

División Académica de Ciencias de la Salud



**“Aislamiento y caracterización de una cepa de *Lactobacillus sp*
y evaluación del efecto de su administración después de un
tratamiento con antibióticos en ratones Balb/c”**

**Tesis que para obtener el grado de: Maestría en Ciencias
Biomédicas**

Presenta: Maloy Hernández Hernández

Directores:

Dra. Leova Pacheco Gil.

Dr. Xavier Miguel Boldo León

Dra. Hidemi Aguilar Mariscal



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura del
Área de Estudios
de Posgrado



Of. No. 0293/DACS/JAEP
12 de marzo de 2020

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

C. Maloy Hernández Hernández
Maestría en Ciencias Biomédicas
Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Dr. Jorge Luis Ble Castillo, Dra. Hidemi Aguilar Mariscal, Dra. Leova Pacheco Gil y el Dr. Xavier Miguel Boldo León, impresión de la tesis titulada: "Aislamiento y caracterización de una cepa de *Lactobacillus sp* y evaluación del efecto de su administración después de un tratamiento con antibióticos en ratones Balb/c", para sustento de su trabajo recepcional de la Maestría en Ciencias Biomédicas, donde fungen como Directores de Tesis la Dra. Leova Pacheco Gil, Dr. Xavier Miguel Boldo León y la Dra. Hidemi Aguilar Mariscal.

Atentamente

Dra. Mirian Carolina Martínez López
Directora

UJAT



DACS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Dra. Leova Pacheco Gil.- Director de Tesis
C.c.p.- Dr. Xavier Miguel Boldo León.- Director de Tesis
C.c.p.- Dra. Hidemi Aguilar Mariscal.- Director de Tesis
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop Sinodal
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- Sinodal
C.c.p.- Dra. Hidemi Aguilar Mariscal.- Sinodal
C.c.p.- Dra. Leova Pacheco Gil.- Sinodal
C.c.p.- Dr. Xavier Miguel Boldo León.- Sinodal
C.c.p.- Archivo
DC'MCML/MO'MACA/lkrd*



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura del
Área de Estudios
de Posgrado



ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 14:00 horas del día 12 del mes de marzo de 2020 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

"Aislamiento y caracterización de una cepa de *Lactobacillus sp* y evaluación del efecto de su administración después de un tratamiento con antibióticos en ratones Balb/c"

Presentada por el alumno (a):

Hernández	Hernández	Maloy
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)
Con Matricula		

1	8	1	E	5	7	0	0	5
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:

Maestra en Ciencias Biomédicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

COMITÉ SINODAL

Dra. Leova Pacheco Gil
Dr. Xavier Miguel Boldo León
Dra. Hidemi Aguilar Mariscal
Directores de Tesis

 Dra. Isela Esther Juárez Rojop	 Dr. Jorge Luis de Castillo
 Dra. Hidemi Aguilar Mariscal	 Dra. Leova Pacheco Gil
 Dr. Xavier Miguel Boldo León	



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Dirección



Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 10 del mes de marzo del año 2020, el que suscribe, Maloy Hernández Hernández, alumno del programa de la Maestro en Ciencias en Salud Pública con énfasis en Administración de los Servicio de Salud, con número de matrícula 181E57005 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: **"Aislamiento y caracterización de una cepa de *Lactobacillus sp* y evaluación del efecto de su administración después de un tratamiento con antibióticos en ratones Balb/c"**, bajo la Dirección de la Dra. Leova Pacheco Gil, el Dr. Xavier Miguel Boldo León y la Dra. Hidemi Aguilar Mariscal, Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31. El alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: Nut14.maloyhdez@hotmail.com. Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Maloy Hernández Hernández

Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS DE LA SALUD



JEFATURA DEL ÁREA DE
ESTUDIOS DE POSGRADO

Sello

Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura, Col. Magisterial, C.P. 86040 Villahermosa, Tabasco
Tel. (993) 358.15.00 Ext. 6134

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genómica del centro de investigación y en la Unidad de Producción y Cuidado Animal (UPCEA) de la División Académica de Ciencias de la Salud (DACS-UJAT), bajo la dirección y financiamiento de la Dra. Leova Pacheco Gil, el Dr. Xavier Miguel Boldo León y la Dra. Hidemi Aguilar Mariscal. Además del apoyo proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de Maestría No. 889624.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero mostrar mi gratitud a mis formadores y asesores de tesis la **Dra. Leova pacheco Gil**, al **Dr. Xavier Miguel Boldo León** y a la **Dra. Hidemi Aguilar Mariscal**, por guiarme y permitir llevar a cabo y culminar con éxito este trabajo de investigación.

A la **Dra. Araceli Olivares Guerrero**, por brindarme las facilidades para realizar los experimentos de mi trabajo de investigación, en la Unidad de Producción, Cuidado y Experimentación Animal (UPCEA) de la División Académica de Ciencias de la Salud.

A los encargados de laboratorio de Microbiología al **MCB David del Valle Laveaga**, al **QFB. Luis Enrique Cortes Sánchez** y a la **Mtra. Fanny Carrera** por permitirme el ingreso a sus instalaciones, uso material y de equipo de esterilización.

A la **Dra. Angela Ávila Fernández**, por facilitarme el uso de sus equipos de laboratorio.

A la **Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola** y a la **Dra. Aracely Contreras Rodríguez** por abrirme las puertas de sus laboratorios (Bacteriología Médica y microbiología General) durante mi estancia en el Departamento de microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; de donde obtuve conocimientos muy enriquecedores.

A **mis sinodales**, por haber aceptado ser parte de este momento importante, por sus consejos y apoyo para mejorar cada día como persona y en mi Proyecto de investigación.

A **mis Maestros de posgrado**, por el tiempo y esfuerzo que dedicaron al compartir sus conocimientos, sin su instrucción profesional no habría llegado a este nivel.

A la **Dra. Isela Juárez Rojop** coordinadora de Maestría y posgrado; por su paciencia y dedicación.

¡Gracias!

Dedicatorias

A Dios:

Por darme vida, salud y sabiduría a lo largo de la maestría, acompañándome aun cuando los caminos se tornan difíciles y por ofrecerme en esos momentos serenidad, paz y confianza para lograr mis objetivos.

A mis padres y hermanos:

Que sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida profesional. Mama, gracias por estar en esta etapa de mi posgrado, a ti te debo la tranquilidad durante la maestría; al estar al tanto en el cuidado de mi pequeña Mia; Papa por compartir tus experiencias, conocimientos y consejos. Tener su apoyo moral y de aliento es de suma importancia para mí. Hermanos: por apoyarme cada uno en su momento, cuando más lo necesitaba, y por ser parte de mi vida.

A mi hija Mia Victoria, mi fiel compañera en el trayecto de la Maestría; te conocí cuando menos lo esperaba, pero llegaste a mi cuando más te necesitaba, gracias por ser mi pedacito de cielo y alegrarme cada día con tu amor, paciencia y esencia. Me motivas para seguir adelante.

A mi compañero de vida, Carlos Alberto; por tu amor, apoyo, consejo y paciencia durante estos 2 años; por alentarme a diario para mejorar como persona y superarme académicamente.

Con cariño a mi compañero de Maestría **José Antonio Morales** Contreras, por su apoyo incondicional durante los días de trabajo.

De manera muy especial a la **QBP Liliana Camacho** por su amistad, tiempo y paciencia, durante mi estancia en el laboratorio de bacteriología medica de la ENCB-IPN.

ÍNDICE

Índice general.....	I
Lista de tablas.....	III
Lista de figuras.....	IV
Abreviaturas.....	V
Glosario de términos.....	VI
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción.....	1
1.1. Sistema digestivo.....	1
1.2. Motilidad intestinal.....	1
1.2.1. Segmentación y mezcla.....	2
1.2.2. Motilidad colónica.....	2
1.2.3. Factores que regulan la motilidad intestinal.....	3
1.3. Defecación.....	3
1.3.1. Mecanismo de defecación.....	4
1.3.2. Disfunción de la motilidad gastrointestinal.....	4
1.4. Sistema nervioso entérico.....	5
1.5. Sistema inmune intestinal.....	5
1.5.1. Sistema inmune innato.....	6
1.5.2. Sistema inmune adaptativo.....	6
1.6. Microbiota intestinal.....	8
1.6.1. Barrera microbiana.....	11
1.6.2. Eje intestino-cerebro.....	15
1.7. Disbiosis.....	18
1.8. Probióticos.....	24
1.8.1. Actividad de los probióticos sobre la microbiota intestinal.....	27
1.8.2. Adhesión a la mucosa gastrointestinal.....	28
1.8.3. Actividad antitumoral.....	28
1.8.4. Efecto reductor del colesterol.....	30
2. Planteamiento del problema.....	31
3. Justificación.....	32
4. Hipotesis.....	33
5. Objetivos.....	34
5.1. Objetivo general.....	34

5.2. Objetivos específicos.....	34
6. Materiales y métodos.....	35
6.1. Tipo de estudio.....	35
6.2. Aislamiento y caracterización de una cepa de <i>Lactobacillus</i> sp de una presentación comercial.....	35
6.3. Animales y fármacos.....	38
6.4. Diseño experimental.....	39
6.4.1. Evaluación de la cantidad de <i>Lactobacillus</i> sp durante el tratamiento con antibiótico y/o probiótico.....	41
6.4.2. Evaluación de la frecuencia de evacuación y porcentaje de humedad en heces de ratones Balb/c.....	41
6.4.3. Evaluación del tránsito gastrointestinal en ratones Balb/c.....	42
6.4.4. Evaluación del tránsito rectal en ratones Balb/c.....	43
6.5. Operacionalización de variables.....	44
6.6. Aspectos éticos.....	45
6.7. Análisis estadístico.....	46
7. Resultados.....	47
7.1. Caracterización de una cepa de <i>Lactobacillus</i> sp a partir de una mezcla de probióticos comercial.....	47
7.2. Evaluación de la cantidad de <i>Lactobacillus</i> sp durante el tratamiento con antibiótico y/o probiótico.....	49
7.3. Medición de la frecuencia de evacuación y porcentaje de humedad en heces de ratones Balb/c después del tratamiento con antibióticos y/o probiótico	51
7.3.1. Curso temporal de evacuaciones.....	52
7.4. Evaluación del tránsito gastrointestinal y rectal en ratones Balb/c después del tratamiento con antibióticos y/o probiótico.....	55
8. Discusión.....	57
9. Conclusiones.....	63
10. Perspectivas.....	64
11. Referencias bibliográficas.....	65
12. Anexos.....	70

Índice de tablas

Tabla 1.	Antibióticos administrados durante el tratamiento y mecanismo de acción.	39
Tabla 2.	Diseño experimental: dosis y periodo de administración oral.	40
Tabla 3.	Variables de trabajo y unidades de medición para la recolección de los datos.	44
Tabla 4.	Resultados de las características morfológicas, fisiológicas y condiciones medio-ambientales de la cepa en estudio.	47
Tabla 5.	Resultados obtenidos de la recolección de muestras de cada grupo en las tres etapas de cada tratamiento.	49
Tabla 6.	Tabla general de resultados.	51
Tabla 7.	Resultados de la frecuencia de evacuación: número de pellets durante 8 horas.	53
Tabla 8.	Comparación de diversos autores con el presente trabajo.	62

Índice de figuras

Figura 1.	Influencia de la microbiota intestinal en la tolerancia inmune y adaptativa.	8
Figura 2.	Vías de comunicación eje intestino-cerebro.	16
Figura 3.	Mecanismos por los cuales las bacterias probióticas pueden influir en la microbiota intestinal y sus efectos benéficos.	29
Figura 4.	Porta objeto con las muestras de <i>Lactobacillus sp</i> y espectrómetro de masas (Vitek ms)	38
Figura 5.	Diseño experimental (grupos, tipos y periodos de tratamiento).	40
Figura 6.	Prueba de frecuencia y porcentaje de humedad.	42
Figura 7.	Prueba del tránsito gastrointestinal total.	43
Figura 8.	Prueba de tránsito rectal: a) Introducción de la perla de acrílico. b) Expulsión de la perla de acrílico.	43
Figura 9.	Espectro proteico del <i>Lactobacillus plantarum</i> .	48
Figura 10.	Resultado del conteo de unidades formadoras de colonias por gramo de heces.	50
Figura 11.	Resultado del número de evacuaciones por grupo durante 8 horas.	52
Figura 12.	Curso temporal de evacuaciones.	54
Figura 13.	Porcentaje de agua en heces por grupo.	54
Figura 14.	Tiempo transcurrido hasta la expulsión del pellet color azul	55
Figura 15.	Resultado del tiempo de motilidad rectal.	56

Abreviaturas

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BAL: Bacterias ácido lácticas

BER: Ritmo eléctrico básico

CD: Células dendríticas

ETEC: *Escherichia coli* entero toxigénica

GALT: Tejido linfático de la mucosa gastrointestinal

ICC: Células intersticiales de cajal

ICD: Infección por *Clostridium difficile*

MALT: Tejido linfático relacionado con la mucosa.

MMC: Complejo motor migratorio (migrating motor complex)

MRS: Man Rogosa Sharp

SNE: Sistema nervioso entérico

STC: Estreñimiento de tránsito lento

TGI: Tracto gastrointestinal

TLR: Receptor Toll

UFC: Unidades formadoras de colonias

Glosario de términos

Antibiótico: Molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos.

Constipación: Retardo o la incapacidad en la defecación, por un período de más de dos semanas.

Diarrea: Deposición, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas.

Dieta: "Régimen de vida". Pauta que una persona sigue en el consumo habitual de alimentos.

Disbiosis: Desequilibrio de la microbiota intestinal.

Estreñimiento: Trastorno caracterizado por una dificultad persistente para defecar o una sensación de que la defecación es aparentemente incompleta y/o movimientos intestinales infrecuentes (cada 3–4 días o con menor frecuencia) en ausencia de síntomas de alarma secundarias.

Fármaco: Agente químico que afecta el protoplasma de organismos vivos

Fermentación: Proceso en que los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de la utilización de sustancias orgánicas en ausencia o presencia de oxígeno.

Gnotobiótico: Animales con una microbiota conocida, que se han obtenido a partir de animales libres de microorganismos. Se utilizan para el estudio de las funciones de la microbiota normal.

Metabolismo: Conjunto de reacciones acopladas y simultáneas, en la que se sintetiza y degradan compuestos necesarios en los organismos.

Microbiota intestinal: Microorganismos vivos (bacterias, arqueas, hongos, protozoos y virus) que habitan en el tracto gastrointestinal.

Patobionte: Microorganismos endógenos benignos que tienen la capacidad, en condiciones de un ecosistema alterado (disbiosis), de provocar determinadas patologías.

Prebiótico: Ingredientes dietéticos fermentados selectivamente que resultan en cambios específicos en el consumo y / o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios a la salud del huésped.

Probiótico: microorganismos vivos, cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficio a la salud del huésped.

Resumen

La administración de antibióticos disminuye la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal, y el uso de probióticos puede mitigar la disbiosis, favoreciendo la recuperación de los microorganismos benéficos. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar una cepa de *Lactobacillus sp* y evaluar su efecto después de la administración de un tratamiento con antibióticos en ratones Balb/c; se seleccionaron 6 colonias de *Lactobacillus sp* y se realizó la caracterización. Posteriormente, se realizó un diseño experimental con 4 grupos de ratones Balb/c (n= 8): Solución salina (SS), Probiótico (P), Antibiótico (A) y antibiótico-probiótico (A-P). El grupo P, recibió probiótico durante dos semanas, el grupo A, una mezcla de antibióticos (ampicilina, metronidazol, gentamicina y vancomicina) durante 4 semanas. El grupo A-P recibió el mismo tratamiento antibiótico y enseguida, *Lactobacillus plantarum* durante 2 semanas. Todas las administraciones fueron por vía oral. Se aplicó la prueba de ANOVA y se consideró una diferencia significativa entre los grupos $p \leq 0.05$. Resultados: Se identificó una cepa de *Lactobacillus plantarum*. El grupo tratado con antibióticos (A) disminuyó el número de UFC/g en heces, la frecuencia de evacuación, y el tiempo de motilidad colónica. Cambios revertidos al administrar la cepa de *Lactobacillus plantarum*, en los grupos A-P. Conclusión: la administración del antibiótico disminuyó significativamente el número de *Lactobacillus sp*, en heces del ratón Balb/c, y se recuperó rápidamente de manera significativa posterior a la administración del probiótico. La motilidad intestinal se normalizó, al igual que el porcentaje de humedad en heces posterior al tratamiento con *Lactobacillus plantarum*.

Abstract

The administration of antibiotics reduces the richness and diversity of the intestinal microbiota, and the use of probiotics can mitigate dysbiosis, favoring the recovery of beneficial microorganisms. The aim of the study was to isolate and characterize a strain of *Lactobacillus* sp and to evaluate its effect after administration of antibiotic treatment in Balb/c mice, 6 *Lactobacillus* sp colonies were selected and characterization was performed. Subsequently, an experimental design was carried out with 4 groups of Balb / c mice (n = 8): Saline solution (SS), Probiotic (P), Antibiotic (A) and antibiotic-probiotic (A-P). Group P received probiotic for two weeks, group A, a mixture of antibiotics (ampicillin, metronidazole, gentamicin and vancomycin) for 4 weeks. The A-P group received the same antibiotic treatment and then *Lactobacillus plantarum* for 2 weeks. All administrations were oral. The ANOVA test was applied and a significant difference between the groups of $p \leq 0.05$ was considered. Results: A strain of *Lactobacillus plantarum* was identified. The group treated with antibiotics (A) decreased the number of CFU / g in stool, the frequency of evacuation, and the time of colonic motility. Reversed changes when administering the *Lactobacillus plantarum* strain, in groups A-P. Conclusion: the administration of the antibiotic significantly decreased the number of *Lactobacillus* sp, in feces of the Balb / c mouse, and recovered significantly after the administration of the probiotic significantly. Intestinal motility was normalized, as was the percentage of moisture in the faeces after treatment with *Lactobacillus plantarum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema digestivo

El sistema digestivo del organismo que procesa la comida, extrae nutrientes de ella y elimina los residuos. Realiza esto en cinco etapas:

1. Ingestión: la introducción selectiva de alimentos en el cuerpo.
2. Digestión: el desdoblamiento mecánico (cortar y moler) y químico (reacciones de hidrólisis) de los alimentos en una forma estable para el cuerpo.
3. Absorción: la recaptura de moléculas de nutrientes en las células epiteliales del tubo digestivo y luego en la sangre o linfa. Algunos nutrientes son absorbidos sin digerirse: vitaminas, aminoácidos libres, minerales, colesterol y agua.
4. Compactación: absorción de agua y consolidación del residuo indigerible en heces.
5. Defecación: eliminación de heces (Kenneth, 2017).

1.2. Motilidad intestinal

El tránsito intestinal es la consecuencia funcional de las contracciones intestinales tónicas y fásicas, y se refleja en el tiempo que tardan los contenidos intraluminales en atravesar el tracto gastrointestinal (Dimidi, Christodoulides, Scott, & Whelan, 2017). La actividad peristáltica puede aumentar o disminuir por los impulsos nerviosos autónomos que llegan al intestino. El estiramiento local libera serotonina, la que activa a las neuronas sensoriales que a su vez activan al plexo mientérico. Las neuronas colinérgicas que siguen una dirección retrógrada en este plexo activan a las neuronas que

liberan la sustancia P y la acetilcolina, causando contracción del músculo liso. Al mismo tiempo, las neuronas colinérgicas que pasan en una dirección anterógrada activan a las neuronas que secretan óxido nítrico (NO), polipéptido intestinal vaso activo (VIP) y trifosfato de adenosina (ATP), produciendo la relajación adelante del estímulo (Ganong & Barrett, 2012).

1.2.1. Segmentación y mezcla

Cuando un alimento está presente en el intestino, el sistema nervioso entérico retarda el movimiento del contenido intestinal a lo largo del tubo digestivo para dar tiempo a la digestión y a la absorción; a esto, se le conoce como segmentación y permite la mezcla del contenido intestinal (conocido como quimo) con los jugos digestivos. Un segmento del intestino se contrae en ambos extremos y luego ocurre una segunda contracción en el centro del segmento para forzar el desplazamiento del quimo hacia atrás y hacia delante. Por consiguiente, a diferencia del peristaltismo, en la segmentación se presenta movimiento retrógrado del quimo de manera sistemática (Greenwood-Van Meerveld, Johnson, & Grundy, 2017).

1.2.2. Motilidad colónica

La motilidad de este segmento disminuye su velocidad para permitir que el colon absorba agua, Na⁺ y otros minerales. Al absorber casi 90% del líquido, las heces suelen constar de casi 75 % agua y 25 % sólidos. Los sólidos son casi 30 % bacterias, 30 % fibra dietética no digerida, 10 a 20 % de grasa y pequeñas cantidades de proteínas, células epiteliales desprendidas, sales, moco y otras secreciones digestivas (Ganong & Barrett, 2012; Kenneth, 2017). Los movimientos del colon incluyen las contracciones de segmentación y ondas

peristálticas, para facilitar la absorción. Estas contracciones desplazan el material hacia el recto, y la distensión rectal inicia el reflejo de defecación (Ganong & Barrett, 2012).

1.2.3. Factores regulan la motilidad intestinal

El control neural aferente y eferente se proporciona a través de la interacción del intestino con el sistema nervioso central (SNC) a través de neuronas somáticas o autónomas [sistema nervioso autónomo (SNA)], y la comunicación entre diferentes partes del intestino se logra mediante la transmisión de miogénico y señales neurogénicas a lo largo del intestino a través del sistema nervioso entérico (SNE) y mediante arcos reflejos a través de neuronas autónomas. Simultáneamente, el sistema inmunitario, las secreciones intestinales, la microbiota gastrointestinal y los productos de fermentación interactúan y modulan la motilidad intestinal (Dimidi et al., 2017)

1.3. Defecación

Es el acto de expulsar las heces del tracto digestivo a través del ano. Es una función compleja que requiere una participación coordinada del sistema gastrointestinal, el sistema nervioso y el sistema musculo esquelético (Palit, Lunniss, & Scott, 2012). La frecuencia de defecación dentro de un período de 24 horas varía según la edad y la dieta. La defecación es necesaria para expulsar del cuerpo porciones no digeridas de alimentos además de productos de desecho metabólico como la estercobilina en forma de heces. Las heces también contienen bacterias y restos celulares del tracto gastrointestinal (Ganong & Barrett, 2012).

1.3.1. Mecanismo de defecación

El llenado rectal activa los mecanorreceptores en la pared rectal causando conciencia de la necesidad de defecar. En este momento, la contracción de los músculos abdominales se relaja, simultáneamente el esfínter anal externo y el músculo puborectal expulsan las heces del cuerpo debido al gradiente de presión generado entre el recto y el canal anal. Después de la expulsión fecal, se produce el reflejo de cierre, que implica que el esfínter anal externo recupera su tono para mantener la continencia en reposo (Palit et al., 2012; Thiruppathy, Mason, Akbari, Raeburn, & Emmanuel, 2017).

1.3.2. Disfunción de la motilidad gastrointestinal

Una de las disfunciones de la motilidad puede ser reflejada por diarrea y/o estreñimiento:

La diarrea es un aumento en la frecuencia, liquidez o volumen de las heces. Subcategoriza en los siguientes tipos: Secretor (infeccioso), osmótico, inflamatorio y funcional. Se desconoce su etiología exacta, pero puede implicar alteraciones en la microbiota del intestino además del rápido tiempo de tránsito de los contenidos a través del tracto digestivo. (Basnayake, 2018; Lacy & Patel, 2017; Mawer & Alhawaj, 2019; Sweetser, 2012) Mientras que, el estreñimiento implica una disminución en la frecuencia de defecación, que generalmente ocurre 3 o menos veces por semana. Esto puede conducir al endurecimiento de las heces y al esfuerzo al intentar la defecación. Siendo un efecto secundario de muchos medicamentos; ser el resultado de una dieta baja en fibra o trastornos que interrumpen las contracciones musculares necesariamente coordinadas para la defecación (Jamshed, Lee, & Olden,

2011). Además de la disfunción del músculo liso del colon o inervación neural, lo que resulta en anomalías motoras del colon neural (Dimidi et al., 2017).

1.4. Sistema nervioso entérico

Dos redes principales de fibras nerviosas son intrínsecas al tubo digestivo: el plexo mioentérico (plexo de Auerbach), y el plexo submucoso (plexo de Meissner), por lo general aumenta la actividad del músculo liso intestinal y reduce la actividad noradrenérgica simpática a la vez que produce la contracción de los esfínteres. (Romero-Trujillo et al., 2012). El SNE puede funcionar independientemente del SNC y contiene las vías reflejas asociadas con la función motora y sensorial normal del intestino. Además, los productos metabólicos de la fermentación gastrointestinal de microbiota, como los AGCC (ácidos grasos de cadena corta) o los péptidos pueden estimular la SNE y afectar el tránsito intestinal. También se ha demostrado que el sistema neuroendocrino del intestino interactúa con la microbiota a través de la serotonina [5-hidroxitriptamina (5-HT)]. El 5-HT se produce tanto en el SNE como en el SNC y es un neurotransmisor clave que desempeña un papel fundamental en la mediación de las respuestas motoras y secretoras en el SNE. La 5-HT estimula los reflejos nerviosos entéricos locales para iniciar la secreción y la motilidad propulsora y actúa sobre los aferentes vágales para modular las actividades contráctiles (Dimidi et al., 2017).

1.5. Sistema inmune intestinal

El tejido linfoide a la mucosa gastrointestinal (GALT) se clasifica en difuso y organizado. El organizado está conformado por placas de Peyer, los ganglios linfáticos mesentéricos y los folículos linfoides de la pared intestinal. El difuso

por su parte, es un sistema no organizado de células individuales distribuidas a lo largo del tubo digestivo: linfocitos intraepiteliales, células M y el propio enterocito (Ahluwalia, Magnusson, & Öhman, 2017).

1.5.1. Sistema inmune innato

Es el sistema de defensas que nos protege de manera inespecífica contra los microorganismos, constituye la primera línea de defensa frente a bacterias gastrointestinales y sus metabolitos. Está conformado por un mecanismo de la inmunidad constitutiva (procesos mecánicos con los movimientos peristálticos y la integridad de la barrera epitelial) y respuestas innatas (enzimas, proteínas, antimicrobianos, sistema del complemento y diferentes tipos celulares como células dendríticas (CD), macrófagos, células linfoides innatas (ILC) y el propio enterocito) (Ahluwalia et al., 2017; Smolinska, Groeger, & O'Mahony, 2017). El macrófago favorece la producción de péptidos antimicrobianos importantes en el mantenimiento del equilibrio entre la barrera epitelial y las bacterias comensales. El enterocito, aunque no es un miembro del sistema inmune innato, posee funciones de barrera, de producción y secreción de péptidos antimicrobianos, y se ha visto que la microbiota comensal de intestino regula la expresión de dichos péptidos Y la producción de mucina por las células caliciformes es favorecida por la presencia de ciertos bacilos. (Smolinska et al., 2017).

1.5.2. Sistema inmune adaptativo

Tiene como objetivo la protección a largo plazo, a través del desarrollo de la memoria inmunológica, permitiendo una respuesta mejor y eficaz. En el tubo digestivo, las células reciben señales del sistema inmune innato para difundir la

respuesta por parte de los linfocitos ante la presencia de microorganismos comensales y sus metabolitos, para evitar daños en el organismo. Esto se desarrolla a través de la inmunidad humoral (linfocito B y su producción de anticuerpos y linfocito T). El epitelio intestinal contiene una numerosa población de linfocitos llamados intraepiteliales, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del tubo digestivo adyacentes al enterocito. Debido a esto, tiene contacto directo con los antígenos lumenales. Siendo importante en la función del mantenimiento y protección de la barrera intestinal, además de participar en la generación de la función reguladora de otras células (Steinert, Radulovic, & Niess, 2016). Los linfocitos B, limitan la agresividad de las respuestas inflamatorias, favoreciendo un ambiente tolerogénico a través de la producción de interleucina 10 (IL10) e IgA. Los lactobacilos intestinales favorecen la producción de IgA por los linfocitos B de la lámina propia y las placas de Peyer. La IgA tiene la capacidad de unirse a ciertos componentes de la microbiota regulando así su adherencia a las células epiteliales, neutralizando sus toxinas y modulando la respuesta inflamatoria (Frei, Akdis, & O'Mahony, 2015; Sampson et al., 2018).

Estas propiedades permiten un aumento en la diversidad de la microbiota reforzando así la relación de simbiosis entre la microbiota y el hospedero. Por último, las células Natural Killer, consideradas mediadores centrales de inflamación, bajo la influencia de la microbiota y algunos de sus metabolitos pueden ejercer propiedades antiinflamatorias. Observado en la Figura 1. (Ahluwalia et al., 2017; Steinert et al., 2016).

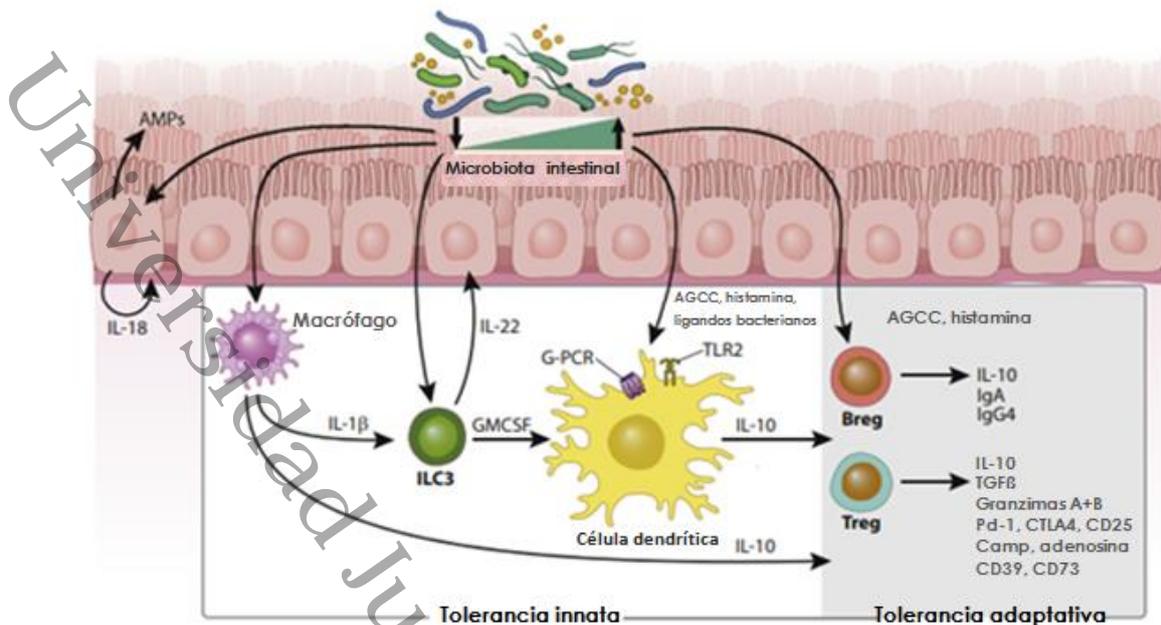


Figura 1. Influencia de la microbiota en la tolerancia inmune y adaptativa. Fuente: Sampson *et al.*, 2018.

1.6. Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal constituye el hogar de una enorme y compleja población de bacterias, conocida como microbiota intestinal, esta comunidad interactiva de microorganismos vivos que habitan en el tracto gastrointestinal, se encuentra constituida por bacterias, células eucariotas y virus; caracterizada por su diversidad y significativa función de homeostasis y participación en la inmunidad del intestino, lo que resulta de gran impacto sobre la salud (Cui, Morris, & Ghedin, 2013). Además, estos comensales contribuyen de manera importante en muchos procesos fisiológicos: digestión, producción de nutrientes, entre otros.

El TGI humano alberga cerca de 100 trillones de microorganismos, la mayoría a nivel del colon, donde la densidad es de cerca de 10^{12} bacterias por gramo del contenido colónico. Pertenecen a 6-10 diferentes filos y cerca de 5000

especies. Aunque las especies residentes varían de un individuo a otro, solo un individuo contiene aproximadamente 160 especies diferentes. El intestino grueso alberga casi 800 especies de bacterias (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turróni, Mahony, Belzer, Delgado Palacio, et al., 2017).

El principal filo bacteriano que se detecta en las heces son *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Los géneros clave dentro de *Bacteroidetes* incluyen *Alistipes*, *Bacteroides* y *Prevotella* y los géneros clave dentro de *Firmicutes* incluyen *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Blautia*, *Roseburia*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium*. Otros filos de menor abundancia que residen en el tracto gastrointestinal humano incluyen *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*), *Verrucomicrobia* (*Akkermansia*) y *Proteobacteria* (*Escherichia*) (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turróni, Mahony, Belzer, Delgado Palacio, et al., 2017).

Las bacterias intestinales predominantes parecen ser relativamente estables en el tiempo en adultos. Sin embargo, los estudios observacionales han demostrado la variabilidad inter e intraindividual en la composición de la microbiota intestinal, que puede ocurrir secundariamente a factores externos como la edad, el sexo entre 9 y 11 años, antibióticos, enfermedades y la dieta (Power, O'Toole, Stanton, Ross, & Fitzgerald, 2014). Existe una relación de beneficio mutuo con muchas de ellas; se les proporciona espacio y sustento y, a cambio, proporcionan nutrientes de la comida, aquellos para los que el cuerpo humano no tiene el equipo necesario para extraerlos por su cuenta. Por ejemplo, digieren celulosa, pectina y otros polisacáridos vegetales para los cuales no hay enzimas digestivas, y se absorben los azúcares resultantes. Debido a estas bacterias se obtienen más nutrientes del alimento de los que

se obtendrían sin ellas. Por cierto, una persona puede obtener más calorías que otra de la misma cantidad de comida debido a diferencias en su población bacteriana. Algunas bacterias también sintetizan vitaminas B y vitamina K, que se absorben en el colon. La vitamina K es muy importante porque, en general, la sola dieta no proporciona la cantidad suficiente para asegurar una coagulación adecuada.

Existen muchos factores ambientales que contribuyen a la composición tan variable de la microbiota intestinal entre individuos. Los que se han estudiado son la duración del embarazo, la vía de nacimiento, el tipo de alimentación (principalmente en los primeros años de vida), el número de hermanos, el estilo de vida, el uso de ciertos fármacos como los antibióticos, antiácidos e inhibidores de la bomba de protones. El momento en que inicia la colonización bacteriana es el punto clave para la formación inmunológica; se cree que esta transmisión de microbios se inicia al final del embarazo, ya que algunos estudios han demostrado que el meconio contiene bacterias Gram positivas y Gram negativas, y continúa en el momento del parto (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turroni, Mahony, Belzer, Palacio, et al., 2017). De hecho, la ausencia de microbiota bacteriana durante este punto clave se ha asociado con el desarrollo de enfermedades como obesidad, diabetes mellitus (DM) tipo 2 e hipertensión arterial, así como enfermedades autoinmunes y alergias. El tipo de alimentación es otro factor importante, dietas ricas en grasa y azúcar alteran la composición y diversidad de la microbiota, afectando así a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), indispensables en el proceso de maduración del sistema inmune intestinal. En pacientes obesos se ha

observado una relación *Bacteroidetes/ Firmicutes* disminuida (Azad, Kalam, Sarker, Li, & Yin, 2018).

La interacción entre la microbiota intestinal y la mucosa intestinal tiene un papel bien establecido en la homeostasis del huésped, y la presencia de enfermedades se ha asociado con cambios o desequilibrio en la composición y función de la microbiota intestinal. Por ejemplo, se sabe que la infección por *Clostridium difficile* (ICD) constituye una de las infecciones nosocomiales más frecuentes; siendo una bacteria gram positiva anaerobia que germina en un estado de disbiosis por ejemplo después de un tratamiento transitorio con antibióticos lo cual le proporciona el nicho ecológico adecuado para su expansión. En condiciones normales *C. difficile* se encuentra en el 50% de niños sanos. Generalmente, la microbiota normal impide la proliferación de *Clostridium* mediante el agotamiento de nutrientes tales como N-Acetilglucosamina y ácido N-Acetil neuramínico de la mucosa intestinal, y la transformación de ácidos biliares de secundarios a primarios. La ICD puede manifestarse por diarrea y evolucionar a cuadros graves con complicaciones de colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico y perforación con sepsis (Ng et al., 2013).

1.6.1. Barrera microbiana

Cuando los microorganismos patógenos ingresan al lumen intestinal se encuentran con una extensa población de microorganismos que constituyen la microbiota intestinal. Dado que estos microorganismos viven en equilibrio con las células del epitelio intestinal, las bacterias patógenas deben competir con ellos para lograr subsistir en la luz del intestino. En la mayor parte de los casos

el microbioma tiene éxito al evitar la colonización patógena, de ahí que muchas de las infecciones gastrointestinales ocurran como consecuencia de una pérdida de la microbiota intestinal normal (Malago, 2014). Se ha documentado que *L. rhamnosus* y *L. casei* evitan la adhesión de *Escherichia coli* y especies de *Salmonella* a través de su unión a carbohidrato. Además de competir por los sitios de unión, las bacterias patógenas compiten por los nutrientes. Por ejemplo, los *Lactobacillus* se alimentan de carbohidratos simples derivados del metabolismo de carbohidratos complejos, lo que permite que se asienten en zonas específicas del tracto gastrointestinal donde compiten con las bacterias patógenas. Especies específicas de lactobacilos como *Lactobacillus acidophilus* y *plantarum*, pueden metabolizar carbohidratos más complejos, como fructanos, extendiendo el nicho de colonización. Las bifidobacterias, por su parte son capaces de utilizar fibra dietética como fuente de energía, lo cual les permite colonizar una mayor extensión del colon donde inhiben las infecciones bacterianas. Como consecuencia de la fermentación de carbohidratos, la microbiota produce ácidos orgánicos que disminuyen el pH intestinal creando una barrera acida para los microorganismos patógenos. Esta acidez es bactericida para especies de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*, así como *Vibrio cholerae*. Además, a través del reconocimiento por los TLR, la microbiota es capaz de aumentar la expresión de moléculas como claudina, ocludina y *zónulaoccludens*, importantes en la formación de las uniones estrechas epiteliales. (Frei et al., 2015)

La microbiota intestinal interactúa con el sistema inmune de la mucosa intestinal a diferentes niveles para generar la inducción de la tolerancia. Los metabolitos derivados de la microbiota inducen la activación del inflammasoma

en las células epiteliales, favoreciendo la liberación de IL-18 y la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP), incrementando la barrera intestinal. Las ILC3 producen IL-22, que incrementa la barrera epitelial a través de la producción de moco y péptidos antimicrobianos. La IL-1b derivada de los macrófagos promueve la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos a través de las ILC-3, favoreciendo una mayor secreción de IL-10 y ácido retinoico a través de las CD, que son esenciales para la inducción de células B reguladoras (Breg) (linfocitos Breg) y linfocitos Treg. Las CD de la mucosa pueden ser activadas directamente por los metabolitos de la microbiota, como los AGCC y la histamina, a través de receptores acoplados a proteínas G. los ligandos derivados de las bacterias pueden activar la CD directamente a través de los receptores de patrones de reconocimiento, especialmente los TLR-2. Los macrófagos de la mucosa secretan también grandes cantidades de IL-10 contribuyendo igualmente a los estados de tolerancia. La microbiota también tiene efectos directos sobre las células Breg y Treg. Los AGCC y la histamina promueven la diferenciación hacia células reguladoras y la activación de TLR-9 en los Breg, favorece mayor producción de IL-10 (Abrahamsson, Wu, & Jenmalm, 2015; Frei et al., 2015)

Además de los mecanismos ya comentados, la microbiota es fuente de un gran número de metabolitos que contribuyen al desarrollo y regulación del sistema inmune a través de sus efectos sobre la diferenciación, proliferación, migración y funciones efectoras. Los ácidos grasos insaturados omega 3 y omega 4 son sustancias que actúan como fuente de energía, pero también regulan funciones del sistema inmune. Omega 6 estimula la expresión de proteínas importantes en las uniones estrechas del epitelio intestinal, mejorando así la función de

barrera. Además, puede inhibir la expresión de un factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de células B activadas (NFκB) a través de la vía MEK-ERK. Por su parte, omega 3 puede inhibir la activación del inflamasoma en los macrófagos. Esta característica le confieren propiedades antialérgicas y antiinflamatorias (Costantini, Molinari, Farinon, & Merendino, 2017). Los AGCC (acetato, propionato y butirato), por su parte, regulan el funcionamiento de las CD favoreciendo su capacidad fagocítica y disminuyen en su función efectora de tipo Th2. Específicamente el butirato y el propionato han demostrado inducir la diferenciación de los linfocitos T reguladores. Estos ácidos grasos provienen de la fermentación de los polisacáridos, principalmente por parte de especies de *clostridia*, *bacteroidetes*, *firmicutes* y *Bifidobacteria* (Shibata, Kunisawa, & Kiyono, 2017).

Las bacterias comensales del intestino pueden sintetizar vitaminas esenciales como la vitamina K y las pertenecientes a la familia del complejo B. Además de sus funciones como nutrientes esenciales, las vitaminas también han demostrado tener efectos inmuno-reguladores. Los linfocitos Treg, por ejemplo, expresan receptores para la vitamina B9. Está demostrado ser indispensable en la supervivencia de linfocitos Treg, además de participar en el proceso de inmuno vigilancia a nivel intestinal a través de las células T invariantes. Se ha demostrado, además, que la deficiencia de folato con lleva a un estado de inflamación intestinal (Costantini et al., 2017; Shibata et al., 2017).

Por último, siete de los 20 aminoácidos esenciales son metabolizados por bacterias comensales: alanina, aspartato, cisteína, glutamato, ácido glutámico, glicina y triptófano. Muchos autores han demostrado la potencial influencia de los aminoácidos esenciales en el desarrollo, homeostasis y funcionamiento del

sistema inmune. La melanina, por ejemplo, es un metabolito del L-triptófano que previene la producción de las citocinas inflamatorias. La glutamina tiene la propiedad de disminuir la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias encargadas de la migración de linfocitos T a los ganglios mesentéricos, además de ser necesaria para la producción de IL-1. El triptófano ha demostrado en estudios *in vitro* inducir la producción de linfocitos Treg y disminuir las respuestas tipo Th2. Por ello los aminoácidos derivados del metabolismo de las bacterias de la microbiota tienen un papel en la regulación de la inmunidad intestinal (Rooks & Garrett, 2016).

1.6.2. Eje intestino-cerebro

El eje intestino-cerebro es un sistema de comunicación bidireccional e incluye el SNC, compuesto por el cerebro y la médula espinal, y el sistema nervioso entérico, que involucra nervios, hormonas y otras moléculas como los neuropéptidos y las citocinas. Los roles del eje cerebro-intestino son monitorear e integrar la función intestinal y mediar los efectos ambientales como el hambre, el estrés y las emociones en las funciones intestinales. El estrés y las emociones pueden reflejarse por cambios en la fisiología intestinal y los síntomas intestinales. Los microorganismos en el tracto GI están representados por una amplia variedad de especies bacterianas. Pueden ejercer numerosos efectos sobre el sistema neuroinmune intestinal e influir en una variedad de funciones del huésped, como la actividad metabólica, la respuesta inmune y la función fisiológica. Un gran número de investigaciones sugieren que la interacción huésped-microbiano puede resultar en funciones neuroinmunes desreguladas, impactando el comportamiento. Figura 2, (Saulnier et al., 2013; Sherwin, Sandhu, Dinan, & Cryan, 2016).

Las bacterias intestinales sintetizan aminoácidos gamma, ácido butírico, 5-HT, dopamina y AGCC, y estas sustancias se intercambian entre células de microorganismos, especialmente las células intestinales en el intestino produciendo 5-HT que tienen un efecto en el cerebro; las enzimas bacterianas también pueden producir productos de neurotoxinas como el ácido D-láctico y el amoníaco. Por lo tanto, la microbiota intestinal genera una gran cantidad de neurotransmisores necesarios, que ejercen influencia en el cuerpo humano, incluido el cerebro, entre los cuales muchos de los neurotransmisores en la microbiota intestinal humana también son moléculas críticas (H. X. Wang & Wang, 2016).

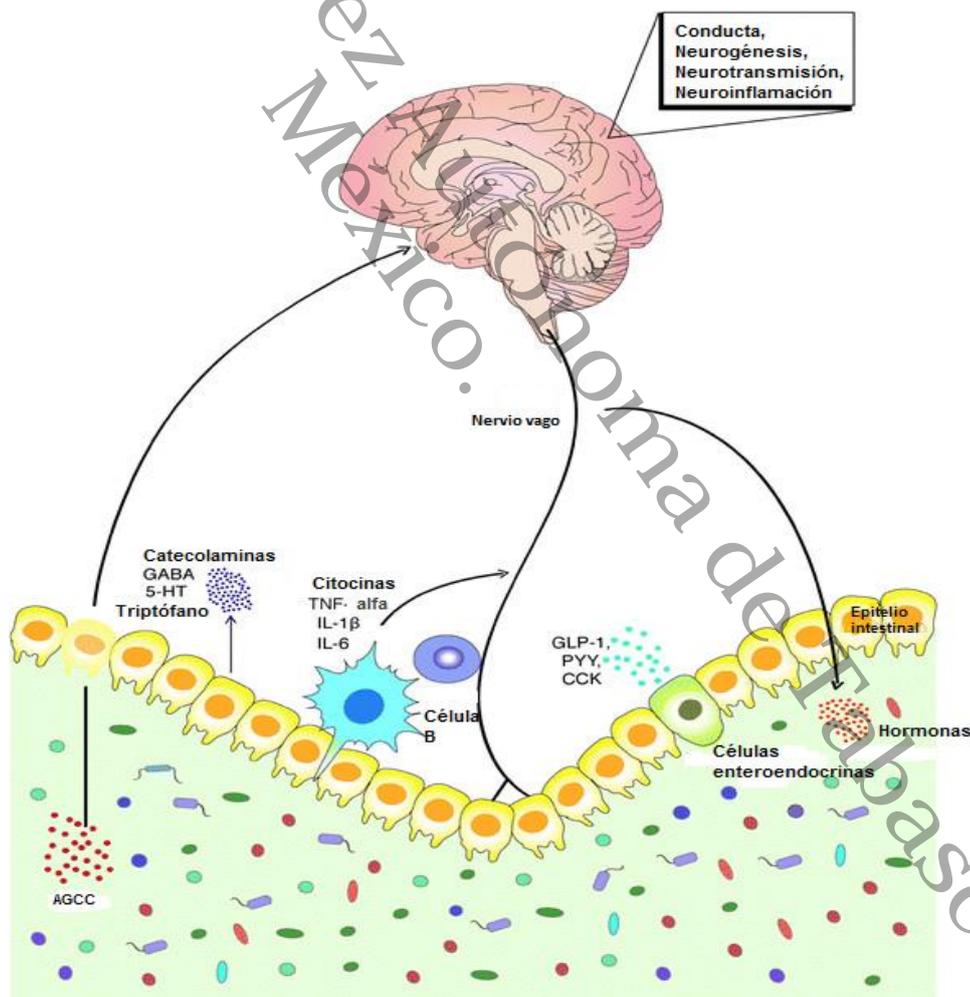


Figura 2. Vías de comunicación eje intestino - cerebro. Fuente: (Sherwin et al., 2016).

El intestino puede interactuar con el cerebro a través de dos vías neuroanatómicas. El primero es el intercambio mutuo de información directamente entre el intestino y el cerebro por el sistema nervioso autónomo (SNA) y el nervio vago (VN) en la médula espinal; otro es una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro a través de la bicomunicación entre el SNE en el intestino y el ANS y VN dentro de la médula espinal. Las vías anatómicas neurales para controlar las funciones intestinales forman una organización integradora jerárquica de cuatro niveles: el primer nivel es el ENS, que incluye ganglios mientéricos, ganglios submucosos y células gliales intestinales; el segundo nivel es ganglios prevertebrales que regulan las respuestas reflejas viscerales periférica. El tercer nivel es el SNA en la médula espinal (del nervio simpático T5-L2 y el sistema nervioso parasimpático S2-S4) y el núcleo del tronco encefálico tractus solitario y el núcleo motor dorsal de VN, que reciben y dan el origen de la fibra aferente y eferente de VN, respectivamente (Mulak & Bonaz, 2015). El efecto más importante del núcleo motor dorsal de VN es prominente en el tracto gastrointestinal superior, y las neuronas colinérgicas mientéricas del tracto gastrointestinal superior regulan el efecto de excitabilidad vagal; y el cuarto nivel son los centros cerebrales superiores. Información de la corteza y los centros subcorticales, incluidos los ganglios basales y los embudos hacia los núcleos peculiares del tronco encefálico. Los núcleos del tronco encefálico controlan muchas funciones intestinales. La fibra aferente de VN se detiene en el núcleo del tronco encefálico tractus solitarius, que luego da fibra hacia arriba y llega al tálamo, el lobo límbico y la corteza insular a través del núcleo parabraqial. La fibra aferente espinal sube hacia arriba dentro del tracto espinotalámico y el tracto

espinal hacia el tálamo (tracto espinotalámico) y el núcleo grácil y el núcleo cuneado de la médula oblonga (tracto espinal), respectivamente, luego proyecta la fibra al tálamo a través del lemnisco medial. La fibra se administra desde el tálamo y se proyecta hacia las áreas sensoriomotoras primarias y la corteza insular (Borre et al., 2014). La comunicación neural directa entre la microbiota intestinal y el cerebro se realiza principalmente a través de VN, es decir, las bacterias estimulan las neuronas aferentes de SNE, y la señal vagal del intestino puede estimular la respuesta antiinflamatoria, previniendo contra la posepticemia causada por microorganismos. Investigaciones posteriores mostraron que muchos efectos de la microbiota intestinal o los posibles probióticos sobre las funciones cerebrales eran independientes de la activación vagal, y que las bacterias asentadas en el intestino desempeñaban un papel fundamental en el desarrollo postnatal y la maduración del sistema inmune del individuo. sistema endocrino y el sistema nervios (Bauer, Huus, & Finlay, 2016).

1.7. Disbiosis

La disbiosis intestinal es el desequilibrio en la cantidad y proporción de los componentes de la microbiota normal debido a cambios cuantitativo o cualitativo de su composición y cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas. Se caracteriza por una reducción de los simbioses o microorganismos que tienen una relación de ayuda o coopera con otros microorganismos o con el hospedero y la expansión de los patobiontes o microorganismo que, en condiciones de un ecosistema alterado (disbiosis), tienen la capacidad de provocar enfermedades (Carding, Verbeke, Vipond, Corfe, & Owen, 2015). Langdon, Crook et al. 2016 menciona también que la disbiosis causada por los antibióticos se debe a diferentes factores como la

perdida de microorganismos benéficos, la dosis, sus diferentes mecanismos y espectros de acción, por la sobrevivencia de agentes patógenos que adquirieron capacidades genéticas para sobrevivir a diversos tratamientos con antibióticos de acuerdo a las dianas afectadas.

Causas de disbiosis:

Entre los factores ambientales externos que influyen de forma significativa sobre la microbiota se encuentra la vía de nacimiento, enfermedades infecciosas, la dieta, los factores genéticos, el uso de antibióticos y algunos fármacos (Peterson, Sharma, Elmén, & Peterson, 2015).

a) Embarazo

Hasta hace poco se pensaba que la colonización del tracto gastrointestinal iniciaba al nacer, sin embargo, un creciente cuerpo de evidencia científica ha descubierto indicios de presencia bacteriana en la placenta, el cordón umbilical y el líquido amniótico en embarazos sanos a términos (Aagaard et al., 2014). Estas observaciones sugieren que la exposición microbiana puede comenzar antes del nacimiento (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turrone, Mahony, Belzer, Delgado Palacio, et al., 2017).

b) Edad gestacional al nacer

Factor importante en el establecimiento de la microbiota intestinal. Se ha encontrado que los recién nacidos prematuros exhiben colonización intestinal tardía con microbios anaerobios comensales, como *Bifidobacterium* o *Bacteroides*, donde en cambio sus heces contienen niveles significativamente más altos de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* y otros microorganismos patógenos, a diferencia del material fecal de recién nacidos a término (Milani,

Duranti, Bottacini, Casey, Turrone, Mahony, Belzer, Delgado Palacio, et al., 2017).

c) Lactancia

Estudios comparativos de la microbiota intestinal entre niños alimentados con lactancia materna y con fórmulas artificiales, establecen que la leche humana provee al lactante de factores inmunológicos como inmunoglobulinas, citocinas, probióticos y prebióticos, que modulan la colonización de los microorganismos benéficos o patógenos. (La Rosa Hernández, Gómez Cabeza, & Sánchez Castañeda, 2014). Los lactantes alimentados con fórmula tienen niveles elevados de otras especies de bacterias, entre las que destacan *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* y *Lactobacillus* (Tojo et al., 2014).

d) Enfermedades infecciosas

Esta disbiosis conlleva a una depleción de bacterias anaerobias facultativas como *Bacteroides* y *Ruminococcus spp*, con *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*. Esta alteración en la composición microbiana reduce la capacidad metabólica de la microbiota y disminuye los niveles de AGCC, lo que conlleva un declive en la capacidad de defensa ante agentes patógenos y propicia el mantenimiento de estados de disbiosis (Pham & Lawley, 2014). Existen diferentes mecanismos mediante los cuales algunas bacterias patógenas ejercen efecto, como la alteración inmunológica alterada entre la microbiota y el intestino, y la translocación bacteriana en el contexto de un aumento de la permeabilidad intestinal y en la carga bacteriana intestinal ocasionando mala absorción y diarrea (de LeBlanc & LeBlanc, 2014; Markowiak & Śliżewska, 2017).

Los factores ambientales internos, como el pH, los niveles de oxígeno/estado redox, la disponibilidad de nutrientes, la actividad del agua y la temperatura, permite que varias poblaciones prosperen y ejerzan diferentes actividades al interactuar con su entorno (Markowiak & Śliżewska, 2017).

e) Dieta

Las dietas basadas en productos animales y las vegetarianas crean variaciones significativas en la microbiota intestinal (David et al., 2014). En niños africanos en los que la dieta se basa en el almidón, fibra y polisacáridos vegetales abundan las especies *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*; no así en los niños europeos, cuya dieta es rica en proteína animal, azúcar y almidón; estos grupos se encuentran reducidos a menos del 20%. En modelos animales se ha establecido que una dieta occidental provoca un incremento de *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroidetes* (Fan, Huo, Li, Yang, & Duan, 2014). La ausencia de nutrientes (vitaminas, polisacáridos complejos y algunos aminoácidos) a nivel intestinal favorecen el aumento de *Proteobacteria* propiciando una inflamación en la mucosa intestinal y un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal (Szychlinska, Di Rosa, Castorina, Mobasher, & Musumeci, 2019).

f) Factores genéticos

La genética de los seres humanos también influye en la composición de la microbiota. Un estudio en gemelos demostró que la abundancia de múltiples taxones está influenciada por factores genéticos (Goodrich et al., 2014; Levy, Thaiss, & Elinav, 2015). Se ha establecido una asociación entre los genes *Bifidobacterium* y el locus genético que codifica la lactasa (Turpin et al., 2016).

El *locus* que codifica el receptor de vitamina D en humanos también ha resaltado como control de cierto control microbiano (J. Wang et al., 2016). Aún está por definirse la contribución de la dieta a estas asociaciones y todo indica que la dieta es la que tiene un efecto más importante (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turróni, Mahony, Belzer, Palacio, et al., 2017).

g) Antibióticos y otros fármacos

Diversos fármacos pueden causar disbiosis como los antibióticos que constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (Seija & Vignoli, 2006). El tratamiento con antibióticos tiene como objetivo reducir o eliminar la colonización de microorganismos patógenos sin embargo al no ser selectivos eliminan microorganismos benéficos para el huésped (Kinch, Patridge, Plummer, & Hoyer, 2014),

Sin embargo, los antibióticos modifican la fisiología y la expresión génica de la microbiota intestinal, alterando elementos de la señalización intestino-cerebro (Forsythe, Kunze, & Bienenstock, 2016), deprimiendo la neurotransmisión neuroepitelial colinérgica, modificando el transporte epitelial colónico; además de inhibir las contracciones colinérgicas mediadas por los plexos mientéricos del intestino (Delungahawatta et al., 2017).

Estos son algunos de los antibióticos y mecanismos de acción, que afectan la composición de la microbiota intestinal.

La pared celular puede ser afectada en la síntesis (fosfomicina, cicloserina) o el transporte de sus precursores (bacitracina, mureidomicinas), o en su organización estructural (β -lactámicos, glucopéptidos). La síntesis proteica puede bloquearse por una amplia variedad estructural de compuestos que afectan a algunas de las fases de este proceso: activación (mupirocina), iniciación (oxazolidinonas, aminoglucósidos), fijación del complejo aminoácido-ARNt al ribosoma (tetraciclinas, glicilciclinas) o elongación (anfenicoles, lincosamidas, macrólidos, cetólidos, estreptograminas o ácido fusídico). El metabolismo de los ácidos nucleicos puede ser afectado en la ARN polimerasa dependiente de ADN (rifamicinas) o en el proceso de enrollamiento/desenrollamiento del ADN (quinolonas); algunos compuestos afectan directamente al ADN (nitroimidazoles, nitrofuranos). El trimetoprim y las sulfamidas son los representantes de los antimicrobianos que bloquean las vías metabólicas de la bacteria. (Galvo & Martínez-Martínez, 2009; Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

Por otro lado, otros fármacos asociados al cambio en la composición de la microbiota se encuentran los inhibidores de la bomba de protones (IBP), la metformina, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los opioides, las estatinas y antipsicóticos (Le Bastard et al., 2018). El empleo de la IBP se ha asociado a disbiosis, lo cual contribuye a un aumento en el riesgo de infección por *Clostridium difficile* (ICD) y encefalopatía hepática (Freedberg et al., 2015). El consumo crónico de AINE genera abundancia de *Bacteroidaceae* y *Enterobacteriaceae* (Rogers & Aronoff, 2016).

Sin embargo, actualmente se ha estudiado que la suplementación de ciertos grupos de microorganismos probióticos previenen el desarrollo de trastornos

gastrointestinales, debido a que promueven la homeostasis intestinal, además los usos más comunes incluyen el tratamiento de trastornos inflamatorios, como la artritis, enteropatía inducida por radiación y AINE, diarrea inducida por antibióticos, mucositis inducida por quimioterapia (Mendes et al., 2018; Wasilewski, Zielińska, Storr, & Fichna, 2015).

1.8. Probióticos

De acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura; los probióticos se definen como microorganismos vivos que confieren un beneficio para la salud de quien los utiliza (Wasilewski, Zielińska et al. 2015). Los seres humanos han usado los probióticos durante cientos de años, y su uso sin efectos adversos considerables ha quedado demostrado en múltiples estudios. La primera observación del efecto terapéutico de las bacterias fue realizada por Ilya Metchnikoff, quien recibió el premio Nobel de Medicina en 1908. Metchnikoff fue el primero en llamar la atención sobre la relación entre un muy buen estado general de salud y la longevidad de la población rural búlgara y la leche agria ingerida sistemáticamente que contiene bacterias del ácido láctico, a las que llamó "el bacilo búlgaro" (Reid, 2016; Wasilewski et al., 2015). En 1908, Tissier, del instituto Pasteur de Paris, aisló una bacteria en forma de Y (ahora denominada *Bifidobacterium bifidum*) de un lactante sano alimentado con leche materna, mientras que noto que los niños con diarrea tenían bajas concentraciones de este microorganismo (Tissier 1900).

A pesar de estos estudios la confianza en el uso seguro de los probióticos, para aceptarlos como agentes terapéuticos se requieren estudios aleatorizados y

controlados que demuestre que cada cepa en particular es capaz de prevenir o tratar con éxito alguna condición patológica (Wlasiuk & Vercelli, 2012).

Para que un microorganismo pueda considerarse y utilizarse, como probiótico es necesario presentar una serie de características de seguridad, funcionales y tecnológicas:

- No ser patógeno ni tóxico,
- Ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de quien lo ingiere,
- Ser de origen humano,
- Ser tecnológicamente utilizable,
- Presentar un elevado porcentaje de células viables,
- Ser capaz de sobrevivir a la flora intestinal,
- Ser resistente a sales biliares, bacteriocinas, enzimas y pH del estómago,
- Permanecer viable durante su almacenamiento en refrigeración y
- Tener la capacidad de adherirse a la superficie mucosa, entre otras características (Rondon, Añez Zavala, Salvatierra Hidalgo, Meneses Barrios, & Heredia Rodriguez, 2015; Suárez, 2015).

En general, se considera que es necesario conocer no solo el género y la especie de un probiótico, sino también su cepa y la dosis que se va administrar, para poder atribuirle un efecto benéfico específico en la salud de quien lo ingiera. En los últimos dos siglos se han usado métodos fenotípicos para la identificación de cepas bacterianas, que incluyen la tinción de Gram, la morfología de las células y de las colonias, temperatura óptima de crecimiento, características ambientales para su crecimiento, prueba de oxido-reducción,

entre otras. Actualmente se utilizan múltiples métodos de identificación genotípica, entre los que destacan el análisis de la subunidad 16S de ARN ribosomal, que no solo identifica género y especie, sino también cepa (Shokryazdan, Faseleh Jahromi, Liang, & Ho, 2017). Dos bacterias del mismo género y especie pueden ser muy diferentes entre sí, cuando pertenecen a diferentes cepas, por lo que su eficacia puede ser muy distinta. Por ejemplo, el *Lactobacillus plantarum*299v ha mostrado en algunos estudios reducir los síntomas del síndrome del intestino irritable (Ducrotté, Sawant, & Jayanthi, 2012). Sin embargo, el *Lactobacillus plantarum* MF1298 ha demostrado empeorar los síntomas de este mismo padecimiento (Ligaarden, Axelsson, Naterstad, Lydersen, & Farup, 2010).

De acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA) son varios los géneros y especies considerados como microorganismos probióticos, entre los mas estudiados destacan los *Lactobacillus*, las *bifidobacterium* y otras Bacterias ácido lácticas (BAL).

- *Lactobacillus* sp: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. salvaricus* y *L. lactis*.
- *Bifidubacterium* sp: *B. adolescentes*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* y *B. lactis*.
- Otras BAL (Bacterias ácido lácticas): *Enterococcus faecium*, *Propionibac. Freudereichei*, *Leuconostoc mesenterioides*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecalis* y VSL#3 (4 cepas de lactobacilos, 1 de *Streptococcus salivaricus*).

1.8.1. Actividad de los probióticos sobre la microbiota intestinal

Los probióticos tienen mecanismos útiles para limitar el crecimiento de otras bacterias:

- a) Producción de compuestos antimicrobianos, principalmente los ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido láctico, que reducen el pH intestinal, limitando el crecimiento de microorganismos patógenos y promoviendo el crecimiento de especies bacterianas benéficas.
- b) Producción de bacteriocinas, son varios péptidos antimicrobianos producidos por bacterias que son resistentes a su efecto.
- c) Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a partir del metabolismo de los carbohidratos, como los ácidos acético, butírico y propiónico.

Los AGCC son antimicrobianos y actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativa, al ser sustancias liposolubles, se disuelven en las membranas celulares bacterianas y penetran en el citoplasma (do Carmo et al., 2018). Además de este efecto antimicrobiano, son alimento de los colonocitos.

El término bacteriocinas incluye a péptidos modificados (lantibióticos, laberintopeptinas y sactibióticos), un grupo heterogéneo de péptidos no modificados y proteínas líticas, unas proteínas antimicrobianas grandes y sensibles al calor (Shokryazdan et al., 2017). Estudios *in vitro* han demostrado que varias especies de *Lactobacillus* incrementan la producción de catelicidinas y defensinas por el epitelio. Lo que permite ser utilizados como una terapia eficaz para el tratamiento de varias afecciones patológicas que muestran un

perfil general de seguridad positivo (Di Cerbo, Palmieri, Aponte, Morales-Medina, & Iannitti, 2016).

1.8.2. Adhesión a la mucosa gastrointestinal

De hecho, la adhesión de los *Lactobacillus* al tracto gastrointestinal del huésped, por medio de una interacción con receptores tipo Toll, es de importancia crucial debido a su capacidad para desencadenar la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, la adhesión al tracto GI también puede ser impulsada por proteínas de superficie y ácidos grasos, como se observó para *L. rhamnosus* PEN, y componentes de la capa superficial proteica, al igual que *L. plantarum* (Yadav et al., 2015).

1.8.3. Actividad antitumoral

Las bacterias intestinales producen mutágenos como el ácido desoxicólico a partir de ácidos biliares primarios o por conversión enzimática cuando se ingieren compuestos extraños, como nitroaromáticos, compuestos azoicos y nitratos. Los *Lactobacillus* son capaces de inhibir competitivamente la formación de carcinógenos y mutagénicos, alterando el metabolismo general, adsorbiendo y eliminando metabolitos tóxicos y mutagénicos y produciendo metabolitos protectores. En el contexto del cáncer colorrectal, el mecanismo de prevención ejercido por los probióticos puede ser una combinación de diferentes acciones, como la modificación de la microbiota intestinal, inactivación de compuestos cancerígenos, competencia con la microbiota putrefactiva y patógena, mejora de la respuesta inmune del huésped, mejora de la citotoxicidad natural de las células asesinas e inhibición de la producción de interleucina (IL) en la mucosa colónica que contrarresta el desarrollo del cáncer

por los efectos antiproliferativos mediante la regulación de la apoptosis y la diferenciación celular, fermentación de alimentos no digeridos e inhibición de las vías de señalización de la tirosina quinasa. Los estudios experimentales también han demostrado que los lactobacilos contenidos en los suplementos dietéticos y los alimentos fermentados, como la cepa Shirota (LC 9018) de *L. casei* muerta por calor, reducen el riesgo de cáncer de colon. Estas actividades se han atribuido a la alteración de la microbiota intestinal y, posteriormente, a la inhibición o la inducción de enzimas colónicas que controlan el crecimiento de bacterias dañinas, mejoran la función inmune y estimulan la producción de metabolitos que poseen actividad antitumoral (Di Cerbo et al., 2016), Figura 3.

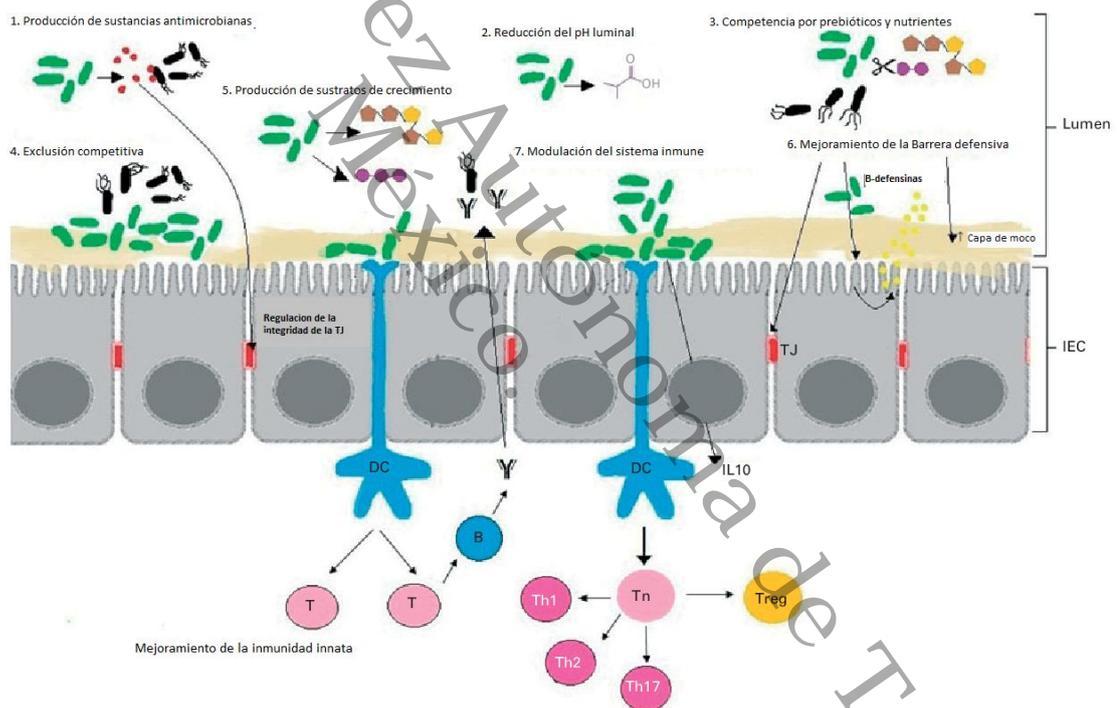


Figura 3. Ilustra los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas pueden influir en la microbiota intestinal y sus efectos benéficos. Fuente: Power et al., 2014.

Aunque el ENS parece ser el principal regulador de la motilidad intestinal, tanto el ENS como el SNC están involucrados en su control, y ambos interactúan con la microbiota gastrointestinal. La disfunción o la desregulación de la ENS o el SNC pueden provocar síntomas de estreñimiento. Un pequeño número de estudios ha demostrado que los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la motilidad intestinal están mediados por el sistema nervioso, lo que proporciona evidencia de que los probióticos pueden ayudar a regular la SNE o el SNC para normalizar la motilidad intestinal (Dimidi et al., 2017).

1.8.4. Efecto reductor del colesterol

Un alto nivel de colesterol en el torrente sanguíneo es riesgoso para la enfermedad coronaria en humanos. Los efectos reductores del colesterol de los probióticos podrían lograrse mediante diversos mecanismos, incluida la desconjugación de los ácidos biliares por la hidrolasa de sal biliar (BSH), la asimilación del colesterol por los probióticos, la coprecipitación del colesterol con la bilis desconjugada, el colesterol se une a las paredes celulares de los probióticos, y la incorporación de colesterol en las membranas celulares de los probióticos durante el crecimiento. (Seddik et al., 2017).

2. Planteamiento del problema

El uso indiscriminado y manejo inadecuado de antibióticos tiene efectos adversos sobre la composición de la microbiota intestinal y en consecuencia sobre la función intestinal.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3. Justificación

La microbiota intestinal (MI), forma parte de nuestra barrera defensiva, generando múltiples beneficios a la salud del huésped, regulando funciones metabólicas, protectoras y estructurales, sin embargo, puede ser modificado tras la administración de antibióticos, generando un estado de disbiosis, que permite el desarrollo o aparición de ciertos trastornos gastrointestinales, cardiovasculares, neuronales, inmunológicos y/o metabólicos.

No obstante, los probióticos, microorganismos vivos que, administrados de manera adecuada, confieren beneficios al hospedero; pueden revertir el estado de desequilibrio de la MI, posterior al tratamiento con antibióticos.

El estudio de la evaluación de la función intestinal posterior al tratamiento con antibióticos y los efectos de la administración de probióticos como medida para revertir la disbiosis no ha sido revisada en estudios anteriores.

4. Hipótesis

La administración de *Lactobacillus sp* después del tratamiento con antibióticos reestablece la regulación del contenido de agua y la motilidad intestinal.

H0 La administración de *Lactobacillus sp* después del tratamiento con antibióticos no reestablece la regulación del contenido de agua y la motilidad intestinal.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

- Aislar y caracterizar una cepa de *Lactobacillus sp* y evaluar el efecto de su administración después de un tratamiento con antibióticos en ratones Balb/c.

5.2 Objetivos Específicos

- Aislar y caracterizar de una cepa de *Lactobacillus sp* a partir de una mezcla de probióticos comercial.
- Evaluar la cantidad de *Lactobacillus sp* durante el tratamiento con antibiótico y/o probiótico.
- Medir la frecuencia de evacuación y porcentaje de humedad en heces de ratones Balb/C después del tratamiento con antibiótico y/o probiótico.
- Evaluar del tránsito gastrointestinal y rectal en ratones Balb/c después del tratamiento con antibiótico y/o probiótico.

6. Material y métodos

6.1 Tipo de estudio: Experimental, comparativo y longitudinal.

6.2. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Lactobacillus sp* de una presentación comercial.

El probiótico se aisló a partir de una mezcla comercial de probióticos llamada Probiotics Complex que contenía probióticos LAB4 (*Lactobacillus acidophilus* (CUL60), *Lactobacillus acidophilus* (CUL21), *Bifidobacterium bifidum* (CUL 20), *Bifidobacterium animalis* subsplactis (CUL34)) y una mezcla multi-cepa (*Lactobacillus salvaricus* (CUL61), *Lactobacillus plantarum* (CUL66), *Lactobacillus rhamnosus* (CUL63), *Streptococcus thermophilus* (CUL68)). Se adiciono 1 g de esta mezcla de probióticos a 9ml de solución salina, homogeneizando perfectamente para después agregar 1ml de esta dilución a 9 ml de medio selectivo en caldo Man Rogosa Sharp (MRS) Sigma Aldrich, para *Lactobacillus* incubando durante 72 h.

Del cultivo obtenido se tomó 50 µl para agregarlos sobre una placa de Agar MRS, por estría cruzada, dejando incubar durante 24 h, se seleccionaron 6 colonias para adicionarlo a caldo MRS incubando a 37°C por 24 h, posteriormente se centrifugo 3 veces por 15 minutos a 3000 rpm; realizando lavados con NaCl al 0.85% después de centrifugar. Al pellet obtenido se le adiciono caldo MRS con 25% de glicerol para poder conservar a -20 °C.

Caracterización fenotípica

a) Tinción de Gram

Sobre un portaobjetos, se depositó una gota de agua destilada, después se tomó una parte de la colonia de las muestras a analizar con la ayuda de un asa de siembra, mezclando con la gota de agua, dejando secar y fijando con la flama. Se cubrió con la solución de cristal violeta durante 1 min, se desechó el colorante y lavó ligeramente al chorro del agua, posteriormente se aplicó solución de yodo durante 1 min, se desechó y lavó al chorro de agua. Con el porta objetos inclinado se agregó una gota de la solución de alcohol-cetona y se lavó al chorro de agua. Por último, se cubrió con safranina durante 10 a 20 seg., desechando el colorante y lavando a chorro de agua.

b) Crecimiento de la cepa de *Lactobacillus sp* a 10°C, 37 °C y 42°C.

Se analizó la capacidad de crecimiento de *Lactobacillus sp* en Caldo MRS incubando a 10+1°C por 7 días, a 37°C y 42°C 24-48h. Para esto se utilizó 10 ml de caldo MRS en tubos inoculados con 1% del cultivo de *Lactobacillus* (Puniya, Sangu, & Bhardwaj, 2012).

c) Crecimiento de la cepa de *Lactobacillus sp* a diferentes concentraciones de NaCl.

Los *Lactobacillus* fueron inoculados en caldo MRS a diferentes concentraciones de NaCl (2%, 4% y 6.5%) y se incubaron a 37°C por 24-48h. Se observó la presencia o ausencia de crecimiento (Puniya et al., 2012).

Caracterización proteómica de la cepa de *Lactobacillus sp*

Se identificó la cepa de *Lactobacillus sp*, por medio del análisis de espectrometría de masas (Vitek MS), MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI; cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight. Esta técnica consiste en una ionización suave del analito que provoca la vaporización de moléculas intactas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un rango de peso molecular entre 2 a 20 kDa, a un relativo bajo costo y resultado inmediato. El espectro mostrado se comparó con la base de datos del espectrómetro.

La identificación de esta cepa de *Lactobacillus sp* se desarrolló en el laboratorio de Bacteriología médica de la Escuela Nacional en Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Por el siguiente procedimiento:

- Con un asa estéril, se recolectó, a partir de un cultivo puro desarrollado durante 18 a 24h en agar nutritivo o TSA, una cantidad suficiente de inóculo.
- Se transfirió directamente sobre el porta objeto y distribuyó de manera uniforme en el pocillo.
- Se agregó 10 µl de matriz sobre la muestra.
- Se cargó la muestra al espectrómetro de masas (Vitek MS).

Se esperó la lectura del espectrómetro de masas en un tiempo aproximado de una hora y media.

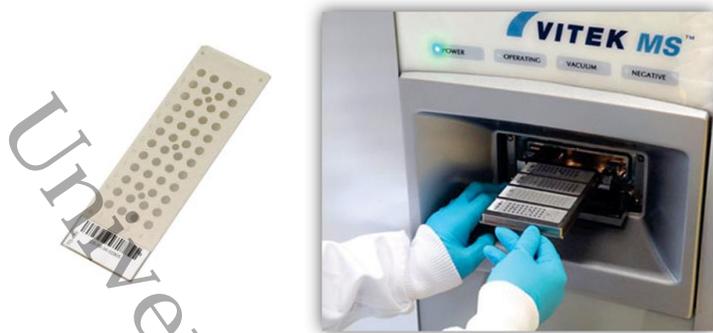


Figura 4. Portaobjeto con las muestras de *Lactobacillus sp*, y espectrómetro de masas (Vitek ms).

6.3. Animales y fármacos

Animales: Ratones Balb/c machos, adultos jóvenes, cuya edad oscilo entre los 10-12 semanas, con un peso entre 20-30 g, procedentes de la Unidad de Producción, Cuidado y Experimentación Animal (UPCEA), de la División Académica de Ciencias de la Salud (DACS) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Los animales se alojaron y ambientaron en un cuarto con temperatura y ciclos de luz y oscuridad controlados, con libre acceso al agua y alimento.

Los animales fueron asignados al azar, en: grupo control (SS) n=8, grupo tratado probiótico (P) n=8, grupo tratado con antibiótico (A) n=8, grupo tratado con antibiótico-probiótico (A-P) n=8.

Antibióticos: Para producir disbiosis se utilizaron los siguientes antibióticos de amplio espectro, obtenidos de presentaciones comerciales y administrados por vía oral (sonda orogástrica), 0.3 ml de una mezcla de antibióticos que incluían ampicilina (solución inyectable, laboratorios amsa) (20 mg/kg); metronidazol (solución inyectable sanofi-aventis) (0.5 mg/kg); gentamicina (1.6 mg/kg) y

Vancomicina (solución inyectable kener) (mg/kg), Tabla 1. (Xiaolong Ge, Chao Ding, et al., 2017).

Tabla 1. Antibióticos administrados durante el tratamiento y mecanismo de acción.

Antibióticos	Mecanismo de acción	Clasificación
Ampicilina	Transpeptidasa	Beta-lactamico
Eritromicina	Traducción	Macrólido
Gentamicina	Ribosoma bacteriano 30 S	Aminoglucósido
Vancomicina	Alteración del péptidoglicano	Glucopéptido

Para el grupo control se administró por vía oral 0.3ml de agua por 6 semanas.

Probiótico: Del stock se transfirió diariamente, 100µL a 9ml de caldo MRS para incubar durante 18 h a 37°C (fase estacionaria), después se centrifugo en 3 ocasiones por 10 minutos a 5000 rpm y se realizó 3 lavados con NaCl al 85% después de cada centrifugación. El pellet resultante fue suspendido en 5ml de NaCl al 85%, y se realizó el ajuste de acuerdo a la escala de Mc Farland en un tubo de ensaye hasta obtener la turbidez indicada para 0.5×10^8 . La solución del cultivo se mantuvo y transporto a 4°C (Aktas et al., 2015). Para el grupo probiótico se administró por vía oral 0.1ml de probiótico ajustado a 0.5×10^8 de acuerdo a la escala de Mc Farland.

6.4. Diseño experimental

En una primera etapa del estudio, se administró vía oral 0.3 ml de solución salina al grupo 1 control (SS), al igual que al grupo 2 tratado con probiótico (P); al grupo 3(A) y grupo 4 (A-P) tratados con antibióticos se le administro vía oral

0.3 ml de la mezcla de antibióticos diario, durante 4 semanas. Figura 5, Tabla no. 2.

Tabla no 2. Diseño experimental: dosis y periodo de administración oral.

Grupo de ratones	Periodo de administración	
	4 semanas (0.3ml)	2 semanas (0.1ml)
1 (SS)	Solución salina	Solución salina
2 (P)	Solución salina	Probiótico
3 (A)	Antibiótico	Solución salina
4 (A-P)	Antibiótico	Probiótico

En la segunda etapa se administró al grupo 1 (SS) 0.1 ml de solución salina al igual que al grupo 3 (A). Mientras que al grupo 2 (P) y 4 (A-P) se les administro 0.1 ml de probiótico ajustado previamente a 0.5×10^8 UFC de acuerdo al parámetro de Mc Farland.

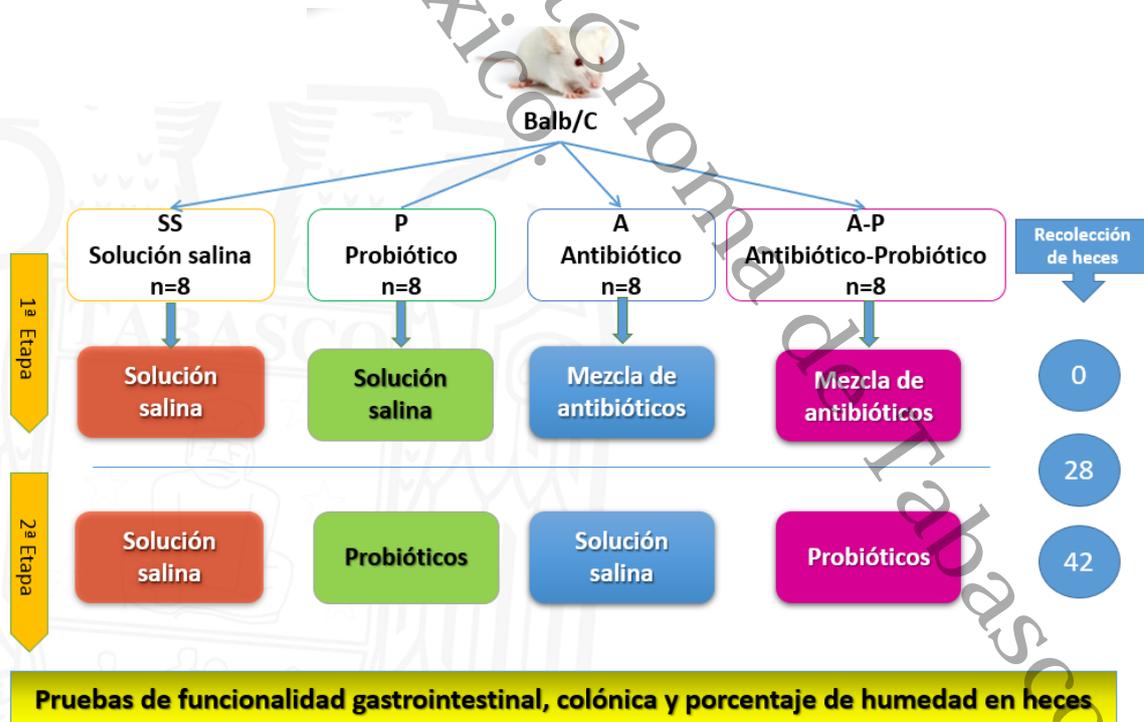


Figura 5. Diseño experimental describiendo los grupos, tipos y periodos de tratamiento.

6.4.1. Evaluación de la cantidad de *Lactobacillus* sp durante el tratamiento con antibiótico y/o probiótico.

Las muestras fecales (pellets) de los ratones se recolectaron en 3 tiempos (día 0, 28, 42) para los cuatro grupos. En cada tiempo, se tomó un total de 5 pellets por cada ratón.

Los pellets fueron suspendidos en 9 ml de solución salina y homogenizados perfectamente, se tomó 1ml de la muestra concentrada y se realizaron 3 diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Se tomó 50 μ l de la última dilución para realizar la siembra de las muestras fecales en medio selectivo para *Lactobacillus* MRS (Man Rogosa Sharpe). Se incubaron por triplicado en un periodo de 24 a 48 hrs a 37°C, al obtener el crecimiento de colonias, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* presentes al inicio y final de cada tratamiento (Mexicana, 1994), se utilizó la aplicación Colony Counter Lite, analizando las imágenes en placas de agar y contando manualmente a través de la pantalla táctil del celular. Posterior a esto, se obtuvo el promedio los cultivos por ratón, a partir de este resultado se obtuvo las UFC por gramo de muestra.

6.4.2. Medición de la frecuencia de evacuación y porcentaje de humedad en heces de ratones Balb/c.

Para esta prueba los ratones se separaron en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum*, observándolos durante un periodo de 8 horas, Figura 6 a.

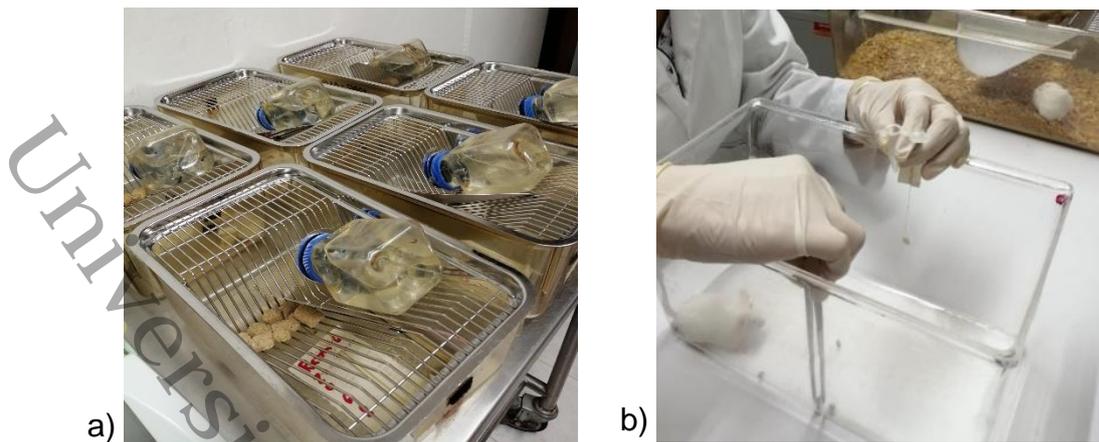


Figura 6. Prueba de frecuencia y porcentaje de humedad: a) Muestra cajas individuales donde se alojaron a los ratones para realizar la prueba. b) Muestra la recolección de heces después de 2 horas.

Los pellets se recolectaron, contaron y pesaron cada 2 horas, Figura 6 b. Posterior a la recolección se dejó a desecar el total de pellets durante 24 horas a 60 °C, comparando el peso antes y después del desecado para obtener la diferencia de la cantidad de agua (Ge, Ding et al. 2017). La cual se obtuvo a través la siguiente fórmula:

$$\text{Peso húmedo} - \text{peso seco} = \text{cantidad de agua en heces}$$

6.4.3. Evaluación del tránsito gastrointestinal en ratones Balb/c.

Los ratones se dejaron en ayuno durante toda la noche con agua *ad libitum*. Se cuantificó el tránsito gastrointestinal boca-ano, a través de la administración a cada ratón de 0.1 ml de una solución semilíquida que contenía azul de Evans, colorante diazo, no tóxico y muy soluble en agua a una dilución de 5%; y metilcelulosa, fibra soluble de acción laxante a una dilución de 1.5%, por vía oral mediante una sonda gástrica (figura 7 a). Monitoreando la expulsión de los pellets con intervalos de 10 minutos (figura 7 b), hasta observar la aparición del primer pellets color azul (figura 7 c), (Ge, Ding et al. 2017). Tomando como tiempo de tránsito gastrointestinal desde la administración del colorante hasta la expulsión del pellet azul.

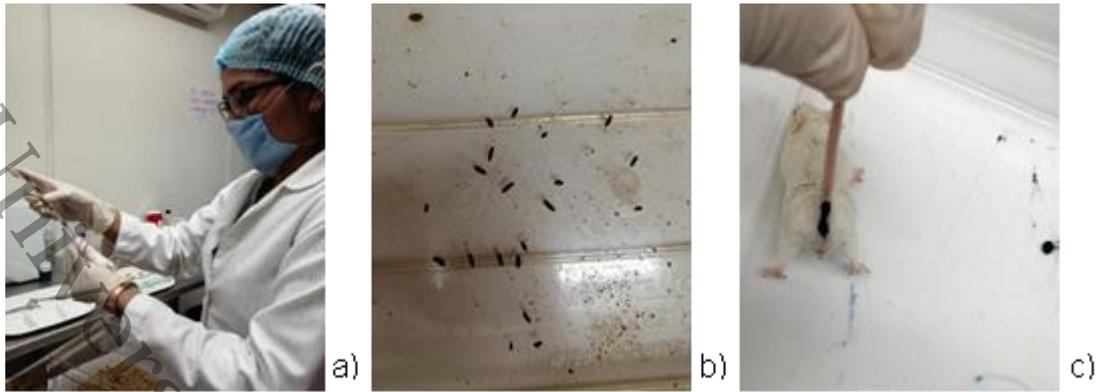


Figura 7. Prueba de tránsito gastrointestinal total. a) Muestra la técnica de administración oral mediante sonda gástrica. b) Se observan las heces con coloración habitual del ratón. c) Expulsión del primer pellet color azul (solución azul de Evans).

6.4.4. Evaluación del tránsito rectal en ratones Balb/c.

Los ratones se dejaron en ayuno durante toda la noche con agua *ad libitum*. Esta prueba consistió en determinar el tránsito recto - ano a través de la introducción de una perla de acrílico de 1 mm de diámetro vía rectal, hasta aproximadamente 1 cm de profundidad, con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y vaselina para facilitar la introducción, figura 8 a; se cuantificó el tiempo que transcurrió hasta expulsar la perla (seg), figura 8 b. Las pruebas de actividad gastrointestinal se llevaron a cabo con ligeras modificaciones (Li, Chalazonitis et al. 2011).

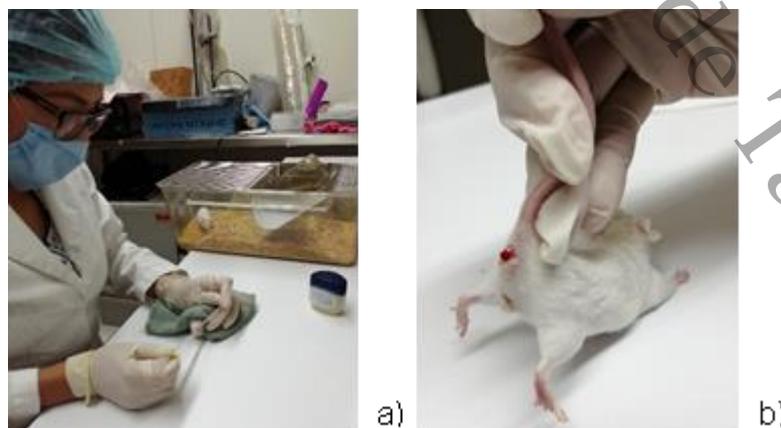


Figura 8. Prueba del tránsito rectal: a) Introducción de la perla de acrílico. b) Expulsión de la perla de acrílico.

6.5. Operacionalización de variables.

Tabla 3. Muestra las variables de trabajo y las unidades de medición que se usaran para la recolección de los datos.

Variable	Tipo de variable	Definición de variable	Unidades de medición
Identificación <i>Lactobacillus sp</i>	Cualitativa	Conocer o distinguir características morfológicas, químicas	Masa/Intensidad
Conteo de colonias de <i>Lactobacillus</i>	Cuantitativa	Número de microorganismos determinado en un volumen de un metro cúbico de agua.	Unidad/ peso
Evacuación de heces	Cuantitativa	Proceso biológico de la eliminación de las heces	Numero de pellets
Humedad en heces	Cuantitativa	Cantidad de agua presente en un cuerpo	Porcentaje
Tránsito gastrointestinal	Cuantitativa	tiempo que le toma a los alimentos ir desde la boca hasta el final del intestino (ano).	Minuto
Tránsito rectal	Cuantitativa	Medición objetiva del tiempo en el que transcurre el contenido intestinal a través del recto	Segundos
Inflamación en tejido	Cualitativa	Respuesta natural, de carácter protector, que pretende librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias que esta provoca	Presencia o ausencia

6.6. Aspectos éticos

Para los estudios *in vivo*, el manejo de los ratones que se emplearon en el modelo experimental, así como el sacrificio, fue conducido bajo las normas de SAGARPA 2005, acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Guía Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NRC 2002.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

6.7. Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar de al menos 8 ratones por cada grupo. El análisis estadístico de las variables: conteo de colonias de *Lactobacillus sp*, evacuación de pellets, porcentaje de humedad, tránsito gastrointestinal y rectal, se llevó a cabo utilizando el programa Graphpad Prism v. 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

La comparación contra el grupo control para las variables: frecuencia de evacuación de pellets, porcentaje de humedad, tránsito gastrointestinal y rectal, se analizaron mediante la prueba Anova de una vía con análisis de comparaciones múltiples de Dunnet's. En el caso de los cambios temporales de las variables: conteo de Colonias y Curso temporal de evacuación, se analizó mediante la prueba Anova de dos vías con análisis de comparaciones múltiples de Dunnet's. Las diferencias fueron tomadas como significativas si presentaron una $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Caracterización de una cepa de *Lactobacillus sp* a partir de una mezcla de probióticos comercial.

La caracterización fenotípica de *Lactobacillus* permitió establecer que esta cepa corresponde a un microorganismo gram positivo, catalasa negativa, que forma colonias de tamaño grande color beige, con bordes homogéneos y cóncavas en agar MRS.

Tabla 4. Concentra los resultados de las características morfológicas, fisiológicas y condiciones medio-ambientales de la cepa en estudio.

Características	Cepa no identificada de <i>Lactobacillus sp.</i>	Característica de <i>Lactobacillus plantarum</i> (MacFaddin, 2003)
Caracterización morfológica		
Color	Beige	Beige
Forma	Circular	Circular
Tamaño	0.5 μ l	0.5 – 0.7 μ l
Motilidad	No	No
Reacción Gram	Positivo	Positivo
Forma	Bacilo	Bacilo delgado largo
Caracterización fisiológica		
10°C	No	No
37°C	Si	Si
42°C	Si	Si
Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl		
2%	Si	Si
4%	Si	Si
6.5%	No	No
Requerimiento de oxígeno		
Aeróbico	Si	Si
Microaerófilo	Si	Si

- Caracterización proteómica de la cepa de *Lactobacillus sp.*

Number of identifications: 1 List of identifications

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
B1	9/12/19 5:39 PM	<i>Lactobacillus pentosus/plantarum /paraplantarum</i>		99.9	■	

Key: [Validate selection](#) [Add comment](#)

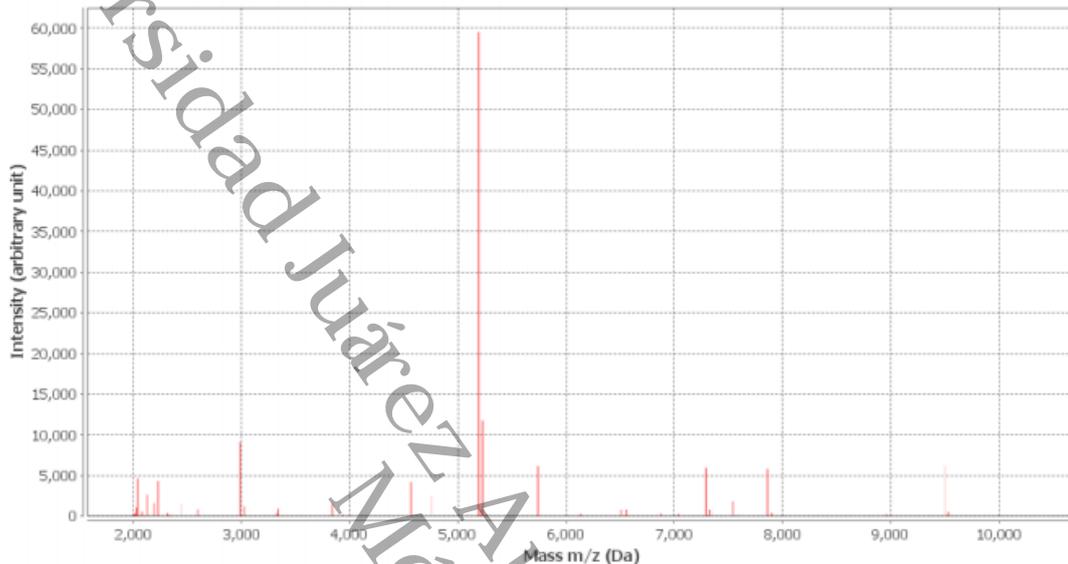


Figura 9. Espectro proteico del *Lactobacillus plantarum*.

Por medio de la espectrometría de masas MALDI-TOF, se realizó la identificación proteómica de la cepa, obtenida a partir del cultivo de una mezcla comercial de probióticos.

A través de esta técnica se obtuvo un espectro propio del organismo y se comparó con bases de datos, para identificar a nivel de género y especie. Obteniendo como resultado la identificación de la cepa de *Lactobacillus plantarum*, en el eje de abscisas se representan las ratios m/z de los iones detectados, mientras que en el eje de ordenadas se representan las intensidades, que reflejan la cantidad de iones de una determinada ratio m/z impactadas contra el detector durante el análisis, Figura 9.

7.2. Evaluación de la cantidad de *Lactobacillus sp* durante el tratamiento con antibiótico y/o probiótico.

En este estudio se obtuvo como resultado del conteo de UFC, el número de bacterias viables al inicio y final de cada tratamiento como fenómeno de la modificación del número de *Lactobacillus*, presentes en el tracto gastrointestinal después del tratamiento. Donde se observó que el grupo SS y el grupo P inician con un número de colonias semejante (155 ± 68.80 , 169 ± 169), por otro lado, los valores obtenidos entre el grupo A y A-P fue similar entre ambos (261 ± 68.80 , 218 ± 88.95), pero con valores más altos en comparación al grupo control y al grupo probiótico, Tabla 5, Figura 10.

En la segunda recolección de muestras (día 28), se observa un ligero aumento en el número de colonias tanto en el grupo SS y grupo P y el grupo A (184 ± 75.99 ; 209 ± 47.34 ; 183 ± 54.80), a diferencia del grupo A-P (117 ± 68.66) donde se observa una disminución con diferencia a los otros grupos y al primer conteo del día 0, Tabla 5, Figura 10.

Tabla 5. Cantidad de colonias de *Lactobacillus sp* aisladas a partir de las heces de los ratones tratados.

Grupos	Recolección de muestras (UFC)		
	Día 0	Día 28	Día 42
Control (SS)	155 $\pm 68,80$	184 $\pm 75,99$	186 $\pm 33,24$
Probiótico (P)	169 $\pm 45,27$	209 $\pm 47,34$	356 $\pm 105,51$
Antibiótico (A)	261 $\pm 68,80$	183 $\pm 54,80$	276 $\pm 86,54$
Antibiótico – Probiótico (A-P)	218 $\pm 88,95$	117 $\pm 68,66$	387 $\pm 153,39$

Para la tercera recolección de muestras (día 42) el grupo SS mantuvo el número de colonias con 186 ± 33.24 ; en el caso del grupo de P, A, A-P aumento el número de colonias 356 ± 105.51 ; 276 ± 86.54 y 387 ± 153.39 respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico se presentó una diferencia significativa de los grupos A y AP comparados contra el grupo control ($p < 0.05$). Tabla 5, Figura 10.

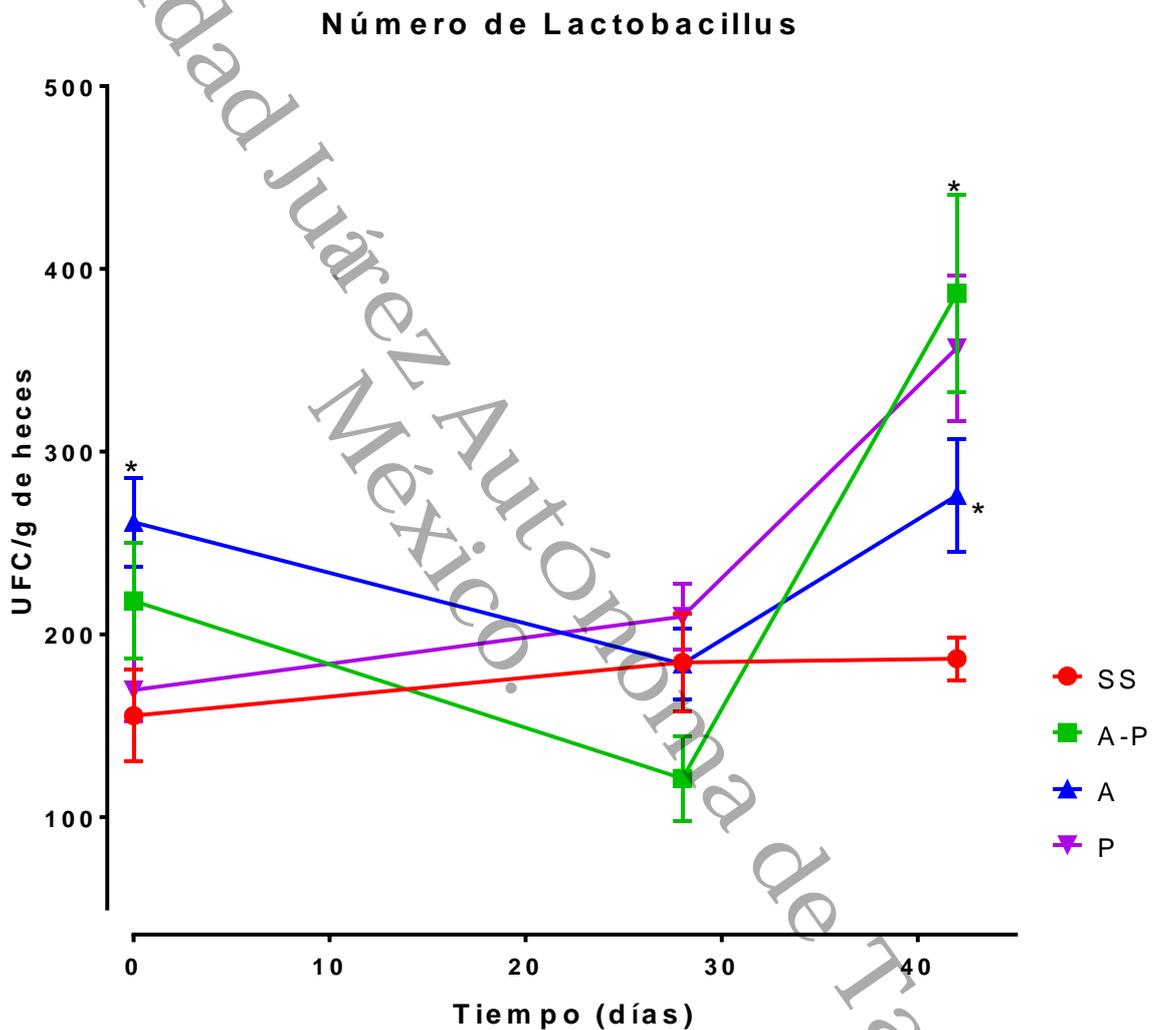


Figura 10. Muestra los resultados del conteo de unidades formadoras de colonias por gramo de heces en los días 0, 28 y 42. Cada punto representa el promedio \pm DE de ocho ratones ($p < 0,05$).

7.3. Medición de la frecuencia de evacuación y porcentaje de humedad en heces de ratones Balb/C después del tratamiento con antibiótico y/o probiótico.

Posteriormente, para el estudio del efecto del tratamiento con una mezcla de antibióticos y luego la administración de una cepa probiótica en ratones BALB/c, sobre la frecuencia de evacuación, contenido de agua, motilidad gastrointestinal y rectal; se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Tabla general de resultados. El (*) indica el grupo contra el cual se encontró diferencias significativas, ns indica datos no significativos.

Grupo	Frecuencia no. /8h	Porcentaje de humedad	Transito gastrointestinal min (Azul Evans)	Motilidad Rectal (seg) (perla de cristal)
Control (SS)	61 ±27,13	75,52 ±20,91	85 ±25,80	230,875 ±53,53
Probiótico (P)	44 ±12	*54,56 ±4,68	90,57 ±22,09	142,57 ±31,33
Antibiótico (A)	36,63 ±4,14	*52,35 ±13,03	72,25 ±17,38	*115,00 ±60,24
Antibiótico - Probiótico (A-P)	62,75 ±25,25	*52,91 ±17,81	63,63 ±13,17	217,38 ±58,75
Significancia	P= 0,1012 ns	P= 0,0129 P= 0,0496 P= 0,0496	P= 0,2405 ns	P= 0,0003

En la frecuencia de evacuación de pellets el grupo de ratones SS tuvo una mayor numero de pellets durante 8 horas similar a los datos obtenidos en el grupo A-P en comparación al grupo A y P (61.00 ± 27.62 ; 62.75 ± 25.25), en cambio el grupo P y A obtuvieron parámetros entre 36.63 ± 4.14 y 44.11 ± 11.11

respectivamente, al realizar el análisis estadístico se encontró resultados significativos en el grupo antibióticos. Tabla 6, Figura 11.

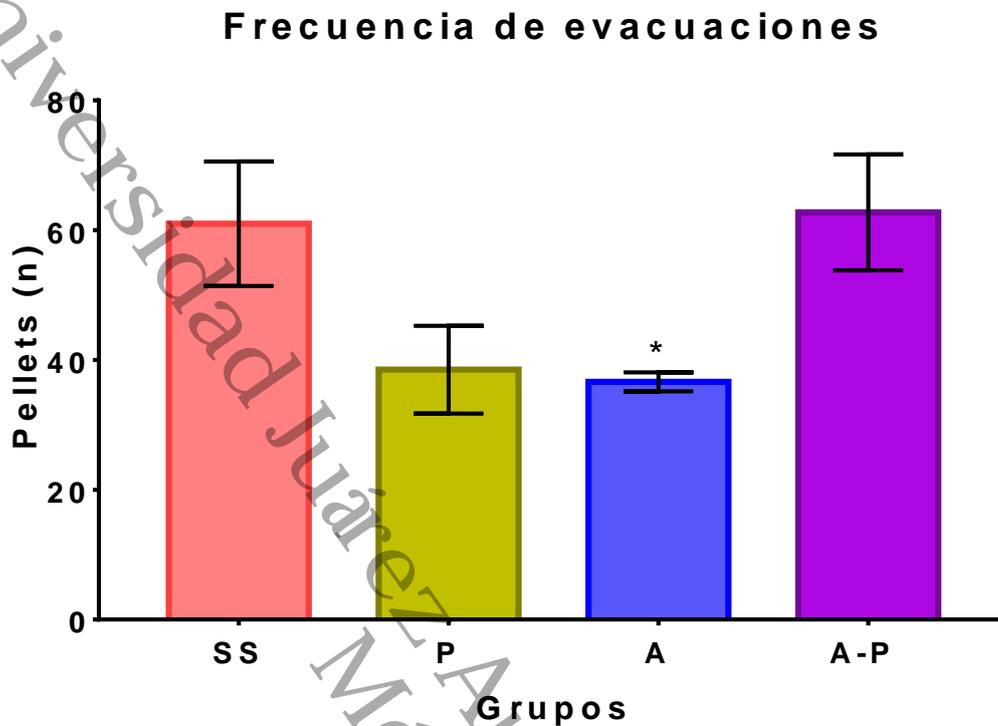


Figura 11. Muestra resultado del número de evacuaciones por grupo durante 8 horas. Cada barra representa el promedio \pm DE de ocho ratones ($p < 0,05$).

7.3.1. Curso temporal de evacuaciones

En cuanto al curso temporal sobre la frecuencia de evacuación registrado cada dos horas durante un periodo de 8 horas ilustrada en la figura 12, se observó que entre el grupo SS y el grupo A-P iniciaron aproximadamente con el mismo número de evacuaciones durante las primeras 2 horas ($27,63 \pm 6,12$; $27,88 \pm 4,58$), el número de evacuaciones iniciales para grupo P y grupo A fue similar entre estos dos grupos ($21,29 \pm 5,82$; $19,38 \pm 2,67$), pero con menor número de evacuaciones en comparación con grupo SS y grupo A - P, al realizar el análisis estadístico y comparar los grupos contra el grupo SS se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). A las 4 horas siguientes los 4

grupos disminuyeron el número de evacuaciones poco menos de la mitad; grupo SS 10, 75±7,19 y A-P 12,13±6,33; en los grupos P (5,29±2,93) y A (4,63±2,97) disminuyeron más de la mitad en comparación con el grupo SS.

Seis horas después el grupo SS mantiene el número de evacuaciones reportado a las cuatro horas anteriores, oscilando entre 9,25±7,17; el grupo A-P 9,75±9,18, el grupo P y A (7,29±6,45; 4,63±2,07) mostraron una ligera disminución no significativa en el número de evacuaciones.

Para las ocho horas el grupo SS junto al grupo A-P presentaron un ligero aumento en el número de evacuaciones (13,38±10,66; 13,00±9,44) y el grupo P y A (10,14±5,27; 8,00±1,93) aumentaron el número de evacuación.

En cuanto al porcentaje de humedad, el grupo P, A y A-P tuvo menos contenido de agua con 54,56±4,68 %; 52.35 ± 13.03%; 63,63±13,17 a diferencia del grupo de ratones SS (75,52 ± 20,91%), donde se observó un mayor contenido de agua. Encontrando diferencias significativas al compararlos contra el grupo SS (p<0.05). Tabla 6, Figura 13.

Tabla 7. Muestra resultados de la frecuencia de evacuación: número de pellets durante 8 horas. El (*) indica el grupo contra el cual se encontró diferencias significativas.

Grupo	Número de pellets (hrs)			
	2	4	6	8
Control (SS)	27,63 ±6,12	10,75 ±7,19	9,25 ±7,17	13,38 ±10,66
Probióticos (P)	*21,29 ±5,82	5,29 ±2,93	7,29 ±6,45	10,14 ±5,27
Antibióticos (A)	*19,38 ±2,67	4,63 ±2,97	4,63 ±2,07	8,00 ±1,93
Antibióticos/ Probióticos (A-P)	27,88 ±4,58	12,13 ±6,33	9,75 ±9,18	13,00 ±9,44
Significancia	P= 0,0350/ P= 0.0285	P= 0,2477	P= 0,8168	P= 0,5192

Curso temporal de evacuaciones

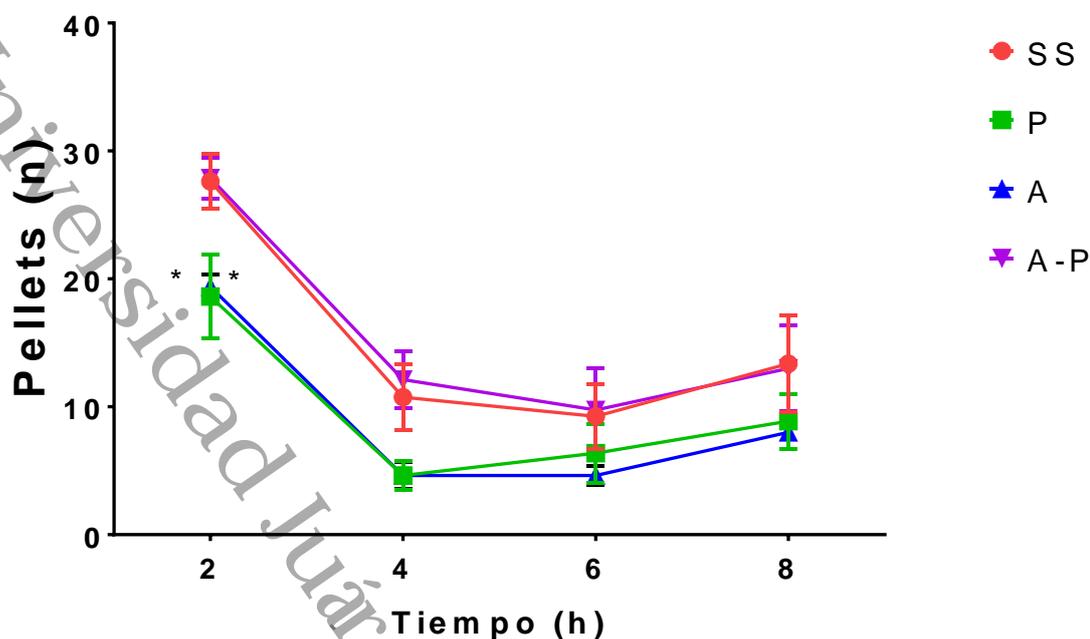


Figura 12. Muestra el curso temporal de las evacuaciones cada 2 horas durante 8 horas. Cada punto representa el promedio \pm DE de ocho ratones ($p < 0.05$). El (*) indica diferencias significativas contra el grupo control (SS).

Porcentaje de agua

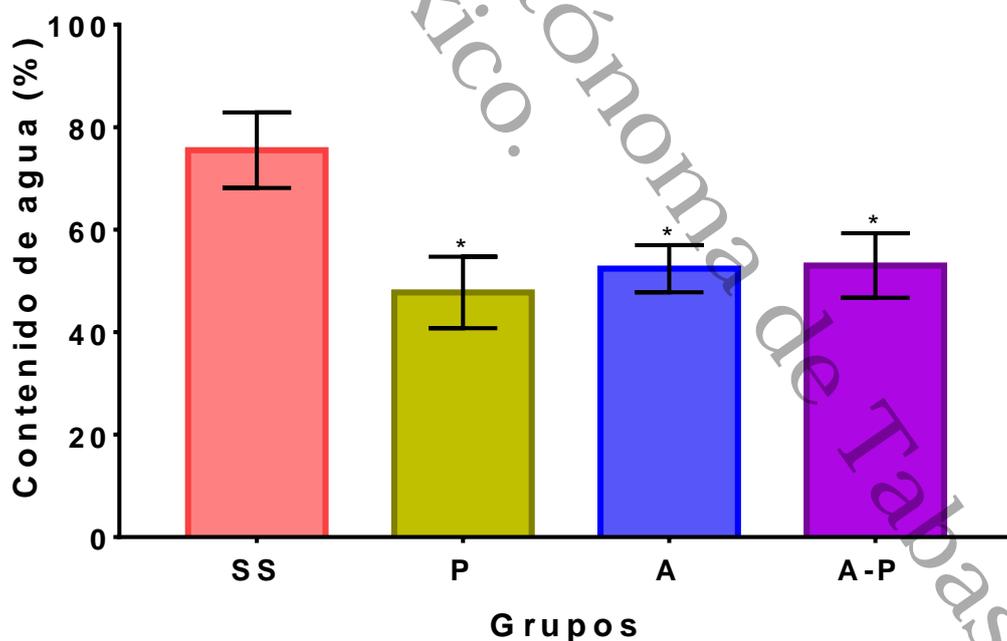


Figura 13. Muestra el porcentaje de agua en heces por grupo. Cada barra representa el promedio \pm DE de ocho ratones, ($p < 0.05$). * representa diferencias estadísticamente significativas.

7.4. Evaluación del tránsito gastrointestinal y rectal en ratones Balb/c después del tratamiento con antibiótico y/o probiótico.

- Transito gastrointestinal

Los ratones del grupo de Probiótico, presentaron un tránsito más lento comparándolo con el grupo antibiótico-probiótico ($90,57 \pm 22,09$ vs $63 \pm 13,17$ min) Tabla 6, Figura 14.

- Transito rectal

Para examinar específicamente el tránsito rectal se midió el tiempo en que tardo en expulsar la perla, en la cual el grupo de ratones tratados con antibióticos tardaron menos en expulsar la perla (115.00 ± 60.24 seg) y el grupo control tardo un poco más en expulsar la perla con 220.41 ± 53.53 segundos, Tabla 6, Figura 15.

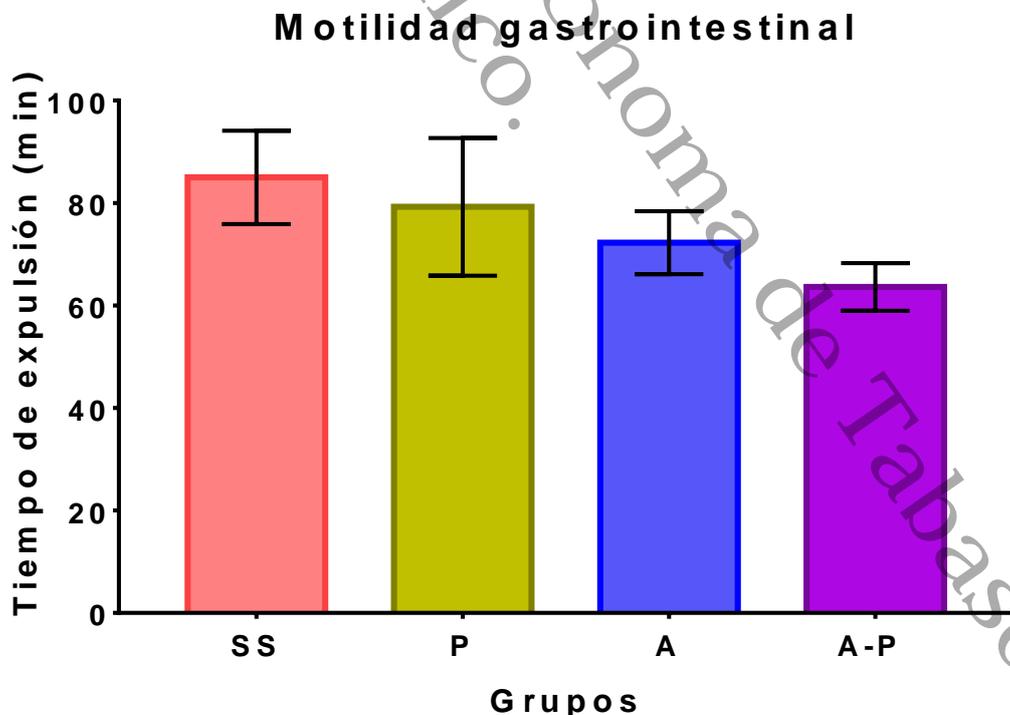


Figura 14. Muestra el tiempo transcurrido hasta la expulsión del pellet color azul de cada grupo. Cada barra representa el promedio \pm DE de ocho ratones ($p < 0.05$).

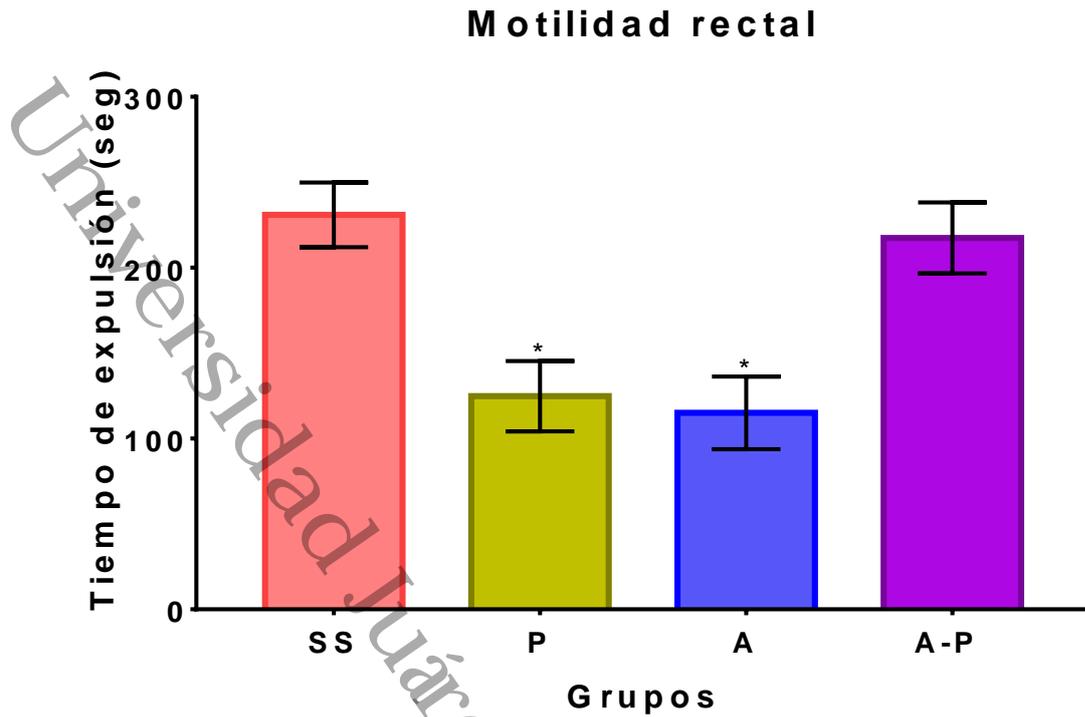


Figura 15. Muestra el resultado del tiempo de la motilidad rectal. Cada barra representa el promedio \pm DE de ocho ratones, ($p < 0.05$). El (*) indica el grupo contra el cual se encontró diferencias significativas.

8. Discusión

El papel protector de las bacterias probióticas contra los patógenos gastrointestinales y los mecanismos subyacentes, así como su participación mejorando los trastornos gastrointestinales cada vez reciben mayor importancia. (Collado, Meriluoto, & Salminen, 2007).

A partir de la mezcla de probiótico comercial que decía contener 5 diferentes cepas de *Lactobacillus*; logramos identificar cepas de *Lactobacillus plantarum*, una bacteria ácido láctica que se encuentra en diversos nichos ecológicos (alimentos tradicionales, productos lácteos, verduras, carne, ensilaje, vino, tractos gastrointestinal, vaginal y urogenital.), caracterizada por sus capacidades particulares de adaptación y plasticidad genómica. Además de producir diversas y potentes bacteriocinas (péptidos antimicrobianos con posibles aplicaciones como conservantes de alimentos o agentes complementarios antibióticos). Estas propiedades le permiten a *Lactobacillus plantarum* ser un modelo genuino para la investigación académica y agente biológico viable con aplicaciones prometedoras (Behera, Ray, & Zdolec, 2018; Seddik et al., 2017). Sin embargo, las cepas de *Lactobacillus plantarum* deben tener una alta capacidad para sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal (GI) y adherirse a sus células epiteliales y, lo más importante, ser una cepa segura (FAO y OMS) de animales y humanos, (Behera et al., 2018).

Tradicionalmente realizar estudios humanizados para analizar los efectos en el tracto gastrointestinal de ratones libres de gérmenes, es la practica más común para observar la función de la microbiota trasplantada, sin embargo existen ciertos inconvenientes que limitan la investigación en este tipo de ratones,

como la accesibilidad a instalaciones gnotobióticas y la complicada adquisición de ratones gnotobióticos (Hintze et al., 2014), A demás que al crecer en condiciones asépticas afecta el desarrollo del sistema de la motilidad gastrointestinal; así como también, el sistema inmune y las funciones metabólicas (Mayer, Tillisch, & Gupta, 2015).

Por lo cual, en el presente estudio se usó un modelo de ratones no libre de bacterias, agotando su microbiota intestinal a partir de la administración vía oral de una mezcla de antibióticos de amplio espectro (X. Ge et al., 2017), administrando posteriormente vía oral una cepa de *Lactobacillus plantarum*. En nuestro estudio se realizó el conteo para analizar el número de *Lactobacillus* antes y después de cada tratamiento. Donde observamos que en el cultivo basal se presentó una variabilidad en el número de *Lactobacillus*, lo cual, se ha encontrado en diversos estudios humanos, donde se ha sugerido que el impacto de los antibióticos se evalúa mejor de forma individual (Power et al., 2014). Lo que hace que sea muy difícil predecir cómo la microbiota intestinal de un individuo puede responder a una intervención (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017; Tap et al., 2015).

En general, el tratamiento con antibióticos conduce a una disminución en la diversidad de la microbiota. A pesar de esto, la comunidad es bastante resistente y puede parecerse al estado previo al tratamiento en cuestión de días o semanas. Sin embargo, una serie de otros estudios han demostrado que las alteraciones de la composición bacteriana después de la administración de antibióticos a menudo pueden persistir durante un período de tiempo prolongado después de la interrupción del tratamiento, y algunos miembros de la comunidad bacteriana no pueden regresar a los niveles previos al

tratamiento y estos pueden incluso ser perdido de la comunidad indefinidamente (Power et al., 2014)

La microbiota puede promover la resistencia a la colonización por especies patógenas. Por ejemplo, los ratones que son tratadas con antibióticos o que se crían en ambientes estériles son más susceptibles a bacterias patógenas entéricas tales como *Shigella flexneri*, *Citrobacter rodentium*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*, *Typhimurium serovar* (Bäumler & Sperandio, 2016).

Estudios afirman que la riqueza y la estabilidad de la microbiota intestinal son parámetros importantes en la simbiosis huésped-microbio (Tap et al., 2015).

Con respecto a los datos obtenidos, se encontró que la administración de la mezcla de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, gentamicina, metronidazole y vancomicina) redujo significativamente ($p < 0.05$) el número de *Lactobacillus plantarum* (disbiosis) y la funcionalidad gastrointestinal (efecto constipante) en el ratón, ambos efectos fueron revertidos con el post-tratamiento con *L. plantarum* este efecto benéfico del probiótico ha sido reportado por diversos autores (Dimidi et al., 2017; Seddik et al., 2017)

Los antibióticos, inducen disbiosis, de acuerdo a su mecanismo de acción, al eliminar un número importante de bacterias; por ejemplo: la ampicilina es un inhibidor de la síntesis de la pared bacteriana e induce lisis celular; la ribosomal 30 S; el metronidazol, favorece la producción de radicales libres (superóxido, peróxido, oxhidrilo), los cuales se intercalan con el ADN bacteriano e impiden los procesos de replicación y transcripción del ADN; la vancomicina, inhibidor de la síntesis de pared celular, al bloquear la acción de la transglucosilasa (Calvo

& Martínez-Martínez, 2009; Delungahawatta et al., 2017; Pérez-Cobas et al., 2013; Theriot et al., 2014). Por lo anterior, los antibióticos, al modificar tipo y número de bacterias presentes en la mucosa intestinal, y ser estas bacterias, en parte, responsables del buen funcionamiento digestivo, en nuestro estudio se encontraron alteraciones gastrointestinales dependientes de la región intestinal estudiada.

Así, las variables como el número de evacuaciones, el porcentaje de humedad, el tránsito gastrointestinal (boca- ano) y rectal (recto-ano) fueron inhibidas de manera significativa por el tratamiento antibiótico, y revertidas, al igual que la disbiosis, por la administración de *L. plantarum*. En este mismo sentido, investigadores como Ge y cols., (2017) reportan un efecto constipante intestinal semejante a nuestros resultados, sin embargo, difieren en el contenido de agua fecal, ya que reportan un contenido mayor en los ratones que recibieron antibiótico, probablemente acorde con un tamaño mayor de los pellets, variable reportada por Ge y cols., (2017), pero no registrada en nuestro estudio. Los tiempos de tránsito más cortos se pueden vincular con una mayor abundancia de especies de rápido crecimiento como el género *Ruminococcaceae-Bacteroides (Firmicutes)*, lo que sugiere una estrategia para evitar el lavado como mecanismo propio del intestino, permitiendo la replicación más rápida de ciertos microorganismos benéficos, esta tendencia está ausente en individuos con presencia del género *prevotella*. Por otro lado, sugieren que los metabolitos derivados de microorganismos alterados del microbioma podrían afectar la motilidad intestinal observado a través del desarrollo del estreñimiento (Xiaolong Ge, Wei Zhao, et al., 2017; Vandeputte et al., 2016), resultado obtenido en nuestro estudio.

También, el efecto inhibitorio inducido por el antibiótico en el ratón Balb/c, se cuantifico con más detalle, al registrar el curso temporal de la defecación (2, 4, 6 y 8 h). Existen estudios del efecto antibiótico ejercido sobre el aparato digestivo, sin embargo, reportes sobre el curso temporal de dicha inhibición son limitados y controversiales (Aguilera, Vergara, & Martinez, 2013). En nuestra investigación, el curso temporal reforzó el dato de que el tránsito rectal se inhibió significativamente en el grupo antibiótico y fue revertido por el probiótico, y sí, los tiempos de tránsito gastrointestinales son productos de los movimientos funcionales y dependientes de la región intestinal, este hecho se reflejó en nuestro curso temporal (Khoruts & Sadowsky, 2016; Tojo et al., 2014; Yang, Jiang, Zheng, Wang, & Yang, 2014).

Por otro lado, en relación al mecanismo de acción del probiótico se sabe que la acción del probiótico e interacción con el eje intestino-cerebro son modulados por los nervios sensoriales aferentes que influyen en la motilidad intestinal. Sin embargo, se ha demostrado que esta propiedad se les confiere a ciertas especies y cepas probióticas (de LeBlanc & LeBlanc, 2014; Dimidi et al., 2017; Saulnier et al., 2013).

Finalmente, en el modelo animal de ratón Balb/c se produjo disbiosis por un tratamiento antibiótico, manifestada por la reducción del número de *Lactobacillus sp* presentes en la materia fecal del ratón y una disfuncionalidad intestinal (menor número de evacuaciones, menor humedad, disminución del tránsito gastrointestinal y rectal). Todo lo anterior, revertido por el post-tratamiento con el probiótico *Lactobacillus plantarum*.

Estos resultados difieren de los mostrados en otros estudios, ya que, el modelo de administración de antibióticos (mecanismo de acción) y cepa de ratón utilizado es diferente.

Comparación de diversos autores con el presente trabajo			
Referencia	Tratamientos		Resultados
<i>Ge, X et al. 2017</i>	<i>Disbiosis x 4 sem</i>	<i>Ampicilina, neomicina, metronidazol y vancomicina</i>	<i>Cambios en la composición de la MI, tránsito colónico y gastrointestinal.</i>
<i>Aguilera, M et al. 2015</i>	<i>Disbiosis x 2 sem</i>	<i>Bacitracina, neomicina</i>	<i>Cambios en la composición de la MI, modificó las respuestas motoras.</i>
<i>Theriot, C et al. 2014</i>	<i>Disbiosis x 2 sem</i>	<i>Cefoperazona Esporas de CDI</i>	<i>↑ Susceptibilidad a CDI Cambio en el microbiota gastrointestinal</i>
<i>Méndes, M et al. 2018</i>	<i>Colitis asociada a cáncer de colon x 60 días</i>	<i>Mezcla de probióticos Azoximetano</i>	<i>↑ Lactobacillus, Bifidobacterium, Clostridium. ↓ Inflamación y carga tumoral</i>
<i>Vandeputte et al., 2016</i>	<i>Humanos sanos sin tratamiento</i>	<i>Observación de frecuencia de evacuación</i>	<i>Relación entre parámetro fecal y contenido de agua afectado no solo por la motilidad intestinal, sino también por la riqueza de la microbiota intestinal.</i>
<i>Khoruts y Sadowsky, 2016</i>	<i>Revisión sistemática</i>	<i>Mecanismo de transferencia de microbiota fecal (TMF)</i>	<i>Intestino posible reservorio de agentes patógenos resistentes posterior a la administración de antibióticos. microbiota restaurada a través de TMF</i>

9. Conclusiones

1. Se identificó como *Lactobacillus plantarum* la cepa aislada del probiótico comercial.
2. La administración del antibiótico significativamente el número de *Lactobacillus* sp, en heces del ratón Balb/c, y se recuperó rápidamente de manera significativa posterior a la administración del probiótico.
3. La motilidad intestinal se normalizó, al igual que el porcentaje de humedad en heces posterior al tratamiento con *Lactobacillus plantarum*.
4. La administración del probiótico redujo el porcentaje de agua en heces y la motilidad intestinal cuando los ratones no habían sido tratados con antibióticos.

10. Perspectivas

Identificar el microbioma normal, presente en el tracto gastrointestinal de esta cepa de ratón Balb/c mediante secuenciación ARNr 16s, para su posterior comparación en otros estudios similares realizado en nuestro proyecto.

Caracterizar sus rasgos de seguridad y propiedades bactericidas de la cepa de *Lactobacillus plantarum* identificada.

Realizar un cepario de BAL, derivadas de varias fuentes (comercial, alimentos de la región, heces humanas), para evaluar posteriormente, sus características funcionales, tecnológicas y de seguridad, así como sus propiedades probióticas sobre el tracto gastrointestinal.

Perspectiva docente: Implementar el modelo de ratón para pruebas de función gastrointestinal como parte de un taller complementario de la licenciatura en Nutrición.

11. Referencias bibliográficas

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*, 6(237), 237ra265. doi:10.1126/scitranslmed.3008599
- Abrahamsson, T. R., Wu, R. Y., & Jenmalm, M. C. (2015). Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatric research*, 77(1-2), 214-219.
- Aguilera, M., Vergara, P., & Martinez, V. (2013). Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(8), e515-e529.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 52(11), 1185-1193.
- Aktas, B., De Wolfe, T. J., Tandee, K., Safdar, N., Darien, B. J., & Steele, J. L. (2015). The effect of Lactobacillus casei 32G on the mouse cecum microbiota and innate immune response is dose and time dependent. *PLoS one*, 10(12), e0145784.
- Azad, M., Kalam, A., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed research international*, 2018.
- Basnayake, C. (2018). Treatment of irritable bowel syndrome. *Australian prescriber*, 41(5), 145.
- Bauer, K. C., Huus, K. E., & Finlay, B. B. (2016). Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. *Cellular microbiology*, 18(5), 632-644. doi:10.1111/cmi.12585
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). Lactobacillus plantarum with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed research international*, 2018.
- Borre, Y. E., O'Keefe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*, 20(9), 509-518. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.002
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26(1), 26191.
- Collado, M., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in applied microbiology*, 45(4), 454-460.
- Costantini, L., Molinari, R., Farinon, B., & Merendino, N. (2017). Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2645.
- Cui, L., Morris, A., & Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome medicine*, 5(7), 63.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., . . . Fischbach, M. A. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559.
- de LeBlanc, A. d. M., & LeBlanc, J. G. (2014). Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(44), 16518.
- Delungahawatta, T., Amin, J. Y., Stanisiz, A. M., Bienenstock, J., Forsythe, P., & Kunze, W. A. (2017). Antibiotic driven changes in gut motility suggest direct modulation of enteric nervous system. *Frontiers in neuroscience*, 11, 588.

- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J. C., & Iannitti, T. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *J Clin Pathol*, *69*(3), 187-203. doi:10.1136/jclinpath-2015-202976
- Dimidi, E., Christodoulides, S., Scott, S. M., & Whelan, K. (2017). Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. *Advances in Nutrition*, *8*(3), 484-494.
- do Carmo, M. S., Itapary dos Santos, C., Araújo, M. C., Girón, J. A., Fernandes, E. S., & Monteiro-Neto, V. (2018). Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food & function*, *9*(10), 5074-5095.
- Ducrotte, P., Sawant, P., & Jayanthi, V. (2012). Clinical trial: Lactobacillus plantarum 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology: WJG*, *18*(30), 4012.
- Fan, W., Huo, G., Li, X., Yang, L., & Duan, C. (2014). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the first six months of life. *Journal of microbiology and biotechnology*, *24*(2), 133-143.
- Forsythe, P., Kunze, W., & Bienenstock, J. (2016). Moody microbes or fecal phrenology: what do we know about the microbiota-gut-brain axis? *BMC medicine*, *14*(1), 58.
- Freedberg, D. E., Toussaint, N. C., Chen, S. P., Ratner, A. J., Whittier, S., Wang, T. C., . . . Abrams, J. A. (2015). Proton pump inhibitors alter specific taxa in the human gastrointestinal microbiome: a crossover trial. *Gastroenterology*, *149*(4), 883-885. e889.
- Frei, R., Akdis, M., & O'Mahony, L. (2015). Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Current opinion in gastroenterology*, *31*(2), 153-158.
- Ganong, W. F., & Barrett, K. E. (2012). *Ganong's review of medical physiology*: McGraw-Hill Medical.
- Ge, X., Ding, C., Zhao, W., Xu, L., Tian, H., Gong, J., . . . Li, N. (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *J Transl Med*, *15*(1), 13. doi:10.1186/s12967-016-1105-4
- Ge, X., Ding, C., Zhao, W., Xu, L., Tian, H., Gong, J., . . . Li, N. (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *J Transl Med*, *15*(1), 13.
- Ge, X., Zhao, W., Ding, C., Tian, H., Xu, L., Wang, H., . . . Zhu, W. (2017). Potential role of fecal microbiota from patients with slow transit constipation in the regulation of gastrointestinal motility. *Scientific reports*, *7*(1), 441.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., . . . Bell, J. T. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, *159*(4), 789-799.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal physiology and function *Gastrointestinal Pharmacology* (pp. 1-16): Springer.
- Healey, G. R., Murphy, R., Brough, L., Butts, C. A., & Coad, J. (2017). Interindividual variability in gut microbiota and host response to dietary interventions. *Nutrition reviews*, *75*(12), 1059-1080.
- Hintze, K. J., Cox, J. E., Rompato, G., Benninghoff, A. D., Ward, R. E., Broadbent, J., & Lefevre, M. (2014). Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut microbes*, *5*(2), 183-191.
- Jamshed, N., Lee, Z.-E., & Olden, K. W. (2011). Diagnostic approach to chronic constipation in adults. *American family physician*, *84*(3), 299.
- Kenneth, S. S. (2017). *Anatomy & physiology: The unity of form and function*: McGraw-Hill.
- Khoruts, A., & Sadowsky, M. J. (2016). Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *13*(9), 508-516. doi:10.1038/nrgastro.2016.98

- Kinch, M. S., Patridge, E., Plummer, M., & Hoyer, D. (2014). An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease: antibacterial agents. *Drug discovery today*, 19(9), 1283-1287.
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, E. J., & Sánchez Castañeda, N. (2014). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana de Pediatría*, 86(4), 502-513.
- Lacy, B. E., & Patel, N. K. (2017). Rome Criteria and a Diagnostic Approach to Irritable Bowel Syndrome. *J Clin Med*, 6(11). doi:10.3390/jcm6110099
- Le Bastard, Q., Al-Ghalith, G., Grégoire, M., Chapelet, G., Javaudin, F., Dailly, E., . . . Montassier, E. (2018). Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 47(3), 332-345.
- Levy, M., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2015). Metagenomic cross-talk: the regulatory interplay between immunogenomics and the microbiome. *Genome medicine*, 7(1), 120.
- Ligaarden, S. C., Axelsson, L., Naterstad, K., Lydersen, S., & Farup, P. G. (2010). A candidate probiotic with unfavourable effects in subjects with irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *BMC gastroenterology*, 10(1), 16.
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*: Ed. Médica Panamericana.
- Malago, J. (2014). Contribution of microbiota to the intestinal physicochemical barrier. *Beneficial microbes*, 6(3), 295-311.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Mawer, S., & Alhawaj, A. F. (2019). *Physiology, Defecation StatPearls [Internet]*: StatPearls Publishing.
- Mayer, E., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest*. 2015; 125: 926–38 doi: 10.1172/JCI76304.
- Mendes, M. C. S., Paulino, D. S., Brambilla, S. R., Camargo, J. A., Persinoti, G. F., & Carvalheira, J. B. C. (2018). Microbiota modification by probiotic supplementation reduces colitis associated colon cancer in mice. *World journal of gastroenterology*, 24(18), 1995.
- Mexicana, N. O. (1994). NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. *Diario Oficial de la Federación*, 12(6).
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., . . . Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 81(4), e00036-00017. doi:10.1128/MMBR.00036-17
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., . . . Mancabelli, L. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 81(4), e00036-00017.
- Mulak, A., & Bonaz, B. (2015). Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World journal of gastroenterology*, 21(37), 10609-10620. doi:10.3748/wjg.v21.i37.10609
- Ng, K. M., Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., . . . Monack, D. M. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*, 502(7469), 96.
- Palit, S., Lunniss, P. J., & Scott, S. M. (2012). The physiology of human defecation. *Digestive diseases and sciences*, 57(6), 1445-1464.
- Pérez-Cobas, A. E., Gosalbes, M. J., Friedrichs, A., Knecht, H., Artacho, A., Eismann, K., . . . von Bergen, M. (2013). Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*, 62(11), 1591-1601.
- Peterson, C. T., Sharma, V., Elmén, L., & Peterson, S. N. (2015). Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clinical & Experimental Immunology*, 179(3), 363-377.

- Pham, T. A. N., & Lawley, T. D. (2014). Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections. *Current opinion in microbiology*, 17, 67-74.
- Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, 111(3), 387-402.
- Puniya, M., Sangu, K., & Bhardwaj, A. (2012). Isolation and biochemical characterization of Lactobacillus species isolated from Dahi. *Journal of Research in Antimicrobials*, 1, 1-11p.
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.
- Rogers, M. A., & Aronoff, D. M. (2016). The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 178. e171-178. e179.
- Romero-Trujillo, J. O., Frank-Márquez, N., Cervantes-Bustamante, R., Cadena-León, J. F., Montijo-Barrios, E., Zárate-Mondragón, F., . . . Ramírez-Mayans, J. (2012). Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta pediátrica de México*, 33(4), 207-214.
- Rondon, L., Añez Zavala, M., Salvatierra Hidalgo, A., Meneses Barrios, R. T., & Heredia Rodriguez, M. T. (2015). Probióticos: generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78(4), 123-128.
- Rooks, M. G., & Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341-352.
- Sampson, H. A., O'Mahony, L., Burks, A. W., Plaut, M., Lack, G., & Akdis, C. A. (2018). Mechanisms of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 11-19.
- Saulnier, D. M., Ringel, Y., Heyman, M. B., Foster, J. A., Bercik, P., Shulman, R. J., . . . Hecht, G. (2013). The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut microbes*, 4(1), 17-27.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, E., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 9(2), 111-122.
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*, 631-647.
- Sherwin, E., Sandhu, K., Dinan, T., & Cryan, J. (2016). May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS Drugs*, 30. doi:10.1007/s40263-016-0370-3
- Shibata, N., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2017). Dietary and microbial metabolites in the regulation of host immunity. *Frontiers in microbiology*, 8, 2171.
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: from isolation to application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666-676.
- Smolinska, S., Groeger, D., & O'Mahony, L. (2017). Biology of the microbiome 1: interactions with the host immune response. *Gastroenterology Clinics*, 46(1), 19-35.
- Steinert, A., Radulovic, K., & Niess, J. (2016). Gastro-intestinal tract: The leading role of mucosal immunity. *Swiss medical weekly*, 146(1314).
- Suárez, J. E. (2015). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 3-9.
- Sweetser, S. (2012). *Evaluating the patient with diarrhea: a case-based approach*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Szyclynska, M. A., Di Rosa, M., Castorina, A., Mobasher, A., & Musumeci, G. (2019). A correlation between intestinal microbiota dysbiosis and osteoarthritis. *Heliyon*, 5(1), e01134.
- Tap, J., Furet, J. P., Bensaada, M., Philippe, C., Roth, H., Rabot, S., . . . Corthier, G. (2015). Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environmental microbiology*, 17(12), 4954-4964.

- Theriot, C. M., Koenigsnecht, M. J., Carlson Jr, P. E., Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., . . . Young, V. B. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature communications*, 5, 3114.
- Thiruppathy, K., Mason, J., Akbari, K., Raeburn, A., & Emmanuel, A. (2017). Physiological study of the anorectal reflex in patients with functional anorectal and defecation disorders. *Journal of digestive diseases*, 18(4), 222-228.
- Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(41), 15163.
- Turpin, W., Espin-Garcia, O., Xu, W., Silverberg, M. S., Kevans, D., Smith, M. I., . . . Otley, A. (2016). Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nature genetics*, 48(11), 1413.
- Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Tito, R. Y., Joossens, M., & Raes, J. (2016). Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*, 65(1), 57-62.
- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28(2), 122-130.
- Wang, H. X., & Wang, Y. P. (2016). Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl)*, 129(19), 2373-2380. doi:10.4103/0366-6999.190667
- Wang, J., Thingholm, L. B., Skiecevičienė, J., Rausch, P., Kummen, M., Hov, J. R., . . . Szymczak, S. (2016). Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nature genetics*, 48(11), 1396.
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M., & Fichna, J. (2015). Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21(7), 1674-1682.
- Wlasiuk, G., & Vercelli, D. (2012). The farm effect, or: when, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 12(5), 461-466.
- Yadav, A. K., Tyagi, A., Kumar, A., Saklani, A. C., Grover, S., & Batish, V. K. (2015). Adhesion of indigenous *Lactobacillus plantarum* to gut extracellular matrix and its physicochemical characterization. *Archives of microbiology*, 197(2), 155-164. doi:10.1007/s00203-014-1034-7
- Yang, K., Jiang, Z., Zheng, C., Wang, L., & Yang, X. (2014). Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Journal of animal science*, 92(4), 1496-1503.

12. Anexos



SAN ANTONIO, TX
INFO@ACADEMIAJOURNALS.COM
ACADEMIAJOURNALS.COM

27 mayo 2019

AUTORES: Maloy Hernández Hernández
Hidemi Aguilar Mariscal
Xavier Miguel Boldo León
Leova Pacheco Gil

ARTÍCULO: Efecto del tratamiento con antibióticos sobre la motilidad intestinal en ratones BalbC

ARTÍCULO Núm: CPS316

Estimados autores,

Con agrado les informamos que, con fecha de hoy, el artículo arriba citado ha sido aprobado para su presentación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Chiapas 2019. El congreso tendrá lugar los días 26, 27, y 28 de junio del año 2019, en San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.

El artículo será incluido en las publicaciones del congreso, que incluyen modalidades ISSN e ISBN. Le recordamos que la política del congreso es que para recibir su reconocimiento e incluir su artículo en las publicaciones, es necesario presentar el mismo en el congreso. Le rogamos que utilice su número de artículo en toda correspondencia con Academia Journals.

Saludos cordiales.



Dr. Rafael Moras, P.E.
Editor
Academia Journals
Info@academiajournals.com



05 julio 2019

AUTORES: Dra. Hidemi Aguilar Mariscal
Lic. Nutr. Maloy Hernández Hernández
Dra. Leova Pacheco Gil
Dr. Xavier Boldo

ARTÍCULO: Influencia del estrés sobre la actividad gastrointestinal en un modelo murino

ARTÍCULO Núm: PUE446

Estimados autores,

Con agrado les informamos que, con fecha de hoy, el artículo arriba citado ha sido aprobado para su presentación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Puebla 2019. El congreso tendrá lugar los días 15 y 16 de agosto del año 2019, en Puebla, Puebla, México.

El artículo será incluido en las publicaciones del congreso, que incluyen modalidades ISSN e ISBN. Le recordamos que la política del congreso es que para recibir su reconocimiento e incluir su artículo en las publicaciones, es necesario presentar el mismo en el congreso. Le rogamos que utilice su número de artículo en toda correspondencia con Academia Journals.

Saludos cordiales.

Dr. Rafael Moras, P.E.
Editor
Academia Journals
Info@academiajournals.com