



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICION

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS Y DEL TRASPLANTE DE
MICROBIOTA FECAL SOBRE EL NIVEL GLUCÉMICO EN RATONES
DIABÉTICOS NO INSULINODEPENDIENTES Y SANOS**

P R E S E N T A

L.N. ZULEMA BUENO HERMOSA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO

SINODALES:

DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ

DRA. IVETTE AMÉRICA BARRERA MOLINA

DRA. OLLIN CELESTE MARTÍNEZ RAMÍREZ

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE 2020

AGRADECIMIENTOS

En este espacio quiero extender mi más sincero agradecimiento a las instituciones y personas que con su vasto conocimiento y soporte científico y humano colaboraron para que este proyecto fuera posible.

En primer lugar, quiero agradecer el apoyo económico brindado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), quien a través del proyecto UAEMOR-PTC-399 financió los insumos necesarios para llevar a cabo este trabajo, así mismo gracias por los recursos brindados a través de la Beca para estudios de maestría No. 923238 y de la “Beca de Movilidad Nacional 2019.1” para la manutención durante el tiempo de este proyecto.

Muy especialmente quiero agradecer a mi tutora y directora de tesis, la Doctora Delia Vanessa López Guerrero, por la confianza que me brindó al aceptarme dentro de este proyecto, gracias por su acertada orientación, soporte y aportaciones críticas, las cuales me permitieron aprovechar al máximo el trabajo realizado y que esta tesis fuera posible.

Gracias al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, quien está a cargo del Laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo y realizar los experimentos correspondientes para concluir con éxito este proyecto.

Mi agradecimiento al Instituto de Biotecnología de la UNAM, especialmente al Bioterio del cual está a cargo la Dra. Elizabeth Mata, y al Dr. Gustavo Pedraza Alva del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, ya que su apoyo fue imprescindible para la realización de los procedimientos de este proyecto.

Gracias a mis compañeros de maestría, Noemí Landa, Gabriela Sánchez, Davidnia García, Lilia Cruz, Josué Cruz, Ricardo López, por todos los buenos momentos, gracias por su simpatía, compañía e interés en mi trabajo y, sobre todo, gracias por las porras cuando sentía que todo ya estaba perdido. Gracias infinitas y especiales a mi nutriólogo favorito Enrique Gómez, Kike, gracias por ese acompañamiento, gracias por tu paciencia y todo lo que me enseñaste, simplemente sin tu ayuda no podía, gracias por transmitirme paso a paso como un manual humano todo lo que aprendiste, eres el mejor enseñando, gracias por aportarme además de conocimientos académicos y prácticos, tu maravillosa amistad.

Finalmente, gracias a mi familia, en especial a mi madre y hermana Susi, por su comprensión y apoyo incondicional, gracias por animarme, y con palabras o sin ellas, hacerme llegar el mensaje de que yo podía aun cuando todo estuviera en contra, gracias por deslindarme de responsabilidades en casa para que pudiera dar el cien en mi posgrado, quiero que estén seguras de

que aproveché al máximo este tiempo y que sepan que este logro también es de ustedes. Gracias de manera muy especial a Alexis por estar a mi lado compartiendo mis alegrías y angustias, por ser mi compañero y mi más fiel admirador, gracias por creer en mi aun cuando yo misma dude de mis capacidades, gracias por compartir tu tiempo y dejar de lado tus cosas para ayudarme con las mías, por madrugar, desvelarte y viajar conmigo, gracias por hacer lo necesario para que sintiera un poco más ligera esta travesía, sin duda por ti encontré las fuerzas necesarias para llegar hasta el final.

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi madre, cuya bendición siempre me protege y acompaña, mami, te doy este trabajo como ofrenda por tu incansable lucha y amor diario, te la dedico a ti Susi, por que eres una luchadora y de las personas que más aportan a mi vida, te la dedico a ti Alexis, porque es el primero de muchos proyectos que tendremos juntos, les amo con toda mi alma, todo valió la pena...

RESUMEN

La microbiota es un conjunto de microorganismos que viven en asociación con el individuo, el intestino es el reservorio más denso y diverso. La concentración de estas bacterias varía por factores como la edad o presencia de patologías, algunas de estas cursan con disbiosis como la DM2, en cuyo caso, se ha considerado la composición de la microbiota como un factor ambiental que, en conjunto con los ya conocidos, desencadena su aparición. Los mecanismos que vinculan a la microbiota intestinal con la DM2 van desde la extracción de nutrientes, inmunidad, inflamación, etc., debido a esto, se ha considerado la modulación de la microbiota como un tratamiento adyuvante prometedor para esta y otras enfermedades, algunas de las estrategias son la administración de probióticos o TMF, pero son necesarios más estudios que aclaren cual es el método que proporcione resultados más tangibles y duraderos. En el presente trabajo, se buscó evaluar el impacto de la administración de probióticos y TMF en el nivel glucémico. Para ello, se utilizaron ratones de la cepa CD1 tanto diabetizados con STZ como sanos, a los cuales se dio un probiótico durante 21 días y TMF por 2 días, también se evaluó el cambio de peso corporal, consumo de alimento y agua. Bajo estas condiciones, se encontró que los probióticos no tuvieron impacto en el nivel glucémico, peso corporal y consumo de alimento en ratones diabetizados, pero si en ratones sanos y que el TMF no impactó en ningún parámetro medido. Aunque se resalta la importancia de la modulación de la microbiota intestinal con probióticos y TMF como una alternativa de mantener la salud, no todas las bacterias comerciales pueden tener este efecto, hacen falta más estudios de estandarización tanto del procedimiento, cepas de ratones, dosis, así como evaluar otros parámetros metabólicos.

ABSTRACT

The microbiota is a set of microorganisms that live in association with the individual, the gut is the densest and most diverse reservoir. The concentration of these bacteria varies due to factors such as age or the presence of pathologies, some of these occur with dysbiosis such as DM2, in which case, the composition of the microbiota has been considered an environmental factor that, together with those already known, triggers its appearance. The mechanisms that link the gut microbiota with DM2 range from the extraction of nutrients, immunity, inflammation, etc., due to this, modulation of the microbiota has been considered as a promising adjuvant treatment for this and other diseases, some of the strategies are the administration of probiotics or FMT, but more studies are needed to clarify which is the method that provided more tangible and lasting results. In the present work, we sought to evaluate the impact of the administration of probiotics and FMT on the glycemic level. For this, mice of the CD1 strain, both diabetized with STZ and healthy, were used, who were given a probiotic for 21 days and FMT for 2 days, the change in body weight, food and water consumption was also evaluated. Under these conditions, it was found that probiotics had no impact on glycemic level, body weight and food consumption in diabetic mice, but in healthy mice, and that the FMT did not impact any measured parameter. Although the importance of modulating the intestinal microbiota with probiotics and FMT is highlighted as an easy way to maintain health, not all commercial bacteria can have this effect, more standardization studies are needed, both procedure, strains, doses, as well how to evaluate other metabolic parameters.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS	X
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Microbiota humana.....	1
1.2 Composición de la microbiota intestinal humana.	2
1.3 Funciones de la microbiota intestinal.....	6
1.4 Microbiota intestinal y diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	9
1.4.1 Extracción de nutrientes.....	10
1.4.2 Inducción de inmunidad e inflamación.....	12
1.4.3 Endócrino.....	15
1.4.4 Producción de ácidos grasos.....	16
1.4.5 Transformación de ácidos biliares	17
1.4.6 Otros aspectos.....	18
1.5 Diabetes Mellitus tipo 2	19
1.5.1 Definición de DM2	20
1.5.2 Prevalencia de DM2.....	21
1.5.3 Fisiopatología de la DM2.....	23
1.6 Mecanismos para modular la microbiota intestinal	27
1.6.1 Antibióticos	28
1.6.2 Probióticos.....	35
1.6.3 Prebióticos y simbióticos.....	45
1.6.4 Trasplante de microbiota fecal (TMF)	50
1.7 Modelos experimentales.....	59
1.7.1 Modelos animales para el estudio de la DM2	62
1.7.2 Composición de la microbiota del ratón.....	64
2. JUSTIFICACIÓN	66
3. HIPÓTESIS	68
4. OBJETIVOS	68
4.1 Objetivo general	68

4.2	Objetivos específicos.....	68
5.	METODOLOGIA.....	69
5.1	Animales de laboratorio.....	69
5.2	Inducción de diabetes experimental	69
5.3	Curva de tolerancia a la glucosa (CTOG).....	70
5.4	Control de ingesta de alimento y agua	70
5.5	Control de peso	71
5.6	Eliminación de microbiota nativa con antibióticos	71
5.7	Trasplante de microbiota fecal en ratones	71
5.8	Administración de probióticos en ratones	72
5.3	Diseño experimental.....	74
5.4	Análisis estadístico.....	75
5.5	Consideraciones éticas	75
6.	RESULTADOS	76
6.1	Modelo de diabetización con Estreptozotocina	76
6.2	Intervención con probióticos y TMF en ratones diabetizados.....	78
6.2.1	Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG).....	78
6.2.2	Glucosa en ayuno.....	80
6.2.3	Evaluación del peso de los ratones	83
6.2.4	Evaluación del consumo de alimento.....	85
6.2.5	Evaluación del consumo de agua.....	88
6.3	Intervención con probióticos y TMF en ratones sanos	91
6.3.1	Curvas de Tolerancia a la Glucosa (CTOG) en ratones sanos.....	92
6.3.2	Glucosa en ayuno de ratones sanos.....	98
6.3.3	Evaluación del peso corporal de ratones sanos	101
6.3.4	Consumo de alimento en ratones sanos	105
7.	DISCUSIÓN.....	108
8.	REFERENCIAS	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conformación de la microbiota intestinal en diferentes etapas y condiciones de la vida. Pág. 5

Figura 2. Mecanismos que explican la relación entre microbiota intestinal y DM2. Pág.10

Figura 3. Factores que influyen en el desarrollo de DM2. Pág. 27

Figura 4. Impacto de los antibióticos en la diversidad de la microbiota intestinal. Pág. 30

Figura 5. Vías de administración de trasplante de microbiota fecal. Pág.51

Figura 6. Criterios de exclusión para donar microbiota fecal. Pág. 55

Figura 7. Diseño experimental en grupo de ratones diabetizados. Pág. 74

Figura 8. Diseño experimental en grupo de ratones sanos. Pág. 4

Figura 9. Cambio en la concentración de glucosa en ayuno de ratones diabetizados. Pág.82

Figura 10. Cambio en el peso corporal de ratones diabetizados. Pág. 84

Figura 11. Cambio en el consumo de alimento de ratones diabetizados. Pág. 86

Figura 12. Cambio en el consumo de agua de ratones diabetizados. Pág. 89

Figura 13. Cambio en la concentración de glucosa en ayuno de ratones sanos. Pág. 99

Figura 14. Cambio en el peso corporal de ratones sanos. Pág. 102

Figura 15. Cambio en el consumo de alimento de ratones sanos. Pág. 105

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comportamiento de peso corporal después de la diabetización con STZ. Pág. 76

Gráfica 2. Concentración media de glucosa en ratones diabetizados con STZ. Pág. 77

Gráfica 3. Ingesta promedio de alimento después de la diabetización con STZ. Pág. 78

Gráfica 4. CTOG en ratones diabetizados después del TMF y administración de probióticos. Pág. 79

Gráfica 5. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa en CTOG después del TMF y administración de probióticos. Pág. 80

Gráfica 6. Porcentaje de variación de glucosa en ayuno de ratones diabetizados durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 83

Gráfica 7. Porcentaje de variación de peso corporal de ratones diabetizados durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 85

Gráfica 8. Porcentaje de variación del consumo de alimento de ratones diabetizados durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 87

Gráfica 9. Patrón de consumo de alimento en ratones diabetizados durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 88

Gráfica 10. Porcentaje de variación del consumo de agua de ratones diabetizados durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 90

Gráfica 11. Patrón de consumo de agua en ratones diabetizados durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 91

Gráfica 12. CTOG #1 en ratones sanos antes de la administración de probióticos y TMF. Pág. 93

Gráfica 13. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa de ratones sanos en la CTOG #1 antes de la administración de probióticos y TMF. Pág. 94

Gráfica 14. CTOG #2 en ratones sanos inmediatamente después de la administración de probióticos y TMF. Pág. 95

Gráfica 15. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa de ratones sanos en la CTOG #2 inmediatamente después de la administración de probióticos y TMF. Pág. 96

Gráfica 16. CTOG #3 en ratones sanos 4 semanas después de administración de probióticos y TMF. Pág. 97.

Gráfica 17. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa de ratones sanos en la CTOG #3 4 semanas después de la administración de probióticos y TMF. Pág. 98

Gráfica 18. Porcentaje de variación de glucosa en ayuno de ratones sanos durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 100

Gráfica 19. Porcentaje de variación de glucosa en ayuno de ratones sanos, grupos con probióticos vs grupo control durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 101

Gráfica 20. Porcentaje de variación de peso corporal de ratones sanos durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 103

Gráfica 21. Porcentaje de variación de peso corporal de ratones sanos, grupos con probióticos vs grupo control durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 104

Gráfica 22. Porcentaje de variación del consumo de alimento de ratones sanos durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 107

Gráfica 23. Porcentaje de variación de consumo de alimento de ratones sanos, grupos con probióticos vs grupo control durante la intervención con probióticos y TMF. Pág. 108

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Ácidos grasos

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

AGV: Ácidos grasos volátiles

AOS: Apnea Obstructiva del sueño

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

BAA6: *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis A6

BAL: Bacterias ácido lácticas

B. animalis: *Bifidobacterium animalis*

B. breve: *Bifidobacterium breve*

B. infantis: *Bifidobacterium infantis*

B. longum: *Bifidobacterium longum*

B. pseudocatenulatum: *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

CACP: Con antibiótico con probiótico

CACT: Con antibiótico con trasplante

CASP: Con antibiótico sin probiótico

C. difficile: *Clostridium difficile*

CO₂: Dióxido de carbono

CTOG: Curva de tolerancia oral a la glucosa

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

EANC: Edulcorantes artificiales no calóricos

E. coli: *Escherichia coli*

EFSA: European Food Safety Authority

ENEC: Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FFAR2: Free fatty acid receptor 2

FFAR3: Free fatty acid receptor 3

Fiaf: Factor adipocitario inducido por el ayuno

FOS: Fructooligosacáridos

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GIP: Péptido inhibitorio

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1

GLP-2: Péptido similar al glucagón tipo 2

GOS: Galactooligosacáridos

HDL: High density lipoprotein

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HMG-Coa: Hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa

IgA: Inmunoglobulina A

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IMC: Índice de masa corporal

Kcal: Kilocalorías

L. casei: *Lactobacillus casei*

L. curvatus: *Lactobacillus curvatus*

LDL: Low density lipoprotein

L. gasseri: *Lactobacillus gasseri*

L. paracasei: *Lactobacillus paracasei*

L. platarumi: *Lactobacillus plantarum*

LPS: Lipopolisacárido

L. reureri: *Lactobacillus reuteri*

L. rhamnosus: *Lactobacillus rhamnosus*

L. sakeii: *Lactobacillus sakei*

NK: Natural killer

NO₂: Grupo nitro

OMI: Isomaltooligosacáridos

OMS: Organización Mundial de Salud

OTU: Operational taxonomic unit

PBS: Phosphate-buffered saline

pH: Potencial de hidrógeno

PYY: Péptido YY

RI: Resistencia a la insulina

SACP: Sin antibiótico con probiótico

SASP: Sin antibiótico sin probiótico

SBOS: Oligosacáridos de soja

Sp: Especie

Spp: Especies

STZ: Estreptozotocina

TGR5: Receptor de membrana del ácido biliar

TLRs: Toll-like receptor

TMAO: Trimetilamina
TMF: Trasplante de microbiota fecal
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TOS: Transgalactooligosacáridos
T0: Tiempo minuto cero
T15: Tiempo minuto quince
T60: Tiempo minuto sesenta
T90: Tiempo minuto noventa
UFC: Unidades formadoras de colonias
VIH: Virus inmunodeficiency Human
VLDL: Very low density lipoprotein
XOS: Xilooligosacáridos

1. ANTECEDENTES

1.1 Microbiota humana

La microbiota se puede definir como el conjunto de microorganismos que viven en asociación con un individuo. Está compuesta de aproximadamente 10^{14} bacterias, arqueas, virus y hongos, siendo las células procariontes más abundantes que las eucariontes propias del ser humano^{1,2}.

Los nichos donde podemos encontrar microorganismos son: la piel, la conjuntiva, la leche materna, el tracto respiratorio y el tracto genitourinario, teniendo cada uno de estos sitios anatómicos una microbiota específica con características y funciones muy diversas¹.

Cuando hablamos de microbiota podemos hablar de dos poblaciones dependiendo de su temporalidad: la microbiota residente, la cual es muy característica de cierta región del organismo y siempre está presente (por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* en piel o *Escherichia coli* en el intestino), y por otro lado la microbiota transitoria que varía de un sujeto a otro y los microorganismos colonizan de manera intermitente ciertas regiones². Hablando propiamente de las bacterias asociadas al organismo, se ha visto que no solo no son perjudiciales, sino que son necesarias para el adecuado desarrollo y funcionamiento del cuerpo^{1,3}.

El intestino es el reservorio más denso y diverso de microorganismos en donde se han calculado alrededor de 10 a 100 trillones de bacterias que pueblan en un adulto

y tienen un peso de 1.5 kilogramos, por esto se ha considerado uno de los ecosistemas más complejos sobre la faz de la tierra. A lo largo del tubo digestivo, la distribución de la microbiota va cambiando. Tanto la densidad como la diversidad de la población bacteriana depende tanto de las características anatómicas como de condiciones ambientales del tubo digestivo. Por ejemplo, la cavidad oral presenta una arquitectura compleja diferente al resto del sistema gastrointestinal que es tubular, los ácidos biliares del duodeno o la acidez del estómago generan también cambios en el ambiente microbiano^{1,2}.

La concentración de bacterias es relativamente baja en duodeno (10^2 a 10^3 UFC/g) tratándose principalmente de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Corynebacterium*, aumenta en yeyuno e íleon (10^5 a 10^7 UFC/g) y alcanza su máxima concentración en colon (10^{12} a 10^{14} UFC/g) predominando Bacteroidetes y Firmicutes, es en esta parte distal (colon y ciego) donde se dan más los procesos de fermentación, y donde las bacterias tienen mayor crecimiento, aquí también se da una mayor producción de ácidos grasos volátiles (AGV) que finalmente hacen que disminuya el pH (5.4-5.9); ya en el colon descendente, los procesos anteriores se dan con menos intensidad y por lo tanto el pH se encuentra más alto (6.6-6.9), con todo lo anterior se ha calculado que la masa fecal está formada por bacterias en un 60% aproximadamente. El genoma colectivo de la microbiota, se llama microbioma y tiene más de 5 millones de genes, es decir, supera por 150 el propio genoma humano^{3,4}.

1.2 Composición de la microbiota intestinal humana.

Se han identificado 3 principales familias: Firmicutes (gram-positivos), estas se encuentran en mayor cantidad y proporción en el intestino (60-80%), tiene más de 200 géneros siendo los más importantes *Lactobacillus*, *Micoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*, se unen a polisacáridos de plantas, fibras y mucina y son más eficientes fermentando hidratos de carbono insolubles; la segunda familia son los Bacteroidetes (gram-negativos), incluye sólo 20 géneros (20-30% de la microbiota total) y de estos los que llegan a ser más eficientes en la utilización de sustratos, usan oligosacáridos y polisacáridos solubles provenientes de polisacáridos insolubles, se ha visto que esta familia es más abundante cuando se lleva una dieta hipocalórica, los más abundantes de estos son los Bacteroides, Prevotella y Xylanibacter; y finalmente están las Actinobacterias y Verrucomicrobia (gram-positivos), que son minoría representan solo un 10%, con predominio del género Bifidobacterium; ya en menor cantidad (<1%), se encuentran las Proteobacterias como *Escherichia* y *Enterobacteriaceae*^{1,5,6}.

Cada persona posee una composición de microbiota única, con gran diversidad y variabilidad entre cada individuo y todo esto depende de muchos factores como la edad, el sexo, la geografía, etnia, familia, dieta, etc.^{1,5}.

Anteriormente se creía que el ambiente intrauterino era un ambiente estéril libre de cualquier microorganismo, sin embargo, cada vez existe más evidencia de que hay microbios en este medio, una prueba de ello son las bacterias productoras de ácido láctico encontradas en el meconio de recién nacidos tanto vía vaginal como por cesárea; otro hallazgo es la microbiota comensal no patógena presente en la

placenta la cual es muy similar al microbioma oral⁷. El perfil de bacterias que se encuentra en la placenta a nivel de phylum son: Proteobacterias (los más abundantes), Bacteroidetes, Actinobacterias y Firmicutes, esta proporción difiere significativamente entre madres con y sin diabetes gestacional. Las rutas que se han sugerido para esta inoculación placentaria son tres: oral-fetoplacentaria, gastrointestinal-fetoplacentaria (uniones intercelulares débiles) y genitourinaria-fetoplacentaria. Se sugiere que la microbiota placentaria está asociada con ciertos resultados del embarazo y otras enfermedades humanas y que también algunas condiciones en el embarazo alteran el perfil microbiano, por ejemplo, el tener trabajo de parto prematuro, obesidad materna o aumento excesivo de peso gestacional (asociado a inflamación de la placenta) o el tener bajo peso al nacer, entre otros^{7,8}.

Las bacterias que predominan en los primeros días después del nacimiento son las Proteobacterias y Actinobacterias, pero es hasta el final del primer año de vida, cuando el niño inicia ingesta de alimentos, que su microbiota se acerca más al perfil de microbiota adulta; sin embargo es hasta los 2 años y medio de edad que su microbiota se vuelve más heterogénea y se asemeja completamente a la microbiota adulta, ya contando con una gran diversidad, a partir de este momento, predominan cinco filos principales: los gram-negativos *Bacteroidetes*, Proteobacteria y Verrucomicrobia, y los gram-positivos Actinobacteria y Firmicutes; y un archaea (*Euryarchaeota*), distribuidos a lo largo de toda la extensión intestinal. Mediante secuenciación de genes del ARN ribosomal 16S y 18S, se ha visto que los phyla Bacteroidetes y Firmicutes integran poco más del 90% de las especies que dominan

principalmente la región del colon. Una vez alcanzada la madurez, la microbiota permanece estable hasta la vejez (Figura 1)^{1,3,9}.

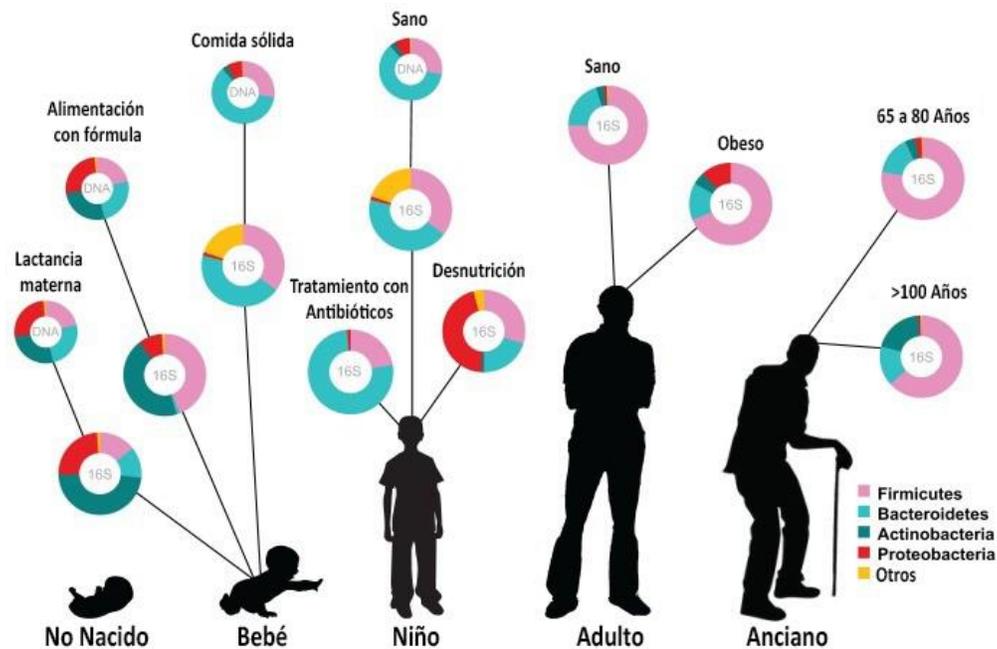


Figura 1. Inicio y conformación de la abundancia de diferentes phylas a través de las diferentes etapas y condiciones de la vida medido por ARN 16S o por enfoques metagenómicos (ADN). Fuente: Ottman N, *et al* 2012.⁹

Son muchos los factores que pueden inducir un cambio en la composición de la microbiota intestinal, estos son principalmente ambientales y se ha visto más acentuado en las últimas décadas, un ejemplo de ello es lo observado en países desarrollados, donde se ha encontrado la pérdida de ciertos filos que en años anteriores se encontraban colonizando nuestro intestino, esto en consecuencia lleva a una pérdida de la biodiversidad^{1,5}.

De los factores más importantes que se han encontrado están: el saneamiento del agua, tipo de parto (aumento de cesáreas), reducción de la lactancia materna,

genes, dieta, uso de antibióticos, el nuevo modelo de familias pequeñas, el estrés, aumento del aseo o la difusión de jabones antibacteriales y se siguen encontrando más^{3,5}. Todos estos factores son poco significativos si los comparamos con el extensivo uso de antibióticos, antiinflamatorios, laxantes, antiácidos, aplicación de radioterapia o quimioterapia, de hecho el consumo de antibióticos, reduce drásticamente las poblaciones dominantes y favorece la aparición de bacterias patógenas oportunistas, como *Clostridium difficile*; la administración por ejemplo, de ciprofloxacino durante 5 días, afectó tanto la diversidad microbiana que incluso algunos géneros no volvieron a aparecer aun después de 6 meses^{3,4}.

La composición de la microbiota en el colon está dominada como ya se dijo por Firmicutes que parecen ser activos en el metabolismo de carbohidratos, mientras que Bacteroidetes muestran más actividad en función de producción y conversión de energía, así como el transporte de aminoácidos y el metabolismo además del metabolismo de carbohidratos. Los polisacáridos complejos son degradados por una comunidad microbiana especializada y los oligosacáridos liberados pueden ser utilizados por otras bacterias comensales, así es como la dieta tiene una gran influencia en la actividad microbiana intestinal⁹.

1.3 Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota juega un papel importante en el organismo, algunas de sus funciones son:

- Estimula el desarrollo y mantiene el recambio epitelial en el intestino

- Modula la respuesta inmunológica proporcionando señales para promover la maduración de las células inmunitarias y el desarrollo normal de sus funciones
- Participa en el metabolismo de algunos medicamentos; desde el punto de vista nutricional participan en la depuración de toxinas y carcinógenos evitando la colonización por bacterias patógenas
- Sintetizan micronutrientes como vitamina K, B12 y ácido fólico¹⁰.
- Ayudan a la fermentación y absorción de sustancias indigeribles
- Ayudan a absorber electrolitos y minerales
- Modulación de la motilidad intestinal
- Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que estimulan el crecimiento y desarrollo de enterocitos y colonocitos¹⁰.
- A nivel metabólico, ayudan a determinar una mayor o menor eficacia en el aprovechamiento de energía proveniente de la fibra dietética transformándola en disponible para el organismo, así se evita su pérdida por las heces, otra función es el control del depósito de energía como tejido adiposo^{1,5}.
- Protección ante litiasis renal por oxalato al metabolizar esta molécula en el intestino¹¹.
- Correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso¹¹.

Es en el yeyuno proximal donde se absorben los hidratos de carbono simples con ayuda de transportadores específicos, después enzimas digestivas como

hidrolasas, transferasas y liasas, hidrolizan poli y disacáridos en monosacáridos que son la unidad más simple de absorción, sin embargo, no son capaces de degradar otros polisacáridos no digeribles como celulosa, xilano y pectina, así que al llegar a la región distal del intestino son metabolizados por las bacterias presentes en esta zona intestinal. Este rescate colónico es considerado tan significativo que se ha discutido la posibilidad de considerar a la fibra soluble de los alimentos con cierto valor energético, atribuyéndole 2 kcal/g^{3,4}.

Al estimular la secreción del péptido YY, se inhibe la motilidad intestinal, se mejora la absorción de nutrientes y también provoca que los AGCC conduzcan a la supresión del apetito. Otra actividad en la que intervienen los AGCC es en la estimulación de receptores de ácidos grasos libres acoplados a proteína G en la mucosa del colon (FFAR2 y FFAR), estos receptores promueven el almacenamiento de energía al aumentar la adipogénesis, inhibición de la lipólisis en las células adiposas y disminución del gasto energético^{4,6}.

La microbiota intestinal también tiene la capacidad de convertir aminoácidos producto de la digestión de proteínas en otros productos de utilidad para el organismo, por ejemplo, la L-histidina, amina biogénica que es capaz de generar histamina por acción de la histidina descarboxilasa que es un producto de fermentación de Lactobacilos probióticos. Lo anterior tiene repercusión a nivel inmunológico, pues esta señal suprime la producción de TNF- α , citoquina proinflamatoria. Otro ejemplo de la intervención de la microbiota en el metabolismo de los aminoácidos es la generación de γ -amino butírico (GABA) a partir de

glutamato a través de la glutamato descarboxilasa y la producción de putrescina desde ornitina; todos estos hallazgos pueden contribuir a conocer estrategias para disminuir enfermedades crónicas y sus complicaciones, pues tienen gran implicación a nivel inflamatorio y de sistema inmune. Se ha visto que la microbiota intestinal también tiene intervención en la integración de proteínas en el sujeto como colágeno, fibrinógeno y fibronectina^{3,4}.

1.4 Microbiota intestinal y diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

Son varios los mecanismos a través de los cuales se puede explicar la relación entre microbiota y metabolismo energético, cuando existe un desequilibrio entre estos dos factores se pueden entonces explicar alteraciones en la acumulación de grasa corporal, resistencia a la insulina, DM2, hígado graso no alcohólico, hipertensión y aterosclerosis (Figura 2). Se cree, por ejemplo, que ciertas especies de Bacteroidetes (*Bifidobacterium Thetaiotaomicron* y *Bifidobacterium Fragilis*) pueden ser responsables de la formación de N-óxido de trimetilamina (TMAO) un compuesto pro-aterogénico que se ha asociado con aumento de enfermedades cardiovasculares, además como es bien conocido, la enfermedad arterial coronaria es factor determinante en el pronóstico del paciente con diabetes, de hecho, la prevalencia de diabetes en estos pacientes es hasta del 50%^{5,12}.

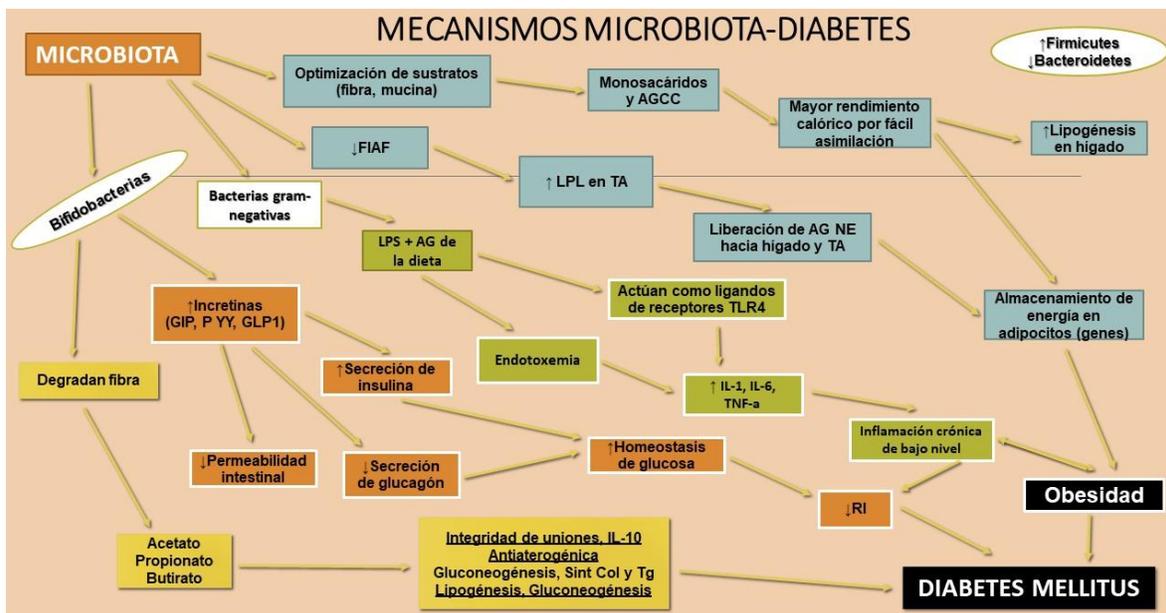


Figura 2. Mecanismos que explican la relación entre microbiota intestinal y DM2

1.4.1 Extracción de nutrientes

Uno de los aspectos más estudiados es la extracción de nutrientes de la dieta y con ello la regulación del balance energético, todo esto se lleva a cabo mediante enzimas que no posee normalmente nuestro intestino, esto hace que se optimice la digestión de los alimentos resultando en un mayor rendimiento calórico, la explicación toma sentido cuando se entiende el papel que juegan estos microorganismos transformando ciertos nutrientes como fibra dietética y mucina en azúcares y ácidos grasos de cadena corta fácilmente asimilables por el intestino, sin esta función de la microbiota, la fibra y mucina se eliminarían por las heces^{4,5}.

En ratones se ha observado que, aquellos que carecen de microbiota intestinal requieren un 30% más de alimento que los ratones convencionales (con presencia

de bacterias intestinales) para crecer al mismo ritmo, así mismo se ha visto que tienen menos grasa corporal que los ratones normales, este mismo efecto se ha comprobado en humanos; a nivel experimental se ha demostrado que el trasplante de microbiota intestinal de ratones genéticamente obesos a ratones axénicos provoca incremento de peso significativo comparado con ratones carentes de microbiota que se trasplantaba con bacterias de ratones con peso normal ^{5,6}.

En cuanto a la composición de la microbiota, se ha encontrado que existe mayor proporción de Firmicutes en ratones obesos, al mismo tiempo se observa una disminución del filo Bacteroidetes, este cambio en la proporción Firmicutes/Bacteroidetes, se cree que es el responsable del aumento en la capacidad de digerir polisacáridos indigeribles ya mencionados. En humanos se ha visto que después de la pérdida de peso se presenta un aumento en de cantidades de Bacteroidetes (3%-15%) y una disminución de la abundancia de Firmicutes, correlacionándose estos cambios con el porcentaje de pérdida de peso, pero no con los cambios en el contenido calórico de la dieta. Los Bacteroidetes poseen menos genes para las enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono que los Firmicutes. En pacientes con diabetes se ha encontrado disminución de bacterias productoras de butirato^{1,4}.

Además de la importante extracción de nutrientes también se ha visto que mejora la capacidad de almacenamiento de energía en los adipocitos al cambiar la expresión de ciertos genes implicados en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, por ejemplo, mejora la expresión de transportadores de monosacáridos

que a su vez activan enzimas en los colonocitos que mejoran la absorción de estos macronutrientes, que finalmente son utilizados por el hígado para sintetizar nuevos lípidos^{4,5}.

Por otro lado, la microbiota puede disminuir la producción del factor adipocitario inducido por el ayuno (Fiaf) también conocido como proteína 4 similar a la angiopoyetina, este juega un papel importante en el metabolismo de triglicéridos, pues inhibe la producción de lipasas lipoproteicas en el tejido adiposo y modula la oxidación de ácidos grasos tanto en adipocitos como en el músculo esquelético, estas enzimas favorecen la liberación de ácidos grasos no esterificados hacia los tejidos como el hígado y las células adiposas^{2,4}. Con todo lo anterior se puede ver que la microbiota puede modular ambos lados de la ecuación del balance energético, recolección de energía de la dieta, almacenamiento de energía como triglicéridos y gasto de energía a través de la oxidación de ácidos grasos (AG)⁶.

1.4.2 Inducción de inmunidad e inflamación

Otro aspecto que explica esta relación es la inflamación, la microbiota tiene también la función de regular la inmunidad innata y adaptativa e interviene en respuestas tanto locales como sistémicas, esto hace pensar que también influye en la inflamación crónica presente en obesidad y resistencia a la insulina. Como es ya conocido, la DM2 se relaciona a un estado proinflamatorio con exceso en la producción de citoquinas como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las cuales hacen más difícil la interacción de la

insulina con su receptor contribuyendo así a la resistencia a la insulina y a su consecuente DM2^{1,5}.

Los receptores tipo Toll (TLRs) son importantes mediadores de la inflamación y la inmunidad, están presentes en la mayoría de las superficies celulares de pacientes con obesidad, diabetes y síndrome metabólico, también se ha visto que ratones deficientes del receptor tipo Toll 5 (TLR5) que reconocen a la proteína flagelina, proteína estructural de los flagelos presentes en muchas bacterias. Estos ratones muestran hiperfagia, obesidad, y otras entidades del síndrome metabólico; en otro estudio en ratones se vio que los que tenían deficiencia de receptor TLR2, el cual reconoce peptidoglicanos presentes en la pared de las bacterias, desarrollaron obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, así también su microbiota estaba en niveles aumentados de Firmicutes y Actinobacterias y disminuida en *Bifidobacterium*, al administrar antibiótico y eliminar muchos Firmicutes, mejoró la acción de la insulina y la tolerancia a la glucosa, pero los niveles también bajos de *Bifidobacterium* aumentaron la permeabilidad intestinal, esto llevó a una producción mayor de lipopolisacárido (LPS) sérico^{2,4}.

Se ha demostrado que el LPS presente en la membrana celular de bacterias gram-negativas, así como los AG de la dieta, actúan como ligandos de receptores como el CD14/TLR4 presente en los macrófagos y se produce un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias que se ha visto que están relacionadas con enfermedades metabólicas, este efecto es tan claro que en ratones a quienes

se les administra una dieta alta en grasas se ha observado un aumento en los niveles séricos de LPS^{1,6}.

Los LPS se absorben por el enterocito y son transportados unidos a quilomicrones, lo cual provoca endotoxemia y a su vez inflamación causando aumento de peso, resistencia a la insulina y diabetes, de hecho, la sola administración de LPS afecta los niveles de glucosa sanguínea^{4,5}. Contrario a lo mencionado, se ha visto que al administrar antibiótico (ampicilina y norfloxacin) introducidos en su agua para beber eliminó casi por completo la población bacteriana intestinal, esto normalizó la glucemia en ayunas y la tolerancia oral a la glucosa, a pesar de que persistía la obesidad, también se vio una reducción de los niveles séricos de LPS y de la inflamación de bajo grado. La disminución de los niveles de LPS podría dar la pauta de una estrategia para controlar procesos inflamatorios asociados a enfermedades metabólicas^{2,4}.

Así pues, se ha visto que puede trasplantarse microbiota intestinal de ratones obesos a ratones libres de gérmenes, donde los resultados consisten en mayor adiposidad. La composición de la microbiota en ratones obesos muestra mayor cantidad de Firmicutes en un 50%, mientras que los Bacteroidetes disminuyen correlativamente, esto mismo es observado en humanos y no está clara la proporción de bacterias que es responsable del desarrollo de patologías metabólicas, lo que sí es un hecho es que los sujetos obesos y con diabetes muestran una disminución significativa en la riqueza y diversidad bacteriana en comparación con los sujetos normopeso y sin diabetes; esta biodiversidad

disminuida va acompañada de mayor adiposidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e inflamación comparado con sujetos con alta biodiversidad. Proporciones elevadas de Firmicutes y disminuidas de Bacteroidetes se relacionan con un incremento de 150 kcal de almacenamiento energético^{3,12}.

Otro resultado de la modificación de la microbiota intestinal (aumento del rango Firmicutes/Bacteroidetes) en el colon, así como el incremento de bacterias oportunistas y producción de endotoxinas, es la alteración en la permeabilidad intestinal consistente en cambios de mucus intestinal y capa de glicocálix, todo esto principalmente por acción de bacterias como *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, *Akkermansia muciniphila* y *Escherichia coli*⁶.

1.4.3 Endócrino

Un tercer mecanismo es la vía endócrina, medio por el cual el intestino se comunica con el hipotálamo, se ha mostrado que al aumentar *Bifidobacterium spp*, se modula la inflamación en ratones obesos, todo esto es por el incremento en la producción de ciertas incretinas y reducción de la permeabilidad intestinal. Las incretinas (intestinal secretion of insulin), son producidas por las células enteroendócrinas que se encuentran desde el estómago hasta el colon distal, tienen el efecto de potenciar la secreción de insulina cuando aumenta la glucemia, siendo responsables de aproximadamente el 70% de la insulina postprandial, dentro de las más importantes se encuentran el péptido inhibitorio (GIP), péptido YY y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1), este último ayuda a modular señales que suprimen la secreción de

glucagón; en general todas estas moléculas inducen la secreción de insulina dependiente de glucosa, lo que conduce a su homeostasis y consecuentemente a la disminución de la resistencia a la insulina incrementando la funcionalidad de la célula beta^{1,5}.

1.4.4 Producción de ácidos grasos

Otro mecanismo que se ha observado como posible responsable de resistencia a la insulina es la modificación en la producción ácidos grasos de cadena corta y son las Bifidobacterias (Actinobacterias) las que degradan glicoconjugados (glicanos) y glicosaminoglicanos (celulosa, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, mucinas y heparina), todos estos sustratos, una vez fermentados por la microbiota, liberan AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato, en una proporción aproximada de 60-20-20, que está en función del tipo de fibra que se está metabolizando; se cree que entre 7 y 10% del aporte calórico diario resulta de este proceso^{1,4}.

Una vez absorbidos en el intestino, aportan energía a las células epiteliales del colon sobre todo el butirato, que además promueve la integridad de las uniones estrechas del epitelio intestinal y aumenta la liberación de la citoquina interleucina 10 (IL-10) antiinflamatoria y antiaterogénica. Por otro lado, el acetato y el propionato se dirigen al sistema venoso portal; estudios con animales sugieren que el propionato afecta a la lipogénesis hepática y la gluconeogénesis, mientras que al acetato lo proponen como sustrato para la síntesis de colesterol y triglicéridos y como sustrato para la gluconeogénesis. En modelo experimental se ha visto que el butirato afecta los

niveles de serotonina, que además de ser un neurotransmisor en el intestino, está involucrada en la regulación de la ingesta de alimentos al controlar la saciedad y regular el peso corporal, así pues, su reducción está asociada con obesidad^{1,12}.

1.4.5 Transformación de ácidos biliares

Los Firmicutes son el tipo de bacterias responsable de transformar el 5% aproximado de ácidos biliares primarios conjugados que llegan al intestino grueso en secundarios, y se ha visto que en pacientes obesos y con diabetes existe un menor número de ácidos biliares secundarios en comparación con sujetos sanos, lo cual hace pensar que estos ácidos pueden tener un rol en la sensibilidad a la insulina. Tanto en el tejido adiposo marrón como en el músculo, se incrementa la actividad mitocondrial y la fosforilación, esto hace que aumente la sensibilidad a la insulina en modelos experimentales; a nivel de intestino, podría mejorar el metabolismo de la glucosa, aumentando la producción de GLP-1 que como se sabe aumenta la secreción de insulina^{1,4}.

La microbiota intestinal también tiene cierta función en la bioconversión del colesterol en ácidos biliares que son necesarios para la excreción y absorción del colesterol, se ha observado en pacientes coronarios y con diabetes, niveles significativamente más altos de *Streptococcus* en comparación con los pacientes coronarios no diabéticos, esto se correlaciona negativamente con los niveles de colesterol HDL y podría afectar desfavorablemente su pronóstico a través de la regulación del metabolismo de los lípidos¹².

1.4.6 Otros aspectos.

Se ha encontrado también que filos como Firmicutes, Actinobacterias y Proteobacterias pueden degradar algunas vitaminas como son niacina y la colina, que finalmente, repercutirán en el estrés oxidativo que como se sabe, favorece el desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes¹.

El uso de ciertos fármacos, en especial antibióticos, se ha asociado con cambios en la composición de la microbiota, estos cambios podrían repercutir en la acumulación de grasa y resistencia a la insulina; la metformina se ha encontrado también como modificador de la microbiota^{1,6}.

Cambios en la dieta también podrían explicar la modificación en el perfil microbiano que al final afectará a nivel metabólico, se ha visto que el llevar una dieta mediterránea o una dieta hipocalórica, baja en grasa o hidratos de carbono produce un aumento en la cantidad de Bacteroidetes y una disminución de Firmicutes. Así mismo el consumo tanto de probióticos como de prebióticos, especialmente Bifidobacterias, Lactobacillus, oligofructosa, polifenoles del vino tinto y suplementos nutricionales enriquecidos con cepas de bacterias vivas, han modificado la microbiota intestinal, disminuyendo la endotoxemia y mejorando el metabolismo de hidratos de carbono en diferentes grupos de edad^{1,12}.

El consumo de edulcorantes artificiales no calóricos (EANC) han mostrado en ratones una marcada intolerancia a la glucosa asociada a la alteración de la microbiota intestinal, pues se ha visto que afecta la diversidad de bacterias, otro de

los efectos que provoca al cambiar la microbiota es alterar las vías metabólicas para la degradación de glicanos fermentados a través de AGCC^{1,3}.

La microbiota intestinal puede repercutir en el paciente con diabetes más allá de su peso corporal, pues se han visto implicaciones de esta en las complicaciones que la enfermedad conlleva, por ejemplo, una de las más comunes son los episodios de diarrea acuosa y se ha comprobado que el sobrecrecimiento bacteriano por reducción de la motilidad gastrointestinal relacionada con la neuropatía diabética, es la causa de esta complicación y que el tratamiento antibiótico mejora los síntomas clínicos; otro ejemplo es la periodontitis, infección provocada por bacterias gramnegativas que se fijan en el borde gingival del tejido del hospedador².

1.5 Diabetes Mellitus tipo 2

En los últimos tiempos, se ha notado gran cambio en algunos patrones de comportamiento, principalmente en lo que a alimentación se refiere. El desarrollo de la sociedad actual ha llevado a un aumento en la disponibilidad de alimentos de alta densidad calórica, con abandono casi total de la dieta tradicional y se ha registrado un predominio en el consumo de alimentos procesados y ultraprocesados, consumo de aceites vegetales en exceso, así como de grasas saturadas y ácidos grasos trans, también resulta alto el consumo de alimentos ricos en sodio e hidratos de carbono simples¹³. Todo esto aunado a un comportamiento cada vez más sedentario en el ámbito cotidiano, laboral y recreativo, han llevado a una transición alimentaria, que finalmente desemboca en malnutrición principalmente por exceso.

El sobrepeso y la obesidad están relacionadas directamente al desarrollo de enfermedades crónicas como DM2, enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer que son de las principales causas de muerte en nuestro país^{3,13}.

1.5.1 Definición de DM2

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) define a la diabetes mellitus como “grupo de enfermedades metabólicas” caracterizadas por hiperglucemia en ayunas y posprandial, que resulta de defectos en la secreción de insulina, acción de esta o ambos; esta hiperglucemia crónica se asocia con varias complicaciones y finalmente, con disfunción^{14,15}. Otra característica es la alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas causados por insuficiencia total o parcial de la secreción y/o acción de la insulina¹⁶.

Hay dos formas principales de diabetes, diabetes mellitus insulino dependiente (diabetes mellitus tipo 1, DM1) y diabetes mellitus no insulino dependiente (diabetes mellitus tipo 2, DM2)¹⁶.

La DM2 es la forma más común de DM, que representa del 90 al 95% de todos los pacientes diabéticos, en esta, predomina la pérdida progresiva de la secreción de insulina bajo un fondo de resistencia a la insulina (RI)^{15,16}.

La DM2, es una patología concomitante con la obesidad, esta, en conjunto con el síndrome metabólico, son los principales problemas de salud pública a nivel mundial, y esto es debido a la carga que implica para los servicios de salud, pues se ha encontrado que es de 2 a 3 veces mayor el costo de atención en pacientes

diabéticos que en los no diabéticos, otra implicación que tiene a nivel de salud pública es que es un fuerte factor de riesgo cardiovascular^{3,17}. La DM2 se considera una epidemia en la mayoría de los países, sobre todo en los de ingresos medianos y bajos, se considera una de las enfermedades no transmisibles de mayor prevalencia, responsable de múltiples complicaciones a corto y largo plazo, estas incluyen enfermedades macrovasculares (hipertensión, hiperlipidemia, ataques cardíacos, arteriopatía coronaria, accidentes cerebrovasculares, enfermedad vascular cerebral y enfermedad vascular periférica), microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y algunos tipos de cáncer, así también se considera de las principales causas de discapacidad^{3,16,17}.

1.5.2 Prevalencia de DM2

La prevalencia mundial en adultos ha aumentado del 4.7% en 1980 al 8.5% en 2014, se estima que en 2015 fue la causa directa de 1.6 millones de muertes y según proyecciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud), la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 con una estimación de población de 438 millones de diabéticos. Se estima que en el año 2000 había 171 millones de diabéticos y que en el 2030 habrá 366 millones en el mundo^{18,19}.

En México, a partir del 2000, la diabetes es la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres, solo después de la cardiopatía isquémica, patología que al final también es resultado de la diabetes²⁰. El estado que supera el promedio nacional de muertes casi en 30 puntos es la Ciudad de México con tasas de 93.81

en 2005 y de 100.78 en 2009 por cada 100 000 habitantes, seguida de Coahuila (86.59 en 2005 y 88.44 en 2009)²¹

Se ha visto un aumento en la prevalencia de la diabetes, que va de 4.6% en la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC 1993) a 7.3% en 2006 en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT); ya para la ENSANUT del 2012 los resultados indicaron una prevalencia de 9.2% y por último la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio camino 2016, mostró un ligero aumento encontrándose en 9.4% de los adultos de 20 años y más, estos datos son de casos con previo diagnóstico médico sin tomar en cuenta los hallazgos hechos durante la encuesta. Dichos cambios pueden deberse tanto al cambio en la edad de la población como también a la creciente prevalencia de la obesidad^{22,23}.

Se observa mayor prevalencia de la enfermedad en las zonas urbanas, en la región centro-occidente de la República, así como también significativamente mayor en población con antecedentes familiares, obesidad, enfermedades crónicas concurrentes (hipertensión arterial, hipercolesterolemia, microalbuminuria y enfermedad renal)²⁴.

El costo económico que implica la enfermedad es alto, pues se ha encontrado que los gastos directos ascienden a \$133 143 734 correspondiente a medicamentos, seguido de \$110 410 928 por atención de complicaciones, \$59 734 448 gastos por consulta/diagnóstico y \$39 937 331 por hospitalización. Los gastos indirectos, implican principalmente discapacidad permanente con un gasto de \$409 205 846,

seguida de mortalidad prematura (\$19 623 029) y discapacidad temporal (\$6 372 059). Aunque la mayoría de los gastos tanto directos como indirectos los absorbe el mismo usuario, también las instituciones públicas destinan gran parte de su presupuesto a la atención de la enfermedad²⁵.

1.5.3 Fisiopatología de la DM2

La etiología de la DM2 es un proceso multifactorial complejo, sin embargo, se puede deber a alteraciones progresivas en la sensibilidad a la insulina y un fallo correspondiente de los islotes pancreáticos para mantener la producción de insulina adecuada para compensar la disminución de dicha sensibilidad^{15,26}.

La RI se manifiesta principalmente a nivel del músculo esquelético, hígado y tejido adiposo, y se caracteriza por la eliminación de glucosa estimulada por insulina, la incapacidad para suprimir la producción de glucosa hepática y la lipólisis e inflamación elevadas del tejido adiposo^{14,15}.

La inducción de RI se atribuye en gran medida a la acumulación de lípidos ectópicos en los tejidos sensibles a la insulina, este depósito causado por acumulación intracelular inducida por la obesidad y el consiguiente tráfico de intermedios de señalización de lípidos (ceramidas y diacilgliceroles), contribuye a la activación deteriorada de la cascada de señalización de insulina celular y, por lo tanto, afecta los procesos mediados por insulina^{15,27}.

Dado que el músculo esquelético es el principal órgano responsable de la eliminación de glucosa posprandial, la RI restringe severamente la capacidad de eliminación de glucosa en pacientes con DM2^{15,27}. A nivel celular, la RI muscular se expresa por el reclutamiento de proteínas transportadoras de glucosa GLUT4 mediado por la insulina a la membrana plasmática, la capacidad atenuada para el almacenamiento de glucógeno, reducción de la oxidación de la glucosa y por alteración de la función mitocondrial¹⁵.

En el hígado, la RI se asocia con tasas excesivas de producción de glucosa hepática durante el ayuno, atribuido en parte, a la supresión fallida de la gluconeogénesis mediada por insulina, también se asocia con la incapacidad de suprimir la producción de glucosa hepática en el estado posprandial por alteración tanto en gluconeogénesis como en glucogenólisis^{15,26,27}.

Y finalmente en el tejido adiposo, la RI se caracteriza por un transporte defectuoso de glucosa mediada por insulina, capacidad disminuida para la captación de lípidos y una incapacidad para suprimir lipólisis lo cual lleva a un aumento de los niveles de ácidos grasos libres en plasma y por último producción excesiva de citoquinas (IL-6, TNF- α , etc.) que causan inflamación^{26,27}.

La falla del islote pancreático es una patología característica de la DM2 y, junto con la RI, es necesaria para el establecimiento de la hiperglucemia. La primera manifestación de la falla del islote es la pérdida (activación inapropiada) de la secreción de insulina estimulada por glucosa y la supresión alterada de la liberación

de glucagón¹⁵. La pérdida de la secreción de insulina, se atribuye a la inducción de la disfunción secretora de las células β y la disminución de su número (masa de las células), esta disminución, se ha atribuido al aumento de la apoptosis y al desarrollo de la desdiferenciación y está asociada a estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico por toxicidad asociada a hiperglucemia o hiperlipidemia entre otros. Por otro lado, la alteración en la liberación de glucagón se puede deber a un aumento en el número de células α y alteración en su función^{15,26,27}.

Como la mayoría de las enfermedades crónicas, la DM2 resulta de la interacción de factores tanto genéticos como ambientales, así también se ha visto que influyen aspectos culturales y sociales; por lo anterior se puede decir que su aparición solo es posible cuando el individuo tiene un estilo de vida propicio^{4,5}. Se ha observado que la prevalencia de diabetes es mayor en sujetos con sobrepeso y obesidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001), casi el 90% de los pacientes obesos desarrollan DM2, principalmente debido al exceso de peso corporal, pero son muchos más los factores asociados a su aparición, como la baja actividad física, la dieta, en especial cuando esta es baja en fibra y con un alto índice glucémico o alta en grasas saturadas, la escolaridad, el nivel socioeconómico, niveles alterados de lípidos en sangre, hipertensión arterial, tabaquismo, consumo de alcohol y síndrome metabólico, la apnea obstructiva del sueño (AOS) (Figura 3)^{5,16}.

También se ha visto que existen locus de susceptibilidad que influyen a diferentes niveles y alteran así el metabolismo de la glucosa, algunos actúan como factores de

transcripción, proteínas de unión a hormonas, acción de la insulina, etc.¹⁶. Otro hallazgo es que vitaminas como la D y K, pueden tener un papel potencial en el control de la DM2, se ha visto que la deficiencia de vitamina D puede tener efectos negativos sobre la tolerancia a la glucosa, secreción de insulina y la DM2, La vitamina K, proporciona beneficios en la homeostasis de la glucosa, ya que mayor ingesta de esta se correlaciona con una mayor sensibilidad a la insulina y un mejor estado glucémico¹⁶.

Recientemente, han surgido investigaciones que unen de manera causal la microbiota intestinal con el desarrollo de obesidad y DM2, planteando que esta puede contribuir en la regulación de la homeostasis energética, así pues, los microorganismos residentes del intestino se han identificado como uno de los factores ambientales que influyen en la aparición de afectaciones a nivel metabólico en el huésped^{3,16}.

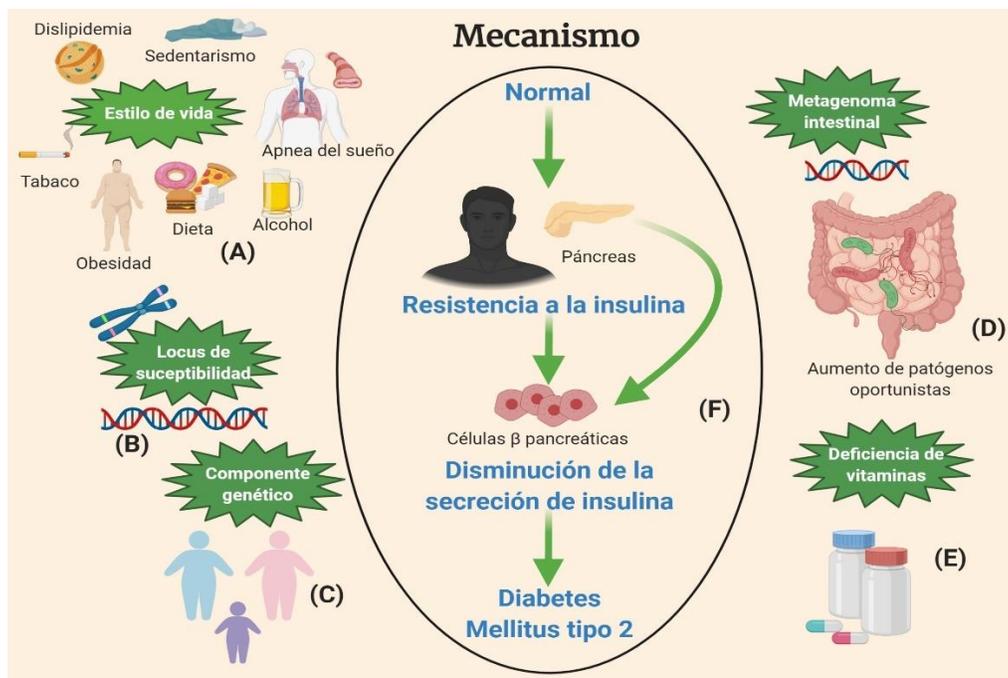


Figura 3. Factores que influyen en el desarrollo de DM2 y mecanismo fisiopatológico. (A) Estilo de vida; (B) Locus de susceptibilidad; (C) Componente hereditario; (D) Metagenoma intestinal; (E) Vitaminas; (F) Mecanismo de DM2. Fuente Yanling *et al*, 2014.

1.6 Mecanismos para modular la microbiota intestinal

Como ya se mencionó, existen diversos factores que pueden alterar la composición de la microbiota intestinal, estos factores van desde los genéticos del huésped, hasta la edad o la dieta, el método de nacimiento, etc. La disbiosis se ha visto asociada con varias enfermedades intestinales, obesidad, diabetes, alergias, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, hipertensión, etc. y la modulación de su composición y diversidad se han considerado en los últimos tiempos como un tratamiento prometedor para este tipo de enfermedades²⁸.

Se han estudiado varias formas de modular la microbiota intestinal, dentro de las más estudiadas se encuentran el uso de antibióticos, probióticos, prebióticos e incluso el trasplante de microbiota fecal (TMF); todas estas técnicas se ha visto que pueden afectar de manera favorable ya sea la estructura y la función de la microbiota y así mismo restaurarla de manera temporal o permanente, esto las convierte en una opción de tratamiento alternativo adecuado para enfermedades que están relacionadas con disbiosis.²⁸

El mantenimiento de la homeostasis de microbiota intestinal es muy importante, así que la manipulación de su composición y diversidad son elementos importantes para controlar el desarrollo de enfermedades ya sea como alternativa de prevención o de tratamiento adyuvante.²⁸

1.6.1 Antibióticos

El uso de antimicrobianos es uno de los factores que alteran el equilibrio ecológico entre el huésped y sus microorganismos. Se les ha considerado un arma de 2 filos, ya que, por un lado, destruyen los organismos patógenos, pero también afecta a los benéficos, esto hace que exista una pérdida de la microbiota intestinal llamada disbiosis y con ello el crecimiento de organismos no deseados.²⁸

En ratones se ha visto que su administración afecta el metabolismo secundario de los ácidos biliares y la serotonina en el colon que provoca al final retraso en la motilidad intestinal al agotarse la microbiota; también se ha visto que interrumpen el mecanismo de exclusión competitiva usada para eliminar patógenos, promoviendo

el crecimiento de microorganismos como *C. difficile*. Algunos antibióticos como la clindamicina pueden causar cambios tan a largo plazo que incluso después de dos años puede no volverse a recuperar del todo la diversidad de Bacteroides, otros como la claritromicina disminuyen Actinobacterias, el ciprofloxacino por su parte, reduce *Ruminococcus* y la vancomicina, fármaco dirigido a bacterias gram-positivas, a pesar de ser el mejor tratamiento para la infección por *C. difficile* causa tales cambios que pueden llevar a infecciones recurrentes por esta bacteria u otros patógenos como *E. coli*, también se ha asociado este antibiótico con agotamiento de la mayoría de bacterias en el intestino como Bacteroidetes, *Fuminococcus* y *Faecalibacterium* y aumento de Proteobacterias^{28,29}.

Los antibióticos actúan sobre la microbiota intestinal disminuyendo su densidad y modificando su composición de forma duradera, esto a su vez altera la señalización a la mucosa intestinal y órganos periféricos reduciéndola, lo que al final causa funcionamiento deficiente del sistema inmune.²⁹

Recordemos también que la microbiota confiere protección contra patógenos, esto se ha denominado resistencia a la colonización y puede verse sumamente afectado después de un tratamiento con antibióticos, otro mediador importante de la colonización es la producción de moco y algunos antibióticos como el metronidazol pueden reducir el grosor de la capa interna de moco del intestino grueso.^{28,29}

Los antibióticos alteran el equilibrio entre las comunidades comensales y llevan a una comunicación disminuida entre la microbiota intestinal y la mucosa subyacente, esto suele ser de carácter duradero y tiene consecuencias como mayor

susceptibilidad a infecciones, desarrollo de alergias, predisposición a síndrome metabólico, disminución de eficacia a terapias farmacológicas e inducción y propagación de resistencia a antibióticos.^{28,29}

Después del inicio de un tratamiento con antibióticos, se ve un aumento de bacterias resistentes, esto se debe a que una bacteria antes susceptible se convierte en bacteria resistente, después aumentan en número debido a su capacidad para sobrevivir a la presión selectiva proporcionada por el antibiótico, la resistencia puede ser dada por transferencia horizontal de genes o bien por mutaciones, otro efecto es la disminución temporal de la diversidad, sin embargo, algunas bacterias pueden estar protegidas de la exposición en la capa de mucina o en las ranuras entre las vellosidades formadas por las células epiteliales del huésped que recubren el canal intestinal (Figura 4).³⁰

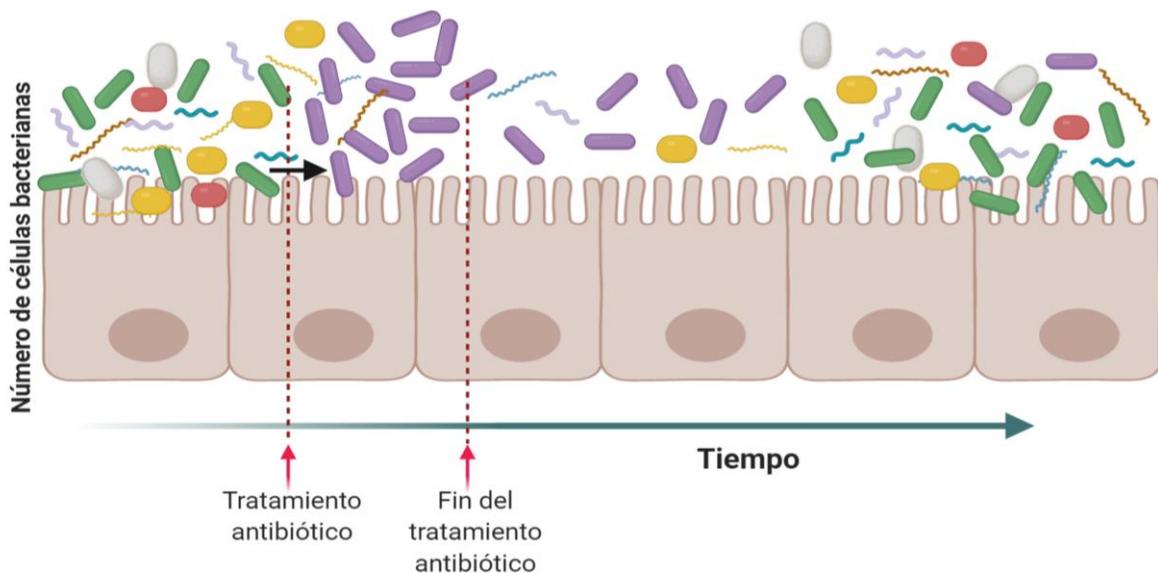


Figura 4. Influencia de los antibióticos sobre la diversidad microbiana intestinal, se observa cómo hay una disminución temporal de la diversidad, aún mucho tiempo después de terminado el tratamiento. Fuente: **Jernberg C, et al. (2010).**³⁰

El nivel de influencia de los antibióticos en la microbiota intestinal depende de varios factores: el espectro del agente, dosis, duración del tratamiento, vía de administración y propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Otros efectos que traen consigo el uso de antibióticos es alteración del metabolismo y absorción de vitaminas, alteración de la susceptibilidad a infecciones y crecimiento excesivo de levaduras y *Clostridium difficile*.³⁰

La diferencia en estructura entre bacterias y células superiores hacen que los antibióticos tengan afinidad por las primeras, esto disminuye el riesgