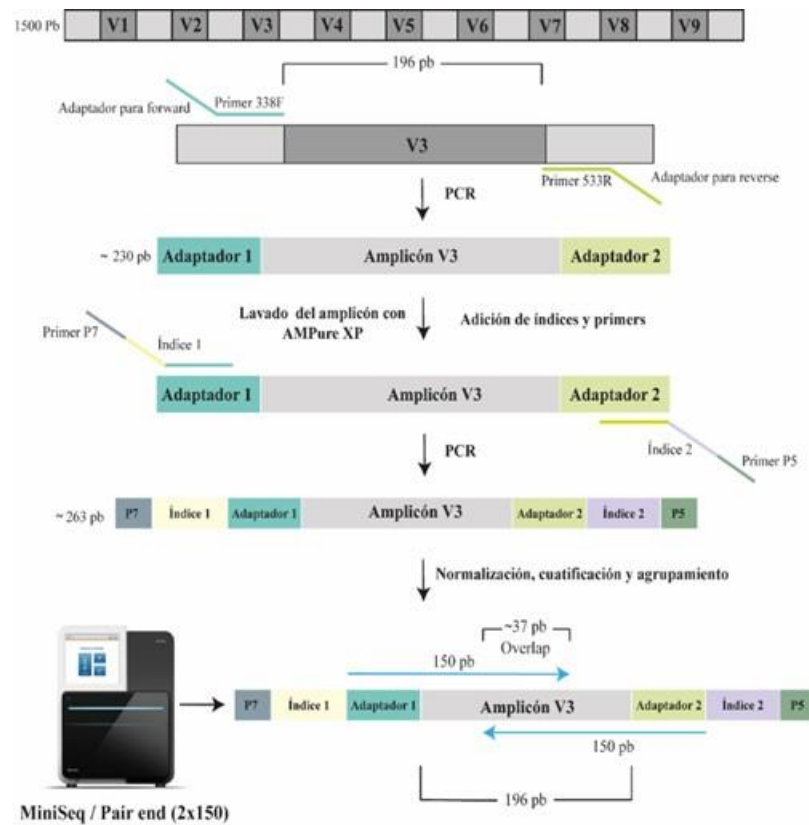


Figura 6. Diseño experimental para la fabricación de librerías y secuenciación.

Los primers utilizados para la amplificación y las condiciones de ambas PCR que fueron utilizadas en este estudio son descritas en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Detalles de las condiciones de amplificación y de los primers para la amplificación de V3.

Primers	Secuencia (5'-3')	Condiciones de PCR
16S-V3_338F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	95 °C 3 min, 30 × (95 °C 30 s, 60 °C
16S-V3_533R	TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 5min
Segunda PCR		
16S-V3_338F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	95 °C 3 min, 8 × (95 °C s, 55 °C 30
16S-V3_533R	TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	s, 72 °C 30 s), 72 °C 5min

7. 7. 1. Amplificación de la región V3 del Gen 16S mediante PCR

En esta etapa inicial, se realizó la amplificación de la región V3 del gen 16S del ARNr utilizando la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se emplearon los oligonucleótidos universales 16S-V3_338f y 16S-V3_533r junto con adaptadores Illumina, siguiendo el protocolo establecido por Huse et al. (2008). Esta etapa garantizó la selectividad de la región objetivo y proporcionó la base para el análisis de la diversidad bacteriana.

7. 7. 2. Adición de índices y primers, lavado con perlas magnéticas

Después de la amplificación, se procedió a la adición de índices y oligonucleótidos específicos (P5 y P7) a cada muestra. Además, se llevó a cabo un lavado utilizando perlas magnéticas AMPureXP para purificar y eliminar fragmentos no deseados, asegurando la calidad y pureza de las librerías resultantes.

7. 7. 3. Segunda PCR para formación de librerías

Se realizó una segunda PCR con el objetivo de generar las librerías finales de secuenciación. Esta etapa implicó la amplificación de los productos de la primera PCR, asegurando una cantidad suficiente de material genético para el proceso de secuenciación. Este paso fue crucial para obtener una cantidad adecuada de ADN para la secuencia posterior.

7. 7. 4. Normalización, cuantificación y agrupamiento de librerías

Una vez completada la segunda PCR, se cuantificaron las librerías resultantes utilizando el kit Quantification Assay de Thermo Scientific en un fluorómetro Qubit. Las librerías se agruparon en un pool equimolar y se ajustaron a una concentración de 4 nM. Luego, se realizó una dilución adicional del pool equimolar a 2 pM para garantizar una distribución uniforme de las muestras en la secuenciación.

7. 7. 5. Secuenciación en secuenciador MiniSeq

La secuenciación se realizó utilizando el kit Mid-output Flow cell de 300 ciclos de Illumina. Este kit permite secuenciar de extremos pareados (pair-end 2x150), lo que brindó una cobertura más amplia de la región V3 del gen 16S. La secuencia resultante proporcionó datos valiosos para el análisis de la diversidad bacteriana y la composición del microbioma.

7. 8. Análisis de calidad y filtrado de secuencias para metagenómica dirigida

7. 8. 1. Pre-procesamiento y análisis inicial

Las secuencias obtenidas del secuenciador se sometieron a un proceso de pre-procesamiento y análisis inicial utilizando la tubería de nf-core/ampliseq (Straub et al., 2020). Esto incluyó la eliminación de oligonucleótidos y un análisis de calidad y tamaño de las secuencias utilizando las herramientas Cutadapt y FastQC (Andrews, 2010; Martin, 2011). Posteriormente, se llevó a cabo un procesamiento directo basado en la calidad de las secuencias utilizando el software Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) (Callahan et al., 2016).

7. 8. 2. Medidas de control de calidad inicial

Se aplicaron medidas de control de calidad para garantizar la fiabilidad de los resultados:

- Eliminación de secuencias cortas (< 130 pb).

- Descarte de secuencias con valor Phred menor a 30 ($QC < 30$).
- Eliminación de quimeras.
- Exclusión de secuencias sin complementariedad perfecta con los primers.
- Descarte de secuencias con nucleótidos indeterminados.

7. 8. 3. Fusión de lecturas y generación de variantes

Después del filtrado y recorte, las lecturas de 130 pb en ambas direcciones (forward y reverse) se fusionaron para obtener una secuencia única por muestra. Esta fusión facilitó el análisis subsiguiente de asignación taxonómica. Se generaron variantes de secuenciación de amplicones (ASV) utilizando el software DADA2, en lugar de unidades operativas taxonómicas (OTUs), para un análisis más preciso y detallado (Callahan et al., 2017; Schloss, 2021).

7. 8. 4. Generación de base de datos y asignación taxonómica

Se creó una base de datos específica de la región V3 del gen 16S ARNr utilizando el software RESCRIPt. Esta base se entrenó utilizando como referencia la base datos de secuencias SILVA SSU Ref NR 99 versión 138.1 y los oligonucleótidos utilizados en el estudio (Pruesse et al., 2007; Quast et al., 2013; Robeson et al., 2021). Las secuencias procesadas se clasificaron taxonómicamente utilizando el comando *qiime feature-classifier classify-sklearn* de QIIME2, utilizando la base de referencia específica generada (Bolyen et al., 2019; Quast et al., 2013).

7. 9. Análisis de diversidad microbiana

7. 9. 1. Evaluación de cobertura y normalización

Se evaluó la cobertura de la comunidad microbiana original mediante análisis de rarefacción basados en el número de lecturas obtenidas. Las lecturas asignadas a cada ASV se

normalizaron con el número máximo de secuencias de todas las muestras. Esto permitió equilibrar la retención de secuencias sin excluir muestras con menor número de lecturas.

7. 9. 2. Cálculo de Índices de Diversidad Alfa

Se calcularon índices de diversidad alfa, como Shannon, Simpson, Chao1 y Pielou, en QUIIME2 utilizando la matriz de datos normalizados. Se empleó la prueba estadística de H de Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre grupos (Bolyen et al., 2019).

7. 9. 3. Análisis de Diversidad Beta

Se realizaron análisis multivariados para analizar similitudes y diferencias en la composición microbiana entre grupos. Se ejecutaron análisis de coordenadas principales (PCoA) y escalado multidimensional no métrico (NDMS) basados en la matriz de distancia generada por UniFrac. Se utilizaron pruebas estadísticas de análisis de varianza múltiple por permutaciones (PERMANOVA) y análisis de similitudes (ANOSIM) con 999 permutaciones para determinar diferencias entre grupos.

7. 9. 4. Identificación de taxones bacterianos significativos

Se aplicó el análisis discriminante lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para identificar taxones bacterianos con diferencias significativas en su abundancia entre grupos. Este análisis se realizó utilizando la herramienta en línea Galaxy Lefse Workflow, que implementa la última versión del algoritmo LEfSe (https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root?tool_id=lefse_upload).

7. 10. Predicción de perfiles funcionales de la microbiota

7. 10. 1. Uso de Software PICRUST2

Para la predicción de perfiles funcionales de la microbiota en los grupos de *C. acutus*, se empleó el software PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by

Reconstruction of Unobserved States). Se utilizó el plugin PICRUST2 dentro de QIIME2 para llevar a cabo este análisis (Bolyen et al., 2019; Douglas et al., 2020).

7. 10. 2. Análisis de abundancia de genes ortológicos (KO)

Los resultados generados a partir de PICRUST2, que incluyen las abundancias de los genes ortólogos (KO) predichos, se exportaron a RStudio para su análisis posterior. En esta etapa, se utilizó la paquetería ggpicrust2 para convertir y anotar los genes ortólogos a rutas metabólicas y vías biológicas. Estas rutas y vías están catalogadas y organizadas de acuerdo a la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al., 2023; Yang et al., 2023).

7. 10. 3. Análisis de abundancia diferencial

Para evaluar las diferencias en los perfiles funcionales entre los grupos, se realizó un análisis de abundancia diferencial. Este análisis se llevó a cabo utilizando el método ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx2) (Fernandes et al., 2014). ALDEx2 es una herramienta que permite identificar diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de genes y funciones entre grupos.

Este proceso integral de predicción de perfiles funcionales involucró el uso de herramientas avanzadas de bioinformática y análisis estadístico para obtener una comprensión más profunda de las capacidades metabólicas y las vías biológicas presentes en la microbiota de *C. acutus* en los diferentes grupos estudiados.

7. 11. Lugar de realización

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología y Biología Aplicada de la Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa y en el Laboratorio de Genómica

Microbiana perteneciente al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), con sede en Mazatlán, Sinaloa, México.

7. 12. Financiamiento

El proyecto fue financiado por los directores pertenecientes al Cuerpo Académico Ecología Molecular y Biotecnología (UAS-CA-298). El número de beca del alumno otorgado por CONAHCYT es el siguiente:1148188.

VIII. RESULTADOS

8. 1. Captura y medidas morfométricas

En el proceso de captura y toma de medidas morfométricas, se logró capturar un total de 27 individuos de *Crocodylus acutus*, y se colectó muestras tanto de cloaca como de cavidad oral, obteniendo un total de 54 muestras. Estos individuos se distribuyeron en dos categorías principales: juveniles (10 individuos) y adultos (17 individuos), según sus medidas morfométricas (Cuadro 2). Es importante destacar que, dentro del grupo de cocodrilos adultos, se realizó una determinación precisa del sexo, revelando que, de los ejemplares capturados, 10 eran hembras y 7 eran machos. Todos los cocodrilos adultos presentaban un rango de edad homogéneo, estimado en 11 años.

Cuadro 2. Datos morfométricos de individuos de *C. acutus* en cautiverio.

Ejemplar	Etiqueta	Dimensiones generales		Sexo	Peso (kg)	Edad (años)	Fecha de captura
		LT (cm)	LHC (cm)				
Cocodrilos adultos							
1	UCA_AF_01	214	101	F		11	03/06/2022
2	UCA_AF_02	277	153	F		11	03/06/2022
3	UCA_AF_03	252.5	135	M	75	11	03/06/2022
4	UCA_AF_04	224.5	112.3	M	110.4	11	03/08/2022
5	UCA_AF_05	228.5	123.4	F	69.1	11	12/11/2022
6	UCA_AF_06	269	139.5	M	90	11	12/11/2022
7	UCA_AF_07	200	105	F	35	11	12/11/2022
8	UCA_AF_08	208.5	108.5	F	35.4	11	12/11/2022
9	UCA_AF_09	269.2	147	M		11	09/12/2022
10	UCA_AF_10	282.2	151	M		11	09/12/2022
11	UCA_AW_01	176.5	84.7	F	21.1	11	19/01/2023
12	UCA_AW_02	155.6	31	F	12.9	11	19/01/2023
13	UCA_AW_03	181	95.5	M	21.4	11	19/01/2023
14	UCA_AW_04	162	85.7	F	14.8	11	19/01/2023
15	UCA_AW_05	131.4	71	M	7.4	11	19/01/2023
16	UCA_AW_06	149	77	F	11.7	11	19/01/2023
17	UCA_AW_07	189	101	F	25.2	11	19/01/2023
Cocodrilos Juveniles							
1	UCA_JF_01	34	17		.150	1	03/08/2022
2	UCA_JF_02	36	19		.160	1	03/08/2022
3	UCA_JF_03	34.5	16.5		.140	1	03/08/2022
4	UCA_JF_04	31.5	16		.900	1	03/08/2022
5	UCA_JF_05	36	18		.150	1	03/08/2022
6	UCA_JF_06	33	17		.110	1	03/08/2022
7	UCA_JF_07	31	16.5		.130	1	03/08/2022
8	UCA_JF_08	28	19.5		.700	1	03/08/2022
9	UCA_JF_09	38.5	19.5		.200	1	03/08/2022
10	UCA_JF_10	34.5	17.5		.120	1	03/08/2022

8. 2. Secuenciación y procesamiento de datos

En el proceso de secuenciación, se generó un conjunto de datos compuesto por un total de 2,645,334 lecturas pareadas sin procesar a partir de las 54 muestras sometidas a secuenciación. Después de un riguroso proceso de procesamiento y filtrado, se logró obtener una colección de 1,319,228 lecturas limpias y de alta calidad, con una calidad de base superior a Q30. Este conjunto de lecturas procesadas exhibió un promedio de 24,499 lecturas por muestra, asegurando así la confiabilidad y robustez de los resultados.

8. 3. Caracterización bacteriana a nivel de género

A través de un minucioso análisis, se realizó una clasificación jerárquica que permitió la identificación de 1,388 Variantes de Secuenciación de Amplicones (ASV) hasta el nivel taxonómico de género. Esta caracterización taxonómica proporcionó una visión detallada de la composición microbiana presente en las muestras estudiadas. La información resultante se encuentra detallada en el Cuadro 3, permitiendo comprender la diversidad y abundancia de géneros bacterianos presentes en la microbiota de *Crocodylus acutus*.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de ASV por taxa.

Nivel jerárquico	Taxa
Filo	38
Clase	99
Orden	220
Familia	379
Género	652
ASV	1388

8. 4. Diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal de *C. acutus* a través de la secuenciación del gen 16S ARNr

8. 4. 1. Composición filogenética y abundancia de filos bacterianos

Se logró una caracterización exhaustiva de la diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal de *Crocodylus acutus* a través de la secuenciación del gen 16S ARNr. Un total de 38 filos bacterianos se identificaron en las 54 muestras analizadas, de individuos de cautiverio. De estos, 9 filos presentaron abundancias superiores al 1% (Figura 7), lo que resalta la importancia de su presencia en la comunidad microbiana.

El filo más predominante en todos los grupos fue Proteobacteria, mostrando altas abundancias relativas promedio tanto en las muestras orales (68.10 y 57.44%) como en las cloacales (53.50 y 36.84%) de individuos juveniles y adultos en cautiverio, respectivamente. Sin embargo, a medida que se profundizó en la distribución de los filos, surgieron diferencias notables. Firmicutes se destacó como el segundo filo más abundante en muestras cloacales tanto de juveniles (MCS) como de adultos (MCA), con abundancias relativas promedio de 22.79 y 24.88%, respectivamente. En contraste, las muestras orales de juveniles (MOS) y adultos (MOA) presentaron un segundo filo dominante, Actinobacteriota, con abundancias relativas promedio de 13.47 y 16.97%, respectivamente.

El tercer filo más preponderante fue Bacteroidota en MCA (11.57%) y en MOS (8.25%) y MOA (6.23%). En el caso de las muestras cloacales de cocodrilos juveniles (MCS), el filo Fusobacteriota se manifestó con una presencia significativa del 11.89%. Es digno de mención que el filo Synergistota, con una abundancia superior al 1%, estuvo exclusivamente presente en muestras cloacales de adultos, con una abundancia relativa promedio del 8.40%.

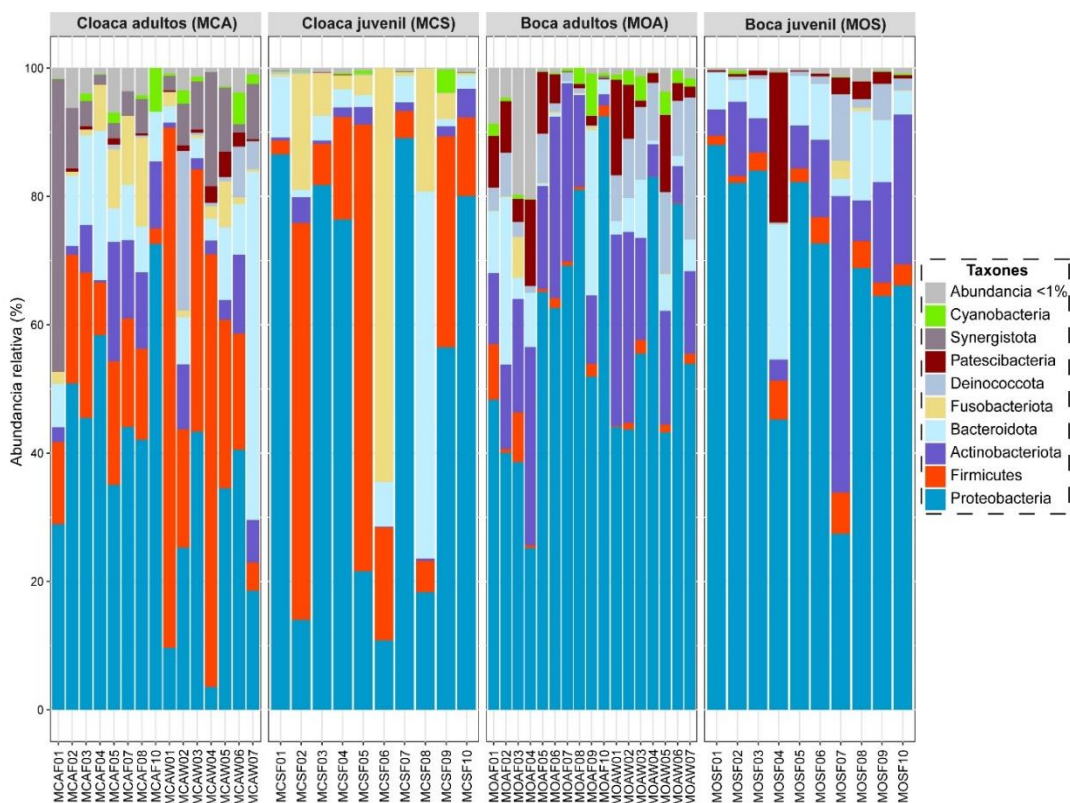


Figura 7. Gráfica de barras apiladas de los 9 filos bacterianos dominantes en muestras de cloaca y cavidad oral de *C. acutus*. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para aquellos filos >1% en cada muestra. El código de color indica la familia correspondiente.

8. 4. 2. Abundancia a nivel de familia y análisis de agrupamiento

A nivel de familia, se clasificaron 379 familias, de las cuales 22 familias presentaron abundancias mayores al 1%, representando el 75% de las secuencias totales clasificadas (Figura 8). Para MCA, las familias Neisseriaceae (15.70%), las familias no clasificadas del complejo Peptostreptococcales-Tissieralles (13.41%) y Synergistaceae (8.40%) dominaron en abundancia. En el caso de MCS, las familias Neisseriaceae (44.97%), las familias del orden Desulfitobacteriales (12.91%) y Fusobacteriaceae (11.84%) mostraron las mayores abundancias relativas promedio.

En MOA, las familias más abundantes incluyeron Rhodobacteraceae (27.28%), Moraxellaceae (9.72%) e Intrasporangiaceae (6.35%). Por otro lado, en MOS, las familias

más prominentes fueron Neisseriaceae (28.15%), Comamonadaceae (17.42%) y Moraxellaceae (10.06%).

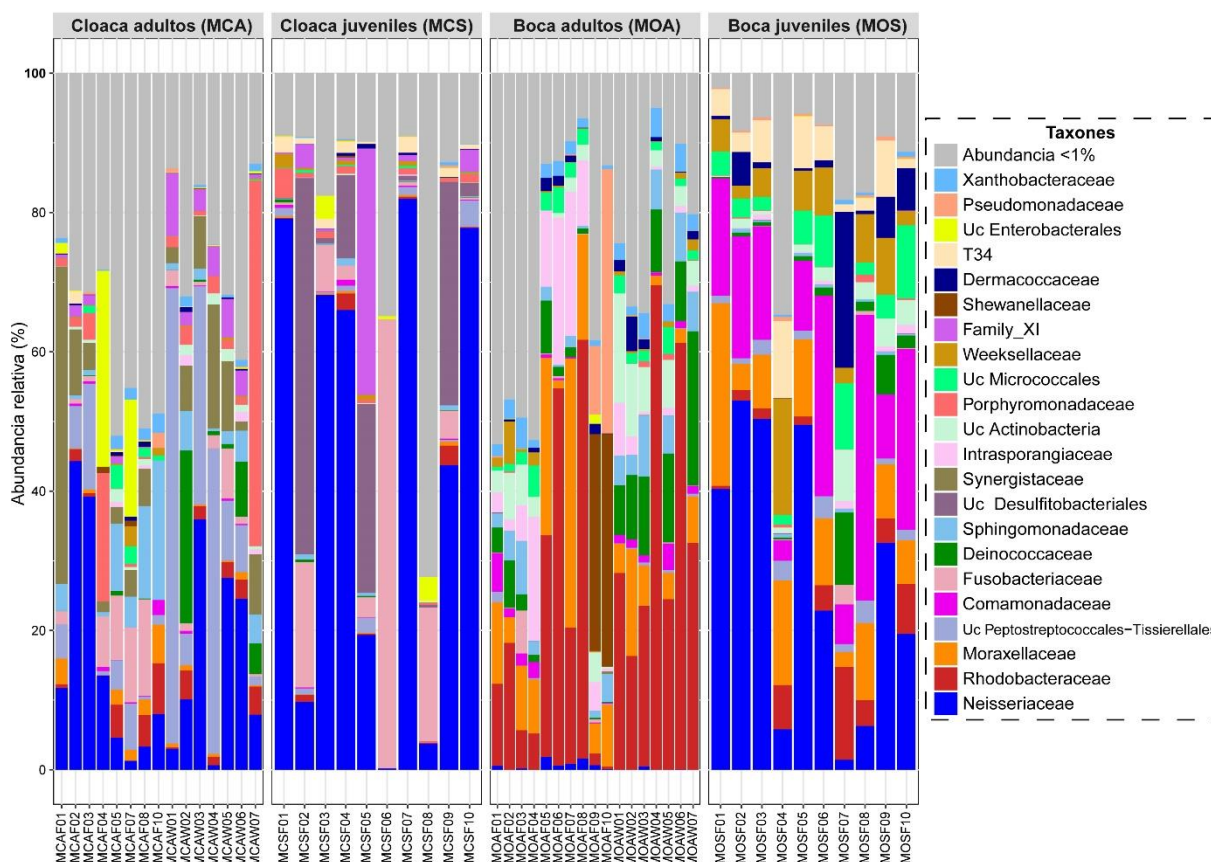


Figura 8. Gráfica de barras apiladas de las 22 familias bacterianas dominantes en muestras de cloaca y cavidad oral de *C. acutus*. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para aquellas familias >1% en cada muestra. El código de color indica la familia correspondiente.

El análisis de perfiles de composición microbiana a nivel de familia permitió generar dos dendrogramas explicativos de los patrones de agrupamiento tanto de los grupos como de las familias bacterianas con abundancias mayores al 1% (Figura 9). El dendrograma superior con una correlación cofenética de 0.7556 destacó cuatro grupos principales derivados de dos nodos principales. El nodo izquierdo representó los grupos I y II, compuestos por muestras cloacales de juveniles (MCS) y principalmente de adultos (MCA), respectivamente. El nodo

derecho agrupó las muestras orales, con el grupo III que contenía muestras orales de juveniles (MOS) y el grupo IV con muestras orales principalmente de adultos (MOA).

El dendrograma izquierdo, con una correlación cofenética de 0.9895, detalló los agrupamientos de las familias en función de su abundancia en los grupos mencionados anteriormente. Por ejemplo, las familias Fusobacteriaceae, Peptostreptococcales-Tissieralles, Synergistaceae, familias del orden Desulfitobacteriales, Familia XI y Porphyromonadaceae se agruparon predominantemente en el clúster I, compuesto por las muestras cloacales de cocodrilos adultos (MCA) y juveniles (MCS).

Por otra parte, el segundo clúster conformado por las familias Intrasporangiaceae, Sphingomonadaceae, Xanthobacteraceae, Deinococcaceae, y familias no clasificadas de la clase Actinobacteria, presentó una incidencia alta principalmente en los grupos I y IV representados por muestras cloacales y orales de cocodrilos adultos.

En cambio, el grupo III y IV pertenecientes a MOA y MOS, es relacionado con el tercer clúster, el cual está conformado por las familias Moraxellaceae, familias del orden Micrococcales, Dermacoccaceae, Comamonadaceae, Weeksellaceae y la familia T34.

El 4to clúster fue representado por las familias más abundantes, primeramente, la familia Rhodobacteraceae presentó una alta incidencia en muestras orales de adultos y una incidencia moderada en muestras orales de juveniles y, por último, la familia Neisseriaceae presentó altas incidencias en los grupos I, II y III.

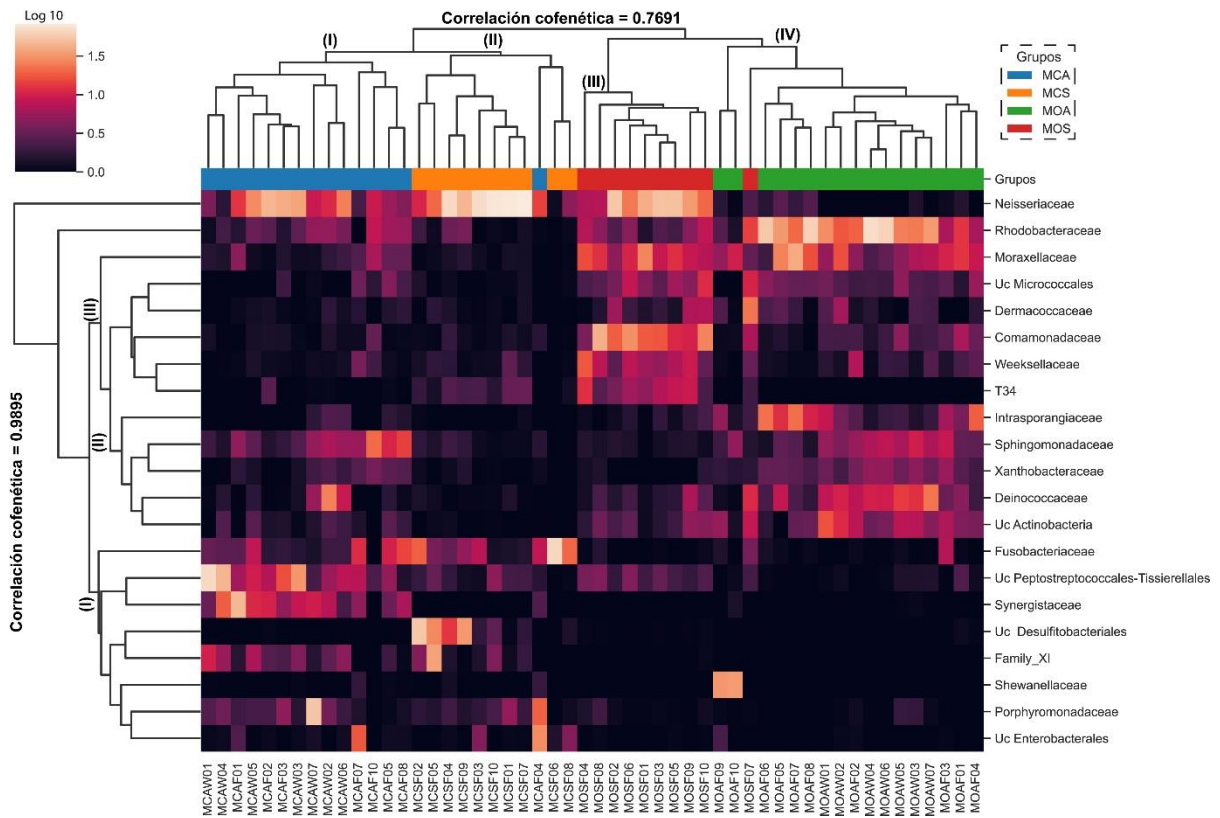


Figura 9. Agrupamiento jerárquico UPGMA a dos vías con mapa de calor de las abundancias relativas a nivel familia. Mapa de calor agrupado jerárquicamente a nivel de familias con abundancias mayores al 1% donde las denominaciones “MCA” y “MCS” corresponden a muestras de cloacas de adultos y juveniles respectivamente y denominaciones con “MOA” y “MOS”, corresponden a muestras orales de adultos y juveniles. El dendrograma lateral izquierdo agrupa a las familias en función de su abundancia. El dendrograma superior agrupa a las muestras de cloaca y cavidad oral de acuerdo a su composición bacteriana. La escala de color superior izquierda indica la abundancia relativa normalizada. Los índices de correlación cofenética se muestran en cada dendrograma.

8. 5. Comparación de comunidades bacterianas en el TGI de *C. acutus*

8. 5. 1. Suficiencia del muestreo y cobertura bacteriana

La calidad y extensión del muestreo se evaluaron mediante curvas de rarefacción por muestra, donde se observó una tendencia clara de saturación en todas las curvas, indicando que los esfuerzos de muestreo fueron apropiados (Figura 10). Estas curvas revelaron una inclinación distintiva alrededor de las profundidades de secuenciación de 2,500 a 5,000, con

una progresión gradual en el número de muestras hasta alcanzar la asíntota. Esta alcanzó valores en el rango de 10,000 a 15,000 lecturas por muestra, asegurando una cobertura óptima de la microbiota bacteriana en el TGI de *C. acutus*.

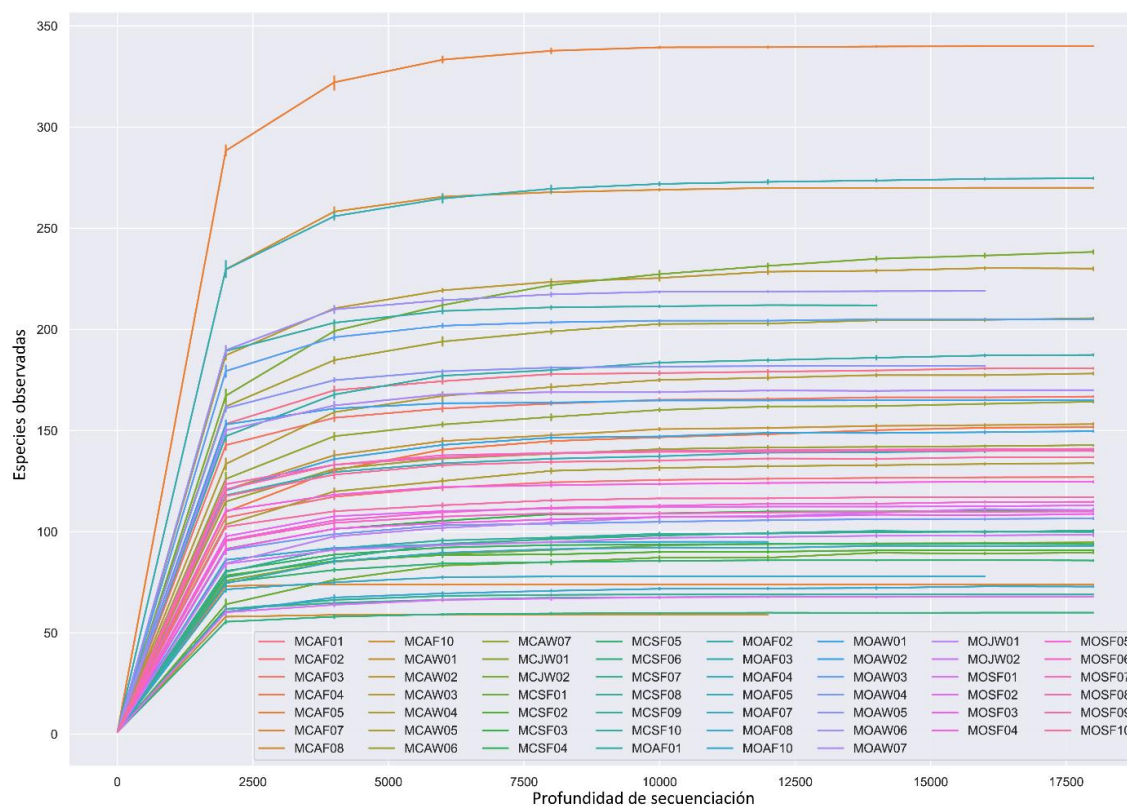


Figura 10. Curvas de rarefacción de en muestras de cloaca y cavidad oral de *C. acutus*. Un código de color identifica la curva correspondiente a cada muestra. MCA = Muestras cloacales adultos, MCS = Muestras cloacales juveniles, MOA = Muestras orales adultos y MOS = Muestras orales juveniles.

8. 5. 2. Diversidad microbiana y estimación de métricas

Se emplearon métricas de diversidad (Shannon y Simpson) para evaluar la variedad de especies bacterianas en las muestras de cloaca y cavidad oral de *C. acutus*. Los grupos que presentaron la mayor diversidad fueron los cocodrilos adultos (MCA y MOA), seguidos por el grupo MOS, que comprende las muestras orales en individuos juveniles. Contrariamente, el grupo MCS exhibió la menor diversidad, y se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con los demás grupos (Figura 11). Estas diferencias estadísticas

subrayan la variabilidad inherente entre los grupos, lo que sugiere que factores como la edad y la ubicación ejercen influencia sobre la composición bacteriana.

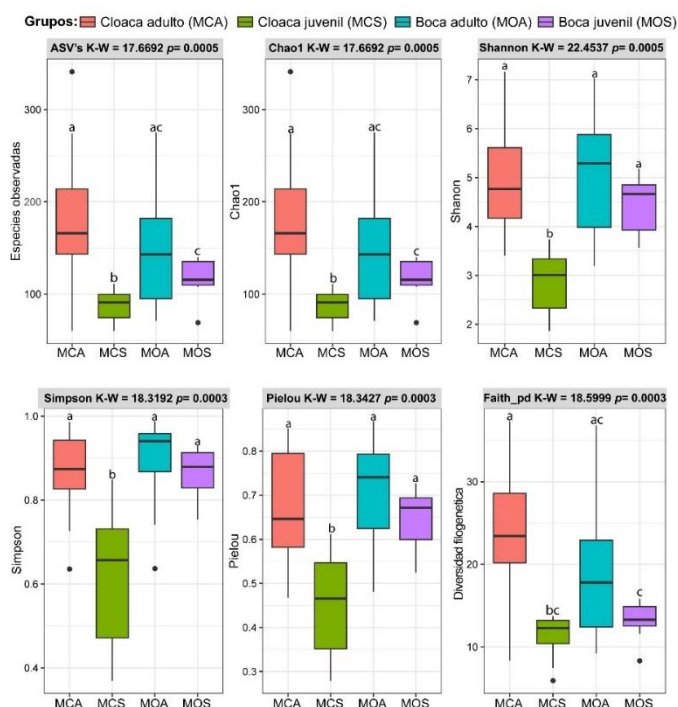


Figura 11. Métricas de diversidad alfa utilizadas en este estudio. Se muestran los gráficos de cajas de cada una de las métricas de acuerdo al sitio anatómico y el estadio de desarrollo de los ejemplares de *C. acutus*. En la parte superior de cada gráfico se indican los resultados de las pruebas Kruskal-Wallis (K-W) y su valor *p*.

8. 5. 3. Equidad y distribución de abundancias bacterianas

Los hallazgos relacionados con la equidad de Pielou están en consonancia con los índices de diversidad calculados. En el grupo MCA, los valores de equidad de Pielou variaron entre 0.42 y 0.85, mientras que en MOA se situaron entre 0.48 y 0.86. Estos intervalos indican una distribución relativamente uniforme en las abundancias de grupos bacterianos en comparación con los grupos juveniles como MOS (0.52-0.72) y MCS (0.27-0.61). Es en el grupo MCS donde se destacan diferencias significativas, señalando la presencia de grupos bacterianos altamente dominantes (Figura 11).

8. 5. 4. Diversidad filogenética en la microbiota bacteriana

La estimación de la diversidad filogenética de Faith en la microbiota de cloaca y cavidad oral de *C. acutus* reveló patrones interesantes. El grupo MCA exhibió la mayor diversidad filogenética, seguido por MOA, MOS y finalmente MCS (Figura 11). Estos resultados indican que los grupos MCA y MOA albergan una mayor variedad de ramas evolutivas en su comunidad bacteriana. Contrariamente, para las muestras juveniles, tanto MOS como MCS, se observaron diferencias significativas en comparación con los grupos adultos. Esto sugiere que los grupos bacterianos en los juveniles están más enfocados en ciertas ramas filogenéticas, lo que se traduce en una menor diversidad filogenética.

8. 5. 5. Análisis multivariados de diversidad beta

Los análisis multivariados que exploraron la diversidad beta en los grupos de *C. acutus* brindaron una visión profunda de las diferencias en la estructura de la microbiota (Figura 12). En el análisis de PCoA, el eje 1 emergió como la principal fuente de variación entre los grupos, representando el 13.6% de la variabilidad. Esto se reflejó en una clara separación entre los grupos MCA y MOA en comparación con las muestras juveniles MCS y MOS, lo que también fue confirmado por el eje 2 (9.8%). El análisis del PERMANOVA respaldó estas observaciones, revelando un R^2 de 0.2628 y un valor de $p < 0.05$, lo que indicó la presencia de diferencias significativas entre todos los grupos.

El análisis de NDMS mostró una distribución de puntos en dos dimensiones similar a la observada en el PCoA. Los grupos MCA y MOA presentaron una mayor dispersión en contraste con los grupos MCS y MOS, que se presentaron más cohesionados. Estos resultados fueron respaldados por los hallazgos del ANOSIM, con un valor de $R = 0.5433$ y $p < 0.05$, corroborando la existencia de diferencias significativas entre todos los grupos.

Los resultados de ambos análisis reflejan que la microbiota de los grupos MOS y MCS son grupos definidos y no tan variables, dado que tienden agruparse más estrechamente entre sí, lo que indica una mayor similitud en sus perfiles de composición. Sin embargo, en los grupos MCA y MOA, si bien los grupos se definen, se observa una mayor dispersión entre los puntos, lo que indica una mayor variabilidad en sus perfiles de microbiota.

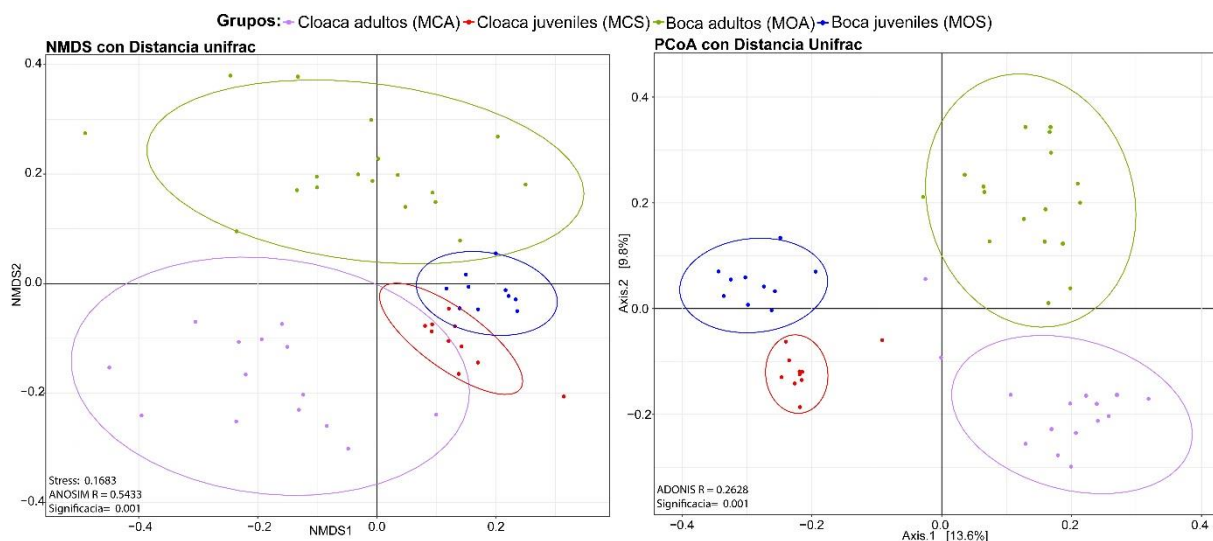


Figura 12. NDMS y PCoA con distancia Unifrac no ponderada en muestras de cloaca y cavidad oral de *C. acutus* juveniles y adultos. El gráfico muestra las variaciones de cada componente en un espacio multidimensional, y los colores en el gráfico representan los grupos según el sitio anatómico y el estadio del desarrollo. En la parte inferior izquierda de cada gráfico, se presentan los resultados de las pruebas estadísticas ANOSIM y ADONIS, junto con sus valores p correspondientes.

8. 5. 6. Influencia del sexo en la estructura bacteriana

En lo que respecta al sexo de los cocodrilos adultos, los análisis multivariados indicaron que no hubo diferencias significativas en la estructura de las comunidades bacterianas. Tanto los patrones de distribución en PCoA como en NMDS no mostraron variaciones discernibles en función del sexo de los cocodrilos, lo que sugiere una similitud general en la estructura bacteriana entre ambos grupos (Figura 13).

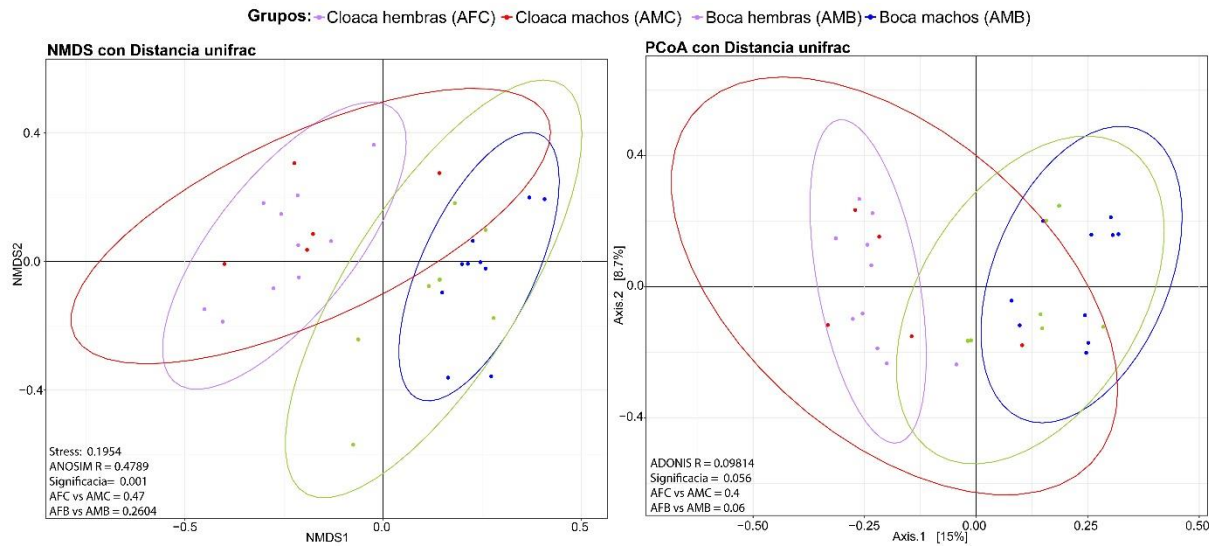


Figura 13. NDMS y PCoA con distancia Unifrac no ponderada en muestras de cloaca y cavidad oral de *C. acutus* adultos. El gráfico muestra las variaciones de cada componente en un espacio multidimensional, y los colores en el gráfico representan los grupos de acuerdo al sexo de los ejemplares adultos. En la parte inferior izquierda de cada gráfico, se presentan los resultados de las pruebas estadísticas ANOSIM y ADONIS, junto con sus valores p correspondientes.

8. 5. 7. Biomarcadores taxonómicos asociados a muestras cloacales de juveniles y adultos

El análisis LEfSe en las muestras de cloaca de cocodrilos juveniles y adultos reveló diferencias significativas en la composición bacteriana. Se identificaron 52 taxones que presentaron discrepancias entre los grupos, con 41 taxones que mostraron relevancia significativa en el grupo MCA y 11 en el grupo MCS (Figura 14). Estos hallazgos apuntan a la existencia de patrones distintivos en la microbiota de cloaca entre los grupos juveniles y adultos.

Los principales taxones revelaron marcadas diferencias en la composición taxonómica entre los grupos MCA y MCS. En el grupo MCA, los filos Actinobacteriota y Synertgistota, así como las clases Actinobacteriota, Alphaproteobacteria y Synergistia, jugaron un papel preponderante en las discrepancias observadas. Además, se observó un incremento

significativo en los niveles de abundancia de los géneros *Gottschalkia*, *Pyramidobacter*, *Paracoccus*, *Paludibacter*, *Fretibacterium* y *Acinetobacter* en el grupo MCA en comparación con MCS.

Para el caso de MCS los taxones que fueron significativamente más abundantes fueron la clase Desulfitobacteria, las familias Hafniaceae, TC1, T34, Oxalobacteraceae y géneros como *Edwardsiella* y *Plesiomonas*.

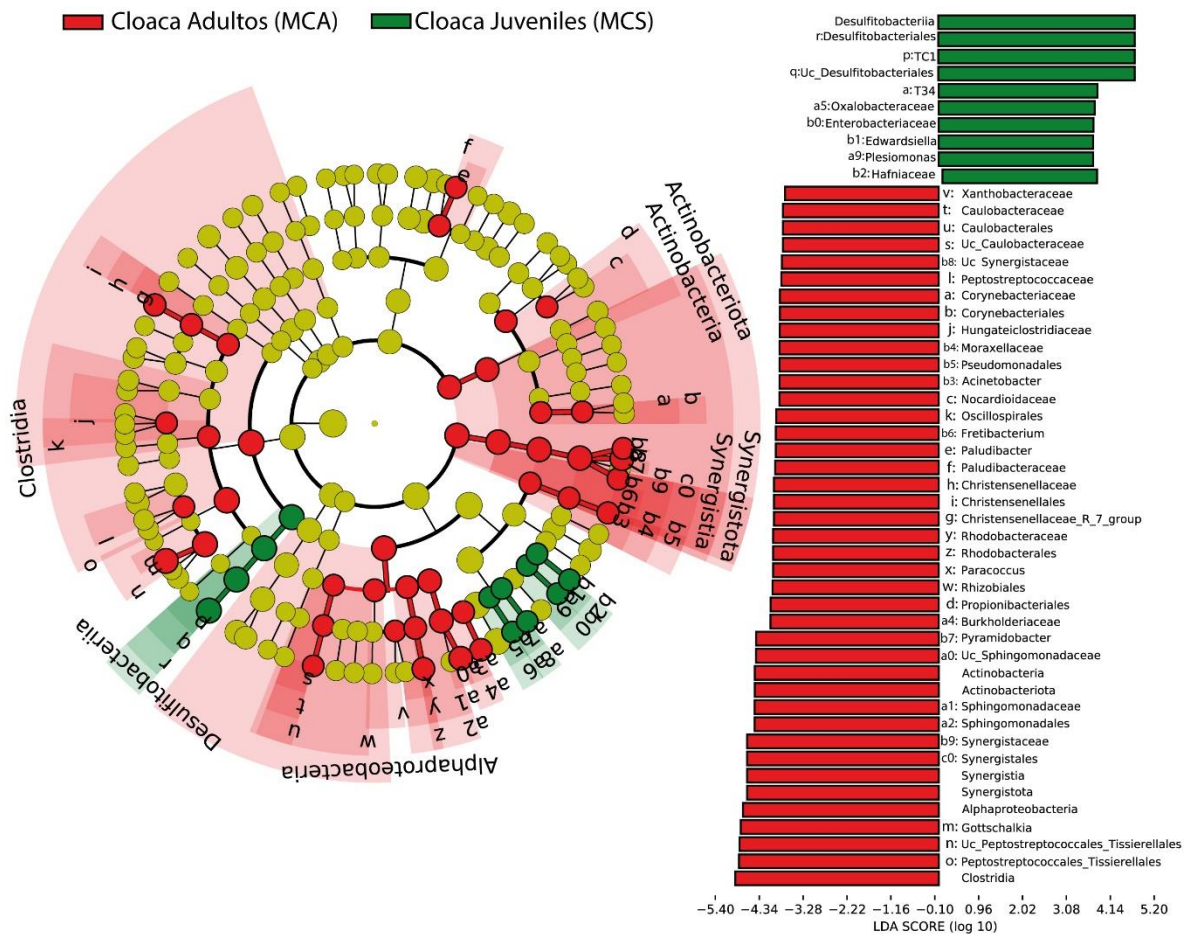


Figura 14. Gráfico LEfSe de biomarcadores taxonómicos asociados a muestras de cloaca de *C. acutus* juveniles y adultos. El gráfico muestra los biomarcadores taxonómicos con un valor de análisis discriminante lineal (LDA) superior a 4 ($LDA > 4$) en muestras de cloaca, organizados en un cladograma de acuerdo a su jerarquía taxonómica. En esta representación, los biomarcadores que son específicos para adultos están resaltados en color rojo, mientras que los biomarcadores específicos para juveniles se muestran en verde.

8. 5. 8. Biomarcadores taxonómicos asociados a muestras orales de juveniles y adultos

Los resultados del análisis LEfSe en las muestras orales de cocodrilos juveniles y adultos resaltaron diferencias notables. Se identificaron 43 taxones con abundancias significativas entre los grupos, 26 en el grupo MOA y 17 en el grupo MOS (Figura 15). En el grupo MOA, los filos Cyanobacteria y Bdellovibrionota, junto con las clases Bdellovibrionia, Cyanobacteriia, Alphaproteobacteria y Gracilibacteria, así como las familias Pseudomonadaceae, Nocardiodaceae y Rhodobacteraceae, y los géneros *Paracoccus*, *Bdellovibrio* y *Pseudomonas*, fueron los contribuyentes principales a las diferencias observadas.

En el caso de muestras orales en juveniles los taxones que fueron significativamente más abundantes fueron el filo Firmicutes, también las clases Clostridia y Gammaproteobacteria, así como las familias Neisseriaceae, Weeksellaceae y los géneros *Alysiella*, *Candidatus Symbiobacter* y *Chryseobacterium*.

las familias Neisseraceae y Paulidibacteraceae y los géneros *Paulidibacter* y *Fusobacterium*, se destacaron en AMC. Por otro lado, en AMB, el filo Actinobacteriota, la clase Actinobacteria, los órdenes Pseudomonadales, Micrococcales y Enterobacterales, mostraron diferencias significativas. Para AFC, los filos Firmicutes, Fusobacteriota y Synergistota, junto con las clases Clostridia, Fusobacteriia y Synergistia, y los géneros *Porphyromonas* y *Gottschalkia*, contribuyeron a las discrepancias. En el grupo AFB, los filos Deinococcota, Proteobacteria y Patescibacteria, las clases Alphaproteobacteria, Neino cocci y Saccharimonadia, así como géneros como *Deinococcus* y *Paracoccus*, exhibieron significativas diferencias en abundancia.

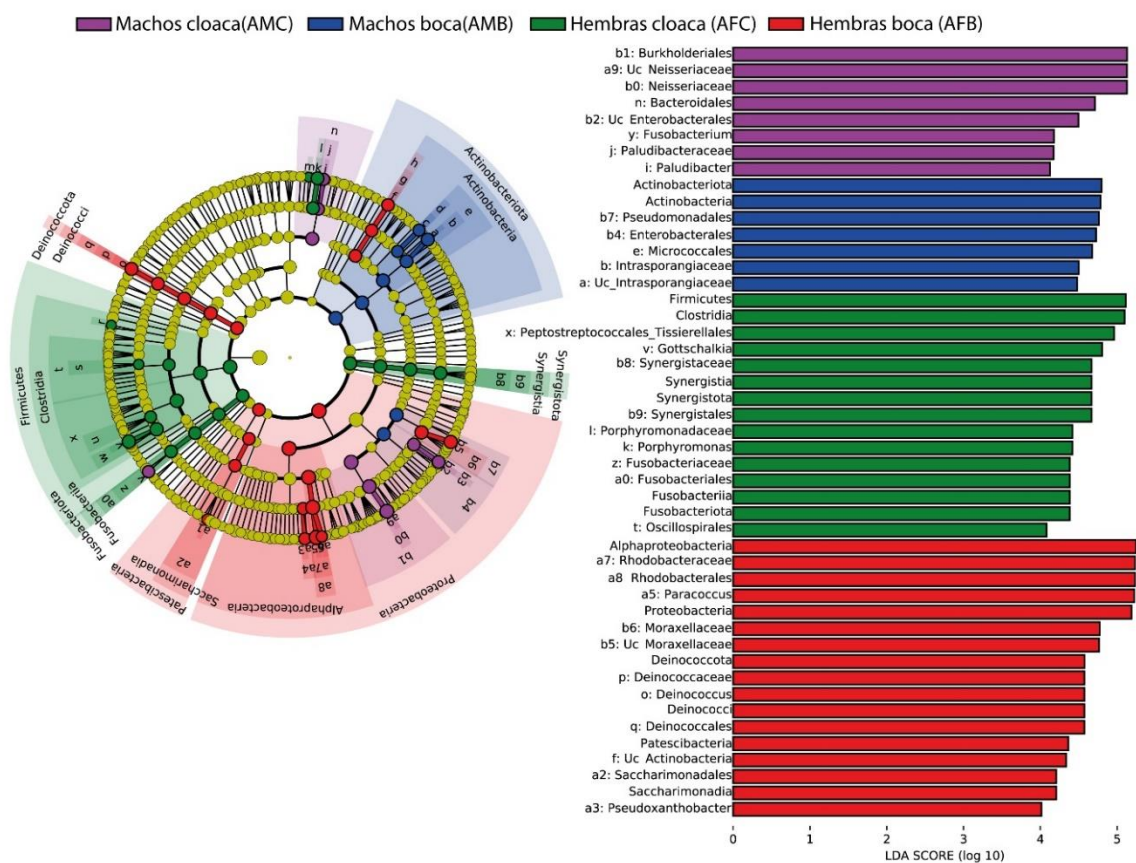


Figura 16. Gráfico LefSe de biomarcadores taxonómicos asociados al sexo de *C. acutus* adultos. El gráfico muestra los biomarcadores taxonómicos con un valor de análisis discriminante lineal (LDA) superior a 4 (LDA

> 4) en muestras asociadas al sexo de los ejemplares, organizados en un cladograma de acuerdo a su jerarquía taxonómica.

8. 6. Predicciones de funciones metabólicas

Las predicciones de funciones metabólicas a través de PICRUSt 2, basadas en la clasificación funcional de KEGG, proporcionaron un panorama integral de las capacidades metabólicas presentes en los grupos analizados. Un total de 7,522 genes fueron anotados y asignados a 259 categorías funcionales. Se englobaron 6 rutas funcionales en el nivel superior, siendo las más abundantes el procesamiento de información ambiental (9–11%), procesamiento de información genética (12–16%) y metabolismo (68-69%). Esto subraya la preeminencia de los procesos metabólicos en las muestras analizadas (Figura 17).

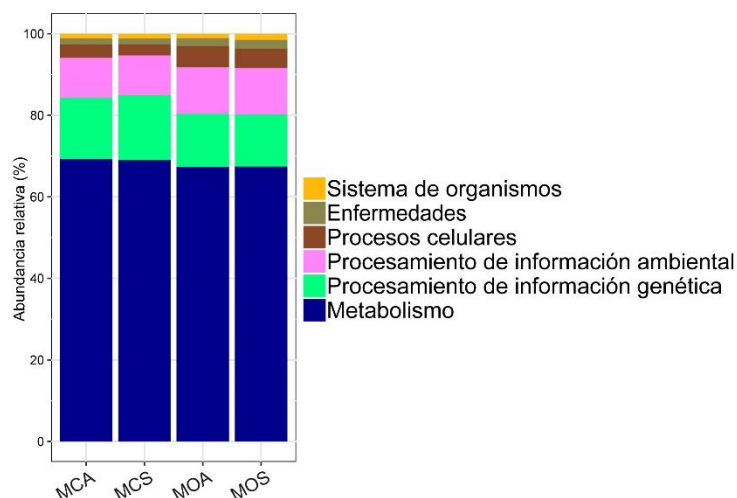


Figura 17. Gráfica de abundancias de perfiles funcionales en nivel superior. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para las vías funcionales anotadas de acuerdo al sitio anatómico y el estadio del desarrollo. El código de color indica las vías funcionales. MCA = Muestras cloacales adultos, MCS = Muestras cloacales juveniles, MOA = Muestras orales adultos y MOS = Muestras orales juveniles.

En el segundo nivel de análisis, se identificaron un total de 41 funciones microbianas presentes en las muestras de cocodrilos. De estas, 19 funciones mostraron abundancias superiores al 1%, como se visualiza en la Figura 18. Notablemente, las categorías funcionales

de Transporte de Membrana (6-7%), Metabolismo Energético (8-9%), Metabolismo de Aminoácidos (14-15%) y Metabolismo de Carbohidratos (14-15%) sobresalieron como las más abundantemente representadas entre los grupos.

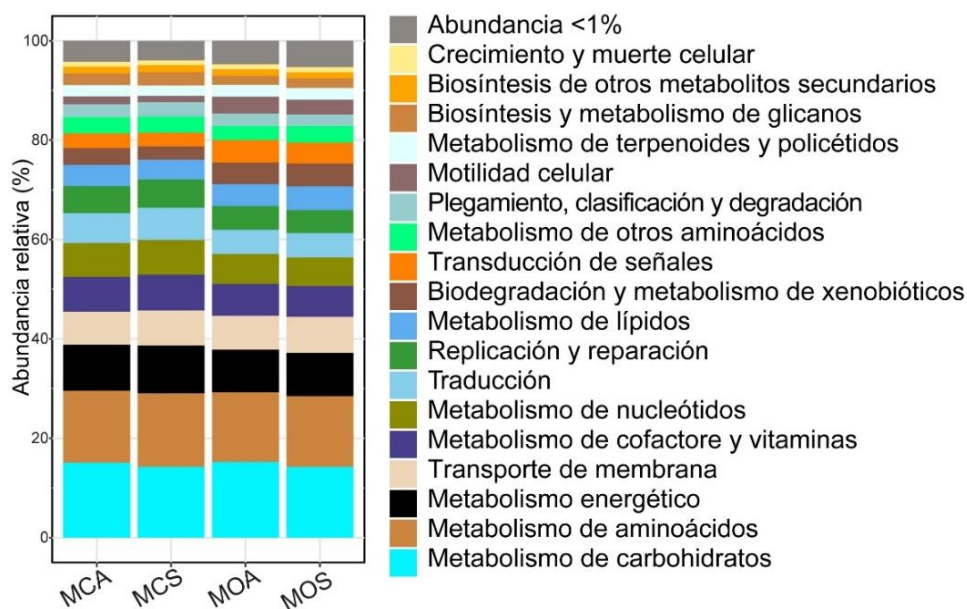


Figura 18. Gráfica de abundancias de perfiles funcionales en segundo nivel. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para las vías funcionales anotadas de acuerdo al sitio anatómico y el estadio del desarrollo. El código de color indica las vías funcionales. MCA = Muestras cloacales adultos, MCS = Muestras cloacales juveniles, MOA = Muestras orales adultos y MOS = Muestras orales juveniles.

En el tercer nivel de nuestro análisis, se profundizó en las categorías funcionales microbianas, donde se identificaron un total de 259 (Figura 19). De estas categorías, 36 exhibieron abundancias superiores al 1%, destacando las funciones de Ribosoma (3-4%), Metabolismo de Purinas (3-4%) y Transportadores ABC (5%) como las más preponderantes.

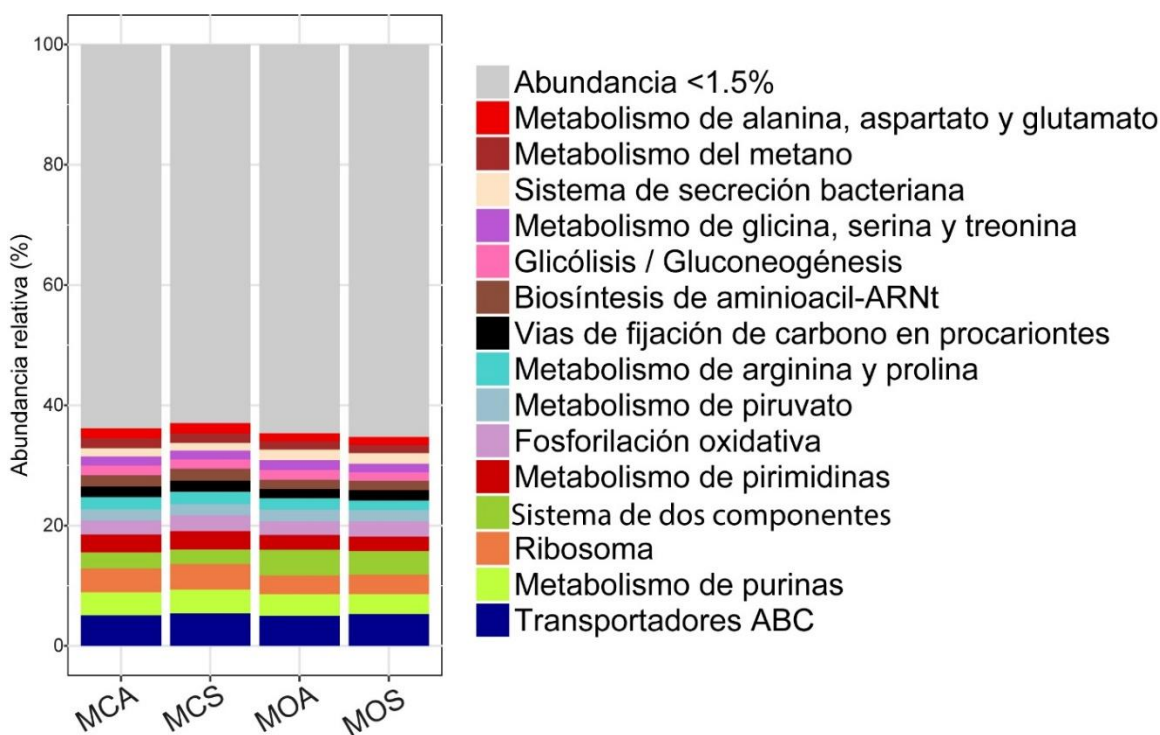


Figura 19. Gráfica de abundancias de perfiles funcionales en tercer nivel. La gráfica indica las frecuencias expresadas en porcentajes para las vías funcionales anotadas de acuerdo al sitio anatómico y el estadio del desarrollo. El código de color indica las vías funcionales. MCA = Muestras cloacales adultos, MCS = Muestras cloacales juveniles, MOA = Muestras orales adultos y MOS = Muestras orales juveniles.

8. 6. 1. Diferencias funcionales en muestras de cloaca de juveniles y adultos

La evaluación de las funciones metabólicas en el grupo de adultos y juveniles reveló diferencias significativas, especialmente en la categoría de Metabolismo (Figura 20). Concretamente, se encontraron diferencias en funciones relacionadas con el Metabolismo de Lípidos, Biodegradación y Metabolismo de Xenobióticos en los adultos. En contraste, las funciones de Biosíntesis de Lipopolisacáridos y Estreptomina mostraron una mayor abundancia en los juveniles en comparación con los adultos.

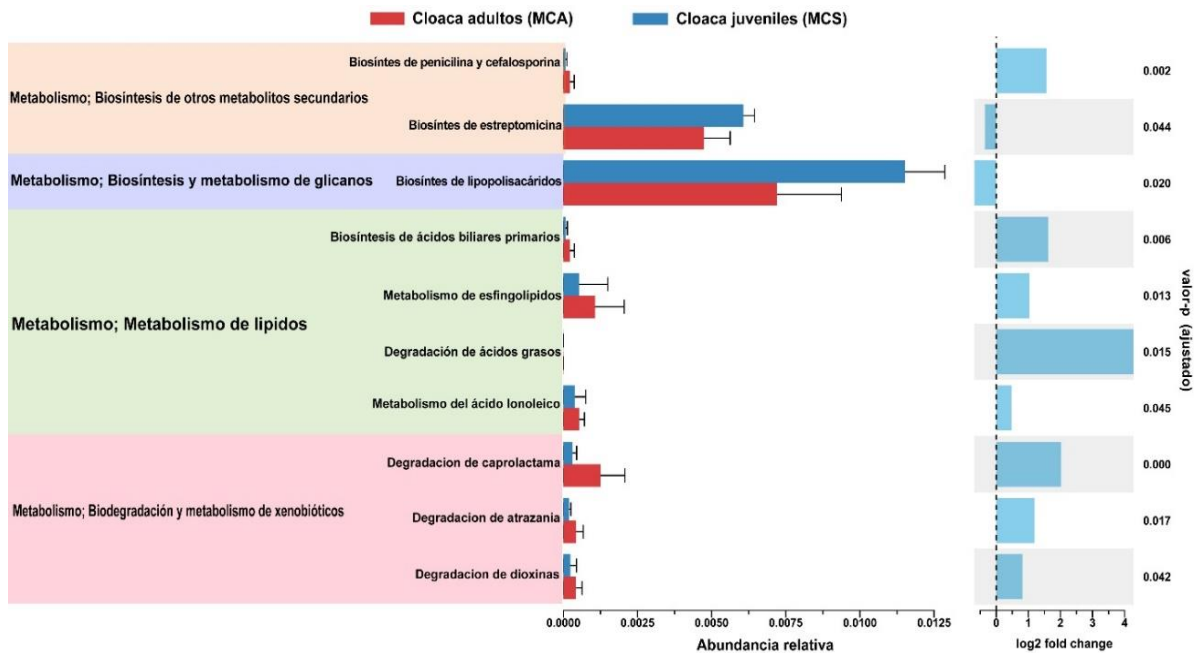


Figura 20. Gráfica de vías funcionales en muestras de cloaca de juveniles y adultos. La gráfica con barras de error indica las vías funcionales que fueron significativas en muestras de cloaca de juveniles y adultos de acuerdo al análisis de abundancia diferencial. Del lado derecho, se muestra el valor p ajustado.

8. 6. 2. Diferencias funcionales en muestras orales de juveniles y adultos

El análisis de las muestras orales resaltó diferencias en las funciones metabólicas entre cocodrilos juveniles y adultos. Se observó una mayor presencia de funciones metabólicas en los juveniles, incluyendo el Metabolismo del Butanoato, Metabolismo del Propanoato, Fosforilación Oxidativa y Vías de Fijación del Carbono en Procariotas. En contraposición, se evidenció que rutas metabólicas como la Glicólisis, Ruta de la Pentosa Fosfato y Metabolismos de Purinas, Arginina, Prolina, Serina y Treonina presentaron niveles de abundancia más elevados en los cocodrilos adultos (Figura 21).

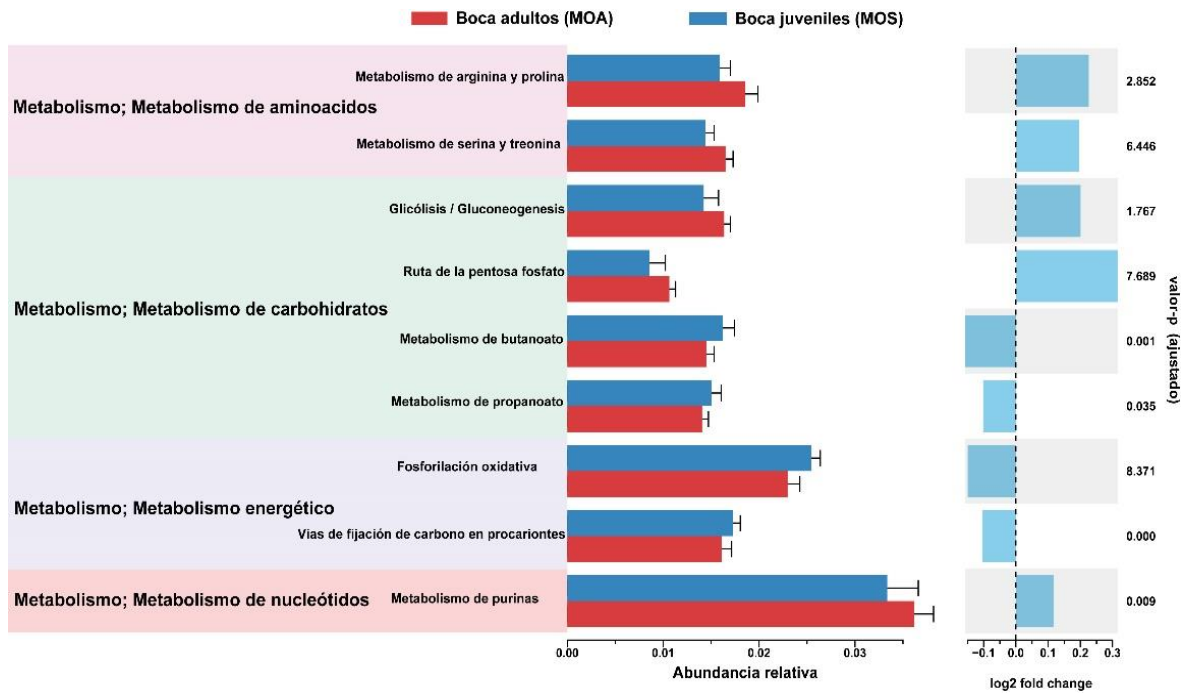


Figura 21. Gráfica de vías funcionales en muestras orales de juveniles y adultos. La gráfica con barras de error indica las vías funcionales que fueron significativas en muestras orales de juveniles y adultos de acuerdo al análisis de abundancia diferencial. Del lado derecho, se muestra el valor p ajustado.

IX. DISCUSIÓN

El propósito central de este estudio consistió en una exhaustiva exploración y descripción de la configuración de las comunidades bacterianas que constituyen la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) en el cocodrilo americano criado en granjas del estado de Sinaloa, México. La investigación se enfocó en evaluar cómo factores como el sexo de los individuos, el estadio de desarrollo y la ubicación anatómica influyen la composición de dichas comunidades bacterianas. Este estudio representa el primer informe de su tipo, ya que no se ha realizado previamente una caracterización completa de la microbiota intestinal en *Crocodylus acutus*.

Los análisis de las comunidades bacterianas en el TGI de *C. acutus* revelaron una marcada predominancia de los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota y en menor medida Synergistota, Actinobacteriota y Fusobacteriota, que en conjunto representaron el 93% de la abundancia en las muestras de cocodrilos adultos.

Estos resultados se alinean en gran medida con descubrimientos anteriores en otras especies de cocodrilos como *A. mississippiensis*, *A. sinensis* y *C. porosus*, donde se ha informado sobre la dominancia variable de los filos Proteobacteria, Fusobacteriota, Firmicutes y Bacteroidetes en el TGI (Keenan et al., 2013; Kieran et al., 2020; Perez-Marron et al., 2022; Hu et al., 2022; Tang et al., 2019; Siddiqui et al., 2023).

Proteobacteria emerge como el filo más preponderante en todos los grupos investigados en este estudio. Este amplio filo bacteriano, compuesto por miembros Gram negativos, ha sido asociado con diversas funciones en distintos ecosistemas microbianos, incluyendo suelos, nichos acuáticos, plantas y animales (Li et al., 2020; Moon et al., 2018; Zhou et al., 2020). En el contexto del microbioma del TGI, las Gammaproteobacterias se destacan como la clase

más prevalente, coherente con lo observado en este estudio, dado que la clase Gammaproteobacteria predominó en las muestras cloacales de cocodrilos adultos y juveniles. Una característica fundamental de las Proteobacterias radica en su versatilidad metabólica que les permite prosperar en una amplia gama de compuestos orgánicos, desde proteínas hasta carbohidratos y lípidos (Kim et al., 2023). Esta versatilidad podría ser esencial para comprender su presencia dominante en diversos ambientes. Además, su alta abundancia en el TGI puede vincularse con su capacidad de ser anaerobios facultativos, lo que podría conferirles un papel en la regulación de la homeostasis en entornos estrictamente anaeróbicos como el TGI, contribuyendo así a mantener la estabilidad de la microbiota intestinal (Moon et al., 2018).

Firmicutes, como el segundo filo más prominente en las muestras cloacales tanto de cocodrilos adultos como juveniles, parece estar influenciado por la dieta, caracterizada por su contenido elevado en carbohidratos y grasas saturadas, diseñada para fomentar el crecimiento en tamaño de los animales con fines de producción (Keenan et al., 2013). Firmicutes, conocido por su capacidad de fermentar y metabolizar carbohidratos y grasas, se ha relacionado con el desarrollo de la obesidad en animales y humanos (Rizzardi et al., 2021; Houtman et al., 2022; Wang et al., 2023).

La relación entre la acumulación de grasa y la prominencia de Firmicutes en los microbiomas intestinales de caimanes en granjas y vertebrados con exceso de peso ha sido discutida previamente (Keenan et al., 2013). Estos resultados sugieren que la dieta podría influir en la fisiología del microbioma intestinal, particularmente cuando se altera el entorno ocupado por la contraparte salvaje. Sin embargo, dada la limitación de este estudio a ejemplares en cautiverio, se requieren investigaciones futuras que exploren cómo el estatus de vida silvestre

podría afectar la estructura de las comunidades bacterianas del TGI en *C. acutus*, posiblemente a través de un análisis comparativo con ejemplares en cautiverio.

Cabe resaltar la asociación estrecha de los filos bacterianos Fusobacteriota y Bacteroidetes con la dieta carnívora en diversos vertebrados, incluyendo cocodrilos (Hu et al., 2022; Roggenbuck et al., 2014; Wu et al., 2017). Esto se debe en gran parte a la actividad proteolítica exhibida por taxones bacterianos en estos filos, lo que podría estar relacionado con la degradación de la carne (Flint y Duncan, 2014; Tang et al., 2019).

En relación a la diversidad alfa, los resultados de los índices de diversidad de Shannon y Simpson revelaron diferencias significativas entre las muestras cloacales de juveniles y adultos, siendo las muestras de adultos más diversas. Este patrón se asemeja a un estudio previo en *A. sinensis*, donde los juveniles presentaban menor diversidad bacteriana en el microbioma intestinal en comparación con los adultos (Hu et al., 2022). La menor diversidad en los juveniles podría explicarse por su falta de adaptación a los ambientes acuáticos y su dieta menos variada, en contraste con su contraparte adulta (Hu et al., 2022). Por otra parte, las muestras orales de *C. acutus* en adultos y juveniles presentaron una considerable diversidad alfa y no exhibieron diferencias significativas al compararse. La diversidad bacteriana en muestras orales, podría estar vinculada a la exposición frecuente de los cocodrilos a bacterias ambientales de carácter transitorio. Esto podría atribuirse a que estas especies tienden a abrir la mandíbula con regularidad para llevar a cabo procesos de termorregulación (Keenan et al., 2013).

En lo que respecta a la diversidad beta, los análisis NMDS y PCoA mostraron diferencias significativas en la microbiota del TGI en el cocodrilo americano, tanto en grupos cloacales como orales. Estos resultados sugieren una variabilidad sustancial en la composición bacteriana influenciada por el estadio del desarrollo y el sitio anatómico del TGI. En un

estudio realizado en China en un lagarto (*Calotes versicolor*). Determinaron que las diferentes secciones intestinales de esta especie proporcionan variaciones en la composición de la microbiota intestinal de acuerdo al sitio específico del TGI (Zhang et al., 2021).

Por otra parte, los resultados del análisis LEfSe en muestras de cloaca de cocodrilos adultos y juveniles presentaron diferencias significativas entre los grupos taxonómicos. Donde, las muestras de cloaca obtenidas de los cocodrilos adultos exhibieron un sesgo mucho mayor en cuestión de taxones significativos. Este patrón es consistente con los resultados obtenidos de los análisis de diversidad de las comunidades bacterianas entre estos grupos.

En ese sentido, se destacan taxones dominantes como la clase Clostridia en muestras cloacales de adultos. La composición de la microbiota intestinal en diferentes etapas de crecimiento pueden variar por diferentes razones, que van, desde la genética, la dieta, la ubicación geográfica, estrés e inclusive el sistema inmunológico (Al-Rashidi, 2022). También se puede asociar a que, en los primeros años de vida, la microbiota intestinal tiende a ser menos estable (Arshad et al., 2021). Esto se debe en parte a la exposición a diferentes microorganismos a medida que el sistema inmunológico se desarrolla y se adaptan a nuevos alimentos y entornos. Además, se ha reportado que miembros de la clase Clostridia tienden a ser más estables en su composición en etapas adultas (Filippo et al., 2019).

Para el caso de muestras de cloaca de juveniles, géneros como *Edwardsiella* y *Plesiomonas* fueron sesgados para este grupo. Estos géneros bacterianos principalmente asociados a ambientes acuáticos, se han reportado como agentes infecciosos tanto en animales como en humanos (Solís del Baño et al., 2003; Pence, 2016; Janda et al., 2016; Miniero Davies et al., 2018). En cocodrilos, estos géneros bacterianos suelen estar relacionados a la microbiota residente del TGI ya que se han reportado de manera habitual en abundancias relativas bajas en distintos estudios (Keenan et al., 2013; Kieran et al., 2020; Perez-Marron et al., 2022; Hu

et al., 2022; Tang et al., 2019). Sin embargo, en un estudio en *C. siamensis* donde compararon la microbiota del TGI en individuos sanos y con anorexia (Lin et al., 2019). Tuvieron como resultado, que la especie *Edwardsiella tarda* presentó una abundancia relativa mucho mayor en cocodrilos anoréxicos en comparación con el grupo sano. Lo que sugiere que alteraciones en la composición normal de la microbiota del TGI en las especies de cocodrilo, pueden generar condiciones que favorezcan a bacterias oportunistas que normalmente habitan en la microbiota de estos ejemplares como *Edwardsiella tarda* se multipliquen en exceso y causen problemas de salud en los cocodrilos. En el presente estudio, ambos géneros presentaron abundancias relativas promedio menores al 1%, por lo que su presencia se asocia más a una colonización normal de la microbiota intestinal de cocodrilos juveniles que a un estado disbiótico.

Los resultados de predicciones funcionales mostraron una alta asociación con vías relacionadas al metabolismo. Estos resultados son consistentes con los reportados previamente en un estudio en *C. sinensis* (Lin et al., 2019). Destacando el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y energético como las principales vías metabólicas ejercidas en la microbiota del TGI en *C. acutus*. El metabolismo desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del crecimiento saludable de los organismos, y su estrecha relación con las bacterias intestinales en los vertebrados es un aspecto crucial (Olofsson y Bäckhed, 2022).

Este estudio representa un avance significativo en la comprensión de la microbiota del TGI en el cocodrilo americano criado en granjas en Sinaloa, México. Los hallazgos reflejan patrones consistentes con investigaciones previas en otras especies de cocodrilos, destacando la predominancia de Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota y la relación entre la composición bacteriana y la dieta. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las implicaciones de estos resultados en el contexto de la vida silvestre y su interacción con el ambiente natural

necesitan ser exploradas en futuras investigaciones. Estos descubrimientos amplían nuestro entendimiento sobre la interacción entre los microorganismos y su huésped en un sistema ecológico único como el TGI del cocodrilo americano.

X. CONCLUSIONES

- La secuenciación del gen 16S ARNr resultó en un conjunto de datos sólido y confiable, con 1,319,228 lecturas limpias y de alta calidad, lo que garantiza la robustez de los resultados.
- La caracterización detallada de 1,388 Variantes de Secuenciación de Amplicones (ASV) hasta el nivel taxonómico de género proporcionó una visión precisa de la diversidad y abundancia microbiana en las muestras.
- Se identificaron 38 filos bacterianos en las muestras analizadas, con *Proteobacteria*, *Firmicutes*, y *Actinobacteriota* destacando como los más preponderantes, y sus distribuciones variando según la ubicación anatómica.
- A nivel de familia, se identificaron 379 familias, de las cuales 22 presentaron abundancias significativas. El análisis de agrupamiento reveló patrones claros en la distribución de grupos y familias bacterianas, enfatizando la influencia de la edad y ubicación en la composición microbiana.
- La evaluación de las curvas de rarefacción demostró que el esfuerzo de muestreo fue adecuado, con una cobertura óptima de la microbiota bacteriana en el TGI de *C. acutus*, respaldando la solidez de los resultados obtenidos.
- Se observó una variación en la diversidad de especies bacterianas entre los grupos, siendo los cocodrilos adultos (*MCA* y *MOA*) los más diversos. Las muestras juveniles (*MCS*) presentaron una menor diversidad, indicando diferencias estadísticamente significativas.
- La equidad de Pielou siguió patrones similares a los índices de diversidad, reflejando la uniformidad en las abundancias de grupos bacterianos en los adultos (*MCA* y *MOA*)

en comparación con las muestras juveniles (*MOS* y *MCS*), donde se observaron diferencias significativas.

- La estimación de la diversidad filogenética de Faith reveló que los grupos *MCA* y *MOA* albergaban una mayor variedad de ramas evolutivas en su comunidad bacteriana, mientras que los juveniles (*MOS* y *MCS*) mostraron una menor diversidad filogenética, sugiriendo enfoques más específicos en ciertas ramas.
- Los análisis multivariados, incluyendo el PCoA y el análisis del PERMANOVA, demostraron diferencias significativas en la estructura de la microbiota entre los grupos, destacando la influencia de la edad y la ubicación anatómica en la variación observada.
- Se identificaron diferencias en la composición bacteriana entre los grupos de *C. acutus*, tanto en la cloaca como en la cavidad oral, así como entre los sexos en los adultos. Estas discrepancias taxonómicas resaltan patrones distintivos en la microbiota de los cocodrilos juveniles y adultos, así como entre hembras y machos.
- Mediante PICRUSt 2 y la clasificación funcional de KEGG, se obtuvo una visión panorámica de las capacidades metabólicas presentes en los grupos analizados. Con 7,522 genes asignados a 259 categorías funcionales, el procesamiento de información genética, ambiental y el metabolismo destacaron como las principales rutas metabólicas.
- En un segundo nivel de análisis, se identificaron 41 funciones microbianas en las muestras de cocodrilos. De estas, 19 funciones mostraron abundancias superiores al 1%, destacando las categorías de Transporte de Membrana, Metabolismo Energético, Metabolismo de Aminoácidos y Metabolismo de Carbohidratos.

- A un tercer nivel, se profundizó en las categorías funcionales microbianas, identificando 36 funciones con abundancias superiores al 1%, destacando las funciones de Ribosoma, Metabolismo de Purinas y Transportadores ABC.
- La evaluación de funciones metabólicas entre grupos de adultos y juveniles reveló diferencias significativas, especialmente en Metabolismo. Funciones relacionadas con Metabolismo de Lípidos, Biodegradación y Metabolismo de Xenobióticos diferenciaron a los adultos, mientras que funciones de Biosíntesis de Lipopolisacáridos y Estreptomicina fueron más abundantes en los juveniles.
- El análisis de muestras orales señaló diferencias entre cocodrilos juveniles y adultos. Funciones metabólicas como Metabolismo del Butanoato, Metabolismo del Propanoato, Fosforilación Oxidativa y Vías de Fijación del Carbono en Procariotas fueron más prominentes en los juveniles. En contraste, rutas metabólicas como Glicólisis, Ruta de la Pentosa Fosfato y Metabolismos de Purinas, Arginina, Prolina, Serina y Treonina presentaron niveles más altos en los cocodrilos adultos.

XI. REFERENCIAS

- Al-Rashidi, H. E. (2022). Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi journal of biological sciences*, 29(3), 1628-1643.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.068>
- Alberdi, A., Martin Bideguren, G., & Aizpurua, O. (2021). Diversity and compositional changes in the gut microbiota of wild and captive vertebrates: a meta-analysis. *Scientific reports*, 11(1), 22660-22660. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02015-6>
- Andrews. (2010, Jun). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Arshad, M. A., Hassan, F.-u., Rehman, M. S., Huws, S. A., Cheng, Y., & Din, A. U. (2021). Gut microbiome colonization and development in neonatal ruminants: Strategies, prospects, and opportunities. *Animal Nutrition*, 7(3), 883-895.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.004>
- Azmat, M. A., Khan, I. A., Cheema, H. M., Rajwana, I. A., Khan, A. S., & Khan, A. A. (2012). Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *J Zhejiang Univ Sci B*, 13(4), 239-243.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1100194>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., . . . Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*, 37(8), 852-857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

- Buermans, H. P., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*, 1842(10), 1932-1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Colston, T. J., Noonan, B. P., & Jackson, C. R. (2015). Phylogenetic Analysis of Bacterial Communities in Different Regions of the Gastrointestinal Tract of *Agkistrodon piscivorus*, the Cottonmouth Snake. *PloS One*, 10(6), e0128793-e0128793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128793>
- Coman, V., & Vodnar, D. C. (2020). Gut microbiota and old age: Modulating factors and interventions for healthy longevity. *Experimental Gerontology*, 141, 111095-111095. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111095>
- Domínguez-Laso, J., Hinojosa, O., & Padilla, S. (2011). Método de marcaje y recaptura de ejemplares. In (pp. 129-185).
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., . . . Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol*, 38(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Duquenne, P. (2018). On the Identification of Culturable Microorganisms for the Assessment of Biodiversity in Bioaerosols. *Annals of Work Exposures and Health*, 62(2), 139-146. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxx096>

- Fernandes, A. D., Reid, J. N., Macklaim, J. M., McMurrough, T. A., Edgell, D. R., & Gloor, G. B. (2014). Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome*, 2, 15. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-15>
- Ferravante, C., Memoli, D., Palumbo, D., Ciaramella, P., Di Loria, A., D'Agostino, Y., Giurato, G. (2021). HOME-BIO (sHOTgun MEtagenomic analysis of BIOlogical entities): a specific and comprehensive pipeline for metagenomic shotgun sequencing data analysis. *BMC bioinformatics*, 22 (Suppl 7), 106-106. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04004-y>
- Fischer, M. A., Güllert, S., Neulinger, S. C., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2016). Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1297-1297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01297>
- Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2014). Bacteroides and Prevotella. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 203-208). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00031-8>
- Filippo, C., Di Paola, M., Giani, T., Tirelli, F., & Cimaz, R. (2019). Gut microbiota in children and altered profiles in juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 98, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.01.001>
- García-Grajales, Jesús, Aguirre-León, Gustavo, & Contreras-Hernández, Armando. (2007). Tamaño y estructura poblacional de *Crocodylus acutus* (Cuvier 1807) (Reptilia:

- Crocodylidae) en el estero La Ventanilla, Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 23(1), 53-71. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372007000100007&lng=es&tlng=es.
- Garrido-Cardenas, J. A., Garcia-Maroto, F., Alvarez-Bermejo, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2017). DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel)*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/s17030588>
- Gholamhosseini, A., Banaee, M., Soltanian, S., & Sakhaie, F. (2021). Heavy Metals in the Blood Serum and Feces of Mugger Crocodile (*Crocodylus palustris*) in Sistan and Baluchistan Province, Iran. *Biol Trace Elem Res*. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02916-7>
- Ghurye, J. S., Cepeda-Espinoza, V., & Pop, M. (2016). Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications. *Yale J Biol Med*, 89(3), 353-362.
- Groussin, M., Mazel, F., & Alm, E. J. (2020). Co-evolution and Co-speciation of Host-Gut Bacteria Systems. *Cell Host Microbe*, 28(1), 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.013>
- Guo, W., Mishra, S., Wang, C., Zhang, H., Ning, R., Kong, F., Li, Y. (2019). Comparative Study of Gut Microbiota in Wild and Captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genes*, 10(10), 827. <https://doi.org/10.3390/genes10100827>
- Han, H., Li, Y., Fang, J., Liu, G., Yin, J., Li, T., & Yin, Y. (2018). Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040995>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new

- frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-R249.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135-135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Houtman, T. A., Eckermann, H. A., Smidt, H., & de Weerth, C. (2022). Gut microbiota and BMI throughout childhood: the role of firmicutes, bacteroidetes, and short-chain fatty acid producers. *Scientific reports*, 12(1), 3140. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07176-6>
- Hu, M.-Y., Yu, Q.-Z., Lin, J.-Q., & Fang, S.-G. (2022). Sexual Dimorphism of the Gut Microbiota in the Chinese Alligator and Its Convergence in the Wild Environment. 23(20), 12140. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12140>
- Hu, M.-Y., Chen, Y.-W., Chai, Z.-F., Wang, Y.-Z., Lin, J.-Q., & Fang, S.-G. (2022). Antibacterial Properties and Potential Mechanism of Serum from Chinese Alligator. 10(11), 2210. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/11/2210>
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLOS Genetics*, 4(11), e1000255. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>
- INEGI. (2017). *Anuario estadístico y geográfico de Sinaloa 2017*. Retrieved 28/05/2022 from <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeoGráficas/?ag=25#collapse-Publicaciones>

- Jo, J., Oh, J., & Park, C. (2020). Microbial community analysis using high-throughput sequencing technology: a beginner's guide for microbiologists. *J Microbiol*, 58(3), 176-192. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9525-5>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Joseph, T. A., & Pe'er, I. (2021). An Introduction to Whole-Metagenome Shotgun Sequencing Studies. *Methods Mol Biol*, 2243, 107-122. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1103-6_6
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D587-d592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
- Keenan, S. W., & Elsey, R. M. (2015). The Good, the Bad, and the Unknown: Microbial Symbioses of the American Alligator. *Integr Comp Biol*, 55(6), 972-985. <https://doi.org/10.1093/icb/iev006>
- Keenan, S. W., Engel, A. S., & Elsey, R. M. (2013). The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses. *Scientific reports*, 3, 2877-2877. <https://doi.org/10.1038/srep02877>
- Khan, N. A., Soopramanien, M., Maciver, S. K., Anuar, T. S., Sagathevan, K., & Siddiqui, R. (2021). *Crocodylus porosus* Gut Bacteria: A Possible Source of Novel Metabolites. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4999. <https://doi.org/10.3390/molecules26164999>

- Kieran, T. J., Goodman, S. J., Finger, J. W., Thomas, J. C., Hamilton, M. T., Tuberville, T. D., & Glenn, T. C. (2020). Microbiota of Four Tissue Types in American Alligators (*Alligator mississippiensis*) Following Extended Dietary Selenomethionine Exposure. *Bull Environ Contam Toxicol*, 105(3), 381-386.
<https://doi.org/10.1007/s00128-020-02961-3>
- Kim, J. E., Tun, H. M., Bennett, D. C., Leung, F. C., & Cheng, K. M. (2023). Microbial diversity and metabolic function in duodenum, jejunum and ileum of emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Scientific reports*, 13(1), 4488. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31684-8>
- Lázaro, W. L., de Oliveira, R. F., dos Santos-Filho, M., da Silva, C. J., Malm, O., Ignácio Á, R., & Díez, S. (2015). Non-lethal sampling for mercury evaluation in crocodilians. *Chemosphere*, 138, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.007>
- Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001, 2001/04/02/). `Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8.
<https://link.gale.com/apps/doc/A73535513/AONE?u=anon~3d8631d0&sid=googleScholar&xid=608c1c8e>
- Li, W., Zhang, Y., Mao, W., Wang, C., & Yin, S. (2020). Functional potential differences between Firmicutes and Proteobacteria in response to manure amendment in a reclaimed soil. *Can J Microbiol*, 66(12), 689-697. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0143>
- Lin, M., Zeng, C., Li, Z., Ma, Y., & Jia, X. (2019). Comparative analysis of the composition and function of fecal-gut bacteria in captive juvenile *Crocodylus siamensis* between healthy and anorexic individuals. *Microbiologyopen*, 8(12), e929.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.929>

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 251364.
<https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & cell*, 12(5), 315-330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Manaka, A., Tokue, Y., & Murakami, M. (2017). Comparison of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis and conventional culture in the environmental survey of a hospital. *J Pharm Health Care Sci*, 3, 8. <https://doi.org/10.1186/s40780-017-0074-y>
- Mantilla Martinez, Marcela Judith, & Torres Sáez, Rodrigo Gonzalo. (2019). Enfoque metagenómico para la caracterización del microbioma de aves corral. Revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 77-97. Epub January 20, 2020.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.78390>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 31-31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), pp. 10-12. doi:<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560-564.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- McKenzie, V. J., Song, S. J., Delsuc, F., Prest, T. L., Oliverio, A. M., Korpita, T. M., Knight, R. (2017). The Effects of Captivity on the Mammalian Gut Microbiome. *Integr Comp Biol*, 57(4), 690-704. <https://doi.org/10.1093/icb/icx090>

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PloS One*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meredith, R. W., Hekkala, E. R., Amato, G., & Gatesy, J. (2011). A phylogenetic hypothesis for *Crocodylus* (Crocodylia) based on mitochondrial DNA: evidence for a trans-Atlantic voyage from Africa to the New World. *Mol Phylogenet Evol*, 60(1), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.03.026>
- Mondot, S., de Wouters, T., Doré, J., & Lepage, P. (2013). The human gut microbiome and its dysfunctions. *Dig Dis*, 31(3-4), 278-285. <https://doi.org/10.1159/000354678>
- Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiologyopen*, 7(5), e00677. <https://doi.org/10.1002/mbo3.677>
- Mukherjee, S., Joardar, N., Sengupta, S., & Sinha Babu, S. P. (2018). Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 111-128. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.010>
- Oliveira, V. C. S., Altmanová, M., Viana, P. F., Ezaz, T., Bertollo, L. A. C., Ráb, P., de Bello Cioffi, M. (2021). Revisiting the Karyotypes of Alligators and Caimans (Crocodylia, Alligatoridae) after a Half-Century Delay: Bridging the Gap in the Chromosomal Evolution of Reptiles. *Cells*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/cells10061397>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, B., Wagner, H. (2015). Vegan: Community Ecology Package. *R Package Version 2.2-1*, 2, 1-2.

- Olofsson, L. E., & Bäckhed, F. (2022). The Metabolic Role and Therapeutic Potential of the Microbiome. *Endocrine Reviews*, 43(5), 907-926.
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnac004> %J *Endocrine Reviews*
- Panda, A. K., Katdare, S., Gawan, S., Sharma, S. P., Badola, R., & Hussain, S. A. (2023). Population status and factors influencing the distribution of Critically Endangered gharial (*Gavialis gangeticus*) in a regulated unprotected river system in India. *Global Ecology and Conservation*, 46, e02547.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02547>
- Pantano, C., Jauregui, G., Herrera, O., Naranjo, A., & Benítez-Díaz, H. (2011). Programa de Monitoreo del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) México-Belice-Guatemala.
- Perez-Marron, J., Sanders, C., Gomez, E., Escopete, S., Owerkowicz, T., & Orwin, P. M. (2022). Community and shotgun metagenomic analysis of *Alligator mississippiensis* oral cavity and GI tracts reveal complex ecosystems and potential reservoirs of antibiotic resistance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 274, 111319.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111319>
- Pough, F. H. (2022). Reptiles, Biodiversity of. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822562-2.00034-7>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*, 35(21), 7188-7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, *41*(Database issue), D590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*, *35*(9), 833-844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Rafferty, J. P. (2020). crurotarsan. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/animal/crurotarsan-reptile>
- RCoreTeam. (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*. <https://www.R-project.org/>
- Redondo-Useros, N., Nova, E., González-Zancada, N., Díaz, L. E., Gómez-Martínez, S., & Marcos, A. (2020). Microbiota and Lifestyle: A Special Focus on Diet. *Nutrients*, *12*(6), 1776. <https://doi.org/10.3390/nu12061776>
- Ristevski, J. (2019). Crocodilia Morphology. In J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-22). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_955-2
- Rizzardi, K. F., Indiani, C. M. d. S. P., Mattos-Graner, R. d. O., de Sousa, E. T., Nobre-dos-Santos, M., & Parisotto, T. M. (2021). Firmicutes Levels in the Mouth Reflect the Gut Condition With Respect to Obesity and Early Childhood Caries [Brief Research Report]. *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.593734>
- Robeson, M. S., II, O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2021). RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy

- reference database management. *PLOS Computational Biology*, 17(11), e1009581.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>
- Roggenbuck, M., Bærholm Schnell, I., Blom, N., Bælum, J., Bertelsen, M. F., Sicheritz-Pontén, T., . . . Hansen, L. H. (2014). The microbiome of New World vultures. *Nat Commun*, 5(1), 5498. <https://doi.org/10.1038/ncomms6498>
- Rossi, N. A., Menchaca-Rodriguez, A., Antelo, R., Wilson, B., McLaren, K., Mazzotti, F., Amato, G. (2020). High levels of population genetic differentiation in the American crocodile (*Crocodylus acutus*). *PloS One*, 15(7), e0235288.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235288>
- Rueda-Almonacid, J. V., Carr, J., Mittermeier, R., Rodríguez-Mahecha, J. V., Mast, R., Vogt, R., Mittermeier, C. (2007). *Las Tortugas y los Cocodrilianos de los Países Andinos del Trópico*.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Scheelings, T. F., Moore, R. J., Van, T. T. H., Klaassen, M., & Reina, R. D. (2020). Microbial symbiosis and coevolution of an entire clade of ancient vertebrates: the gut microbiota of sea turtles and its relationship to their phylogenetic history. *Animal Microbiome*, 2(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00034-8>
- Schloss, P. D. (2021). Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere*, 6(4), e0019121-e0019121.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00191-21>
- Schneider, L., Peleja, R. P., Kluczkowski, A., Jr., Freire, G. M., Marioni, B., Vogt, R. C., & Da Silveira, R. (2012). Mercury concentration in the spectacled caiman and black


- caiman (Alligatoridae) of the Amazon: implications for human health. *Arch Environ Contam Toxicol*, 63(2), 270-279. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9768-1>
- Sędzikowska, A., & Szablewski, L. (2021). Human Gut Microbiota in Health and Selected Cancers. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13440. <https://doi.org/10.3390/ijms222413440>
- Siddiqui, R., Maciver, S., Elmoselhi, A., Soares, N. C., & Khan, N. A. (2021). Longevity, cellular senescence and the gut microbiome: lessons to be learned from crocodiles. *Heliyon*, 7(12), e08594. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08594>
- Siddiqui, R., Maciver, S. K., & Khan, N. A. (2022). Gut microbiome-immune system interaction in reptiles. *J Appl Microbiol*, 132(4), 2558-2571. <https://doi.org/10.1111/jam.15438>
- Siddiqui, R., Maciver, S. K., Anuar, T. S., & Khan, N. A. (2023). Bacterial flora varies throughout the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) gastrointestinal tract. *Am J Vet Res*, 84(8). <https://doi.org/10.2460/ajvr.23.03.0061>
- Straub, D., Blackwell, N., Langarica-Fuentes, A., Peltzer, A., Nahnsen, S., & Kleindienst, S. (2020). Interpretations of Environmental Microbial Community Studies Are Biased by the Selected 16S rRNA (Gene) Amplicon Sequencing Pipeline [Original Research]. *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.550420>
- Tang, K.-Y., Wang, Z.-W., Wan, Q.-H., & Fang, S.-G. (2019). Metagenomics Reveals Seasonal Functional Adaptation of the Gut Microbiome to Host Feeding and Fasting in the Chinese Alligator. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2409-2409. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02409>

- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Wang, C., Yi, Z., Jiao, Y., Shen, Z., Yang, F., & Zhu, S. (2023). Gut Microbiota and Adipose Tissue Microenvironment Interactions in Obesity. *Metabolites*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/metabo13070821>
- West, A. G., Waite, D. W., Deines, P., Bourne, D. G., Digby, A., McKenzie, V. J., & Taylor, M. W. (2019). The microbiome in threatened species conservation. *Biological Conservation*, 229, 85-98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.016>
- Willson, N. L., Van, T. T. H., Lever, J., Moore, R. J., & Stanley, D. (2019). Characterisation of the intestinal microbiota of commercially farmed saltwater crocodiles, *Crocodylus porosus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(21-22), 8977-8985. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10143-3>
- Wu, X., Zhang, H., Chen, J., Shang, S., Yan, J., Chen, Y., Zhang, H. (2017). Analysis and comparison of the wolf microbiome under different environmental factors using three different data of Next Generation Sequencing. *Scientific Reports*, 7(1), 11332. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11770-4>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, C., Mai, J., Cao, X., Burberry, A., Cominelli, F., & Zhang, L. (2023). ggpicrust2: an R package for PICRUSt2 predicted functional profile analysis and visualization. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad470>

- Yang, Q., Liang, Q., Balakrishnan, B., Belobrajdic, D. P., Feng, Q.-J., & Zhang, W. (2020). Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients*, *12*(2), 381. <https://doi.org/10.3390/nu12020381>
- Yuan, C., Lei, J., Cole, J., & Sun, Y. (2015). Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data. *Bioinformatics*, *31*(12), i35-i43. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv231>
- Zeng, F., Wang, Z., Wang, Y., Zhou, J., & Chen, T. (2017). Large-scale 16S gene assembly using metagenomics shotgun sequences. *Bioinformatics*, *33*(10), 1447-1456. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx018>
- Zhang, L., Yang, F., Li, N., & Dayananda, B. (2021). Environment-Dependent Variation in Gut Microbiota of an Oviparous Lizard (*Calotes versicolor*). *Animals: an open access journal from MDPI*, *11*(8), 2461. <https://doi.org/10.3390/ani11082461>
- Zhou, Z., Tran, P. Q., Kieft, K., & Anantharaman, K. (2020). Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation. *Isme j*, *14*(8), 2060-2077. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0669-4>

XII. ANEXOS

12.1. Reporte del análisis de similitud y originalidad

Identificación de reporte de similitud. oid:12611:256830067

NOMBRE DEL TRABAJO	AUTOR
Caracterización metagenómica del micro bioma del tracto gastrointestinal de Crocodylus acutus en Sina	José Uriel López Espinoza

RECUENTO DE PALABRAS	RECUENTO DE CARACTERES
13297 Words	74348 Characters
RECUENTO DE PÁGINAS	TAMAÑO DEL ARCHIVO
65 Pages	2.9MB
FECHA DE ENTREGA	FECHA DEL INFORME
Aug 18, 2023 3:59 PM GMT-7	Aug 18, 2023 4:00 PM GMT-7

- **3% de similitud general**
El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="310 1125 643 1157">• 3% Base de datos de Internet<li data-bbox="310 1163 618 1194">• Base de datos de Crossref<li data-bbox="310 1201 773 1230">• 1% Base de datos de trabajos entregados	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="813 1125 1195 1157">• 1% Base de datos de publicaciones<li data-bbox="813 1163 1333 1188">• Base de datos de contenido publicado de Crossref
--	--

- **Excluir del Reporte de Similitud**
 - Material bibliográfico
 - Material citado
 - Material citado
 - Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Resumen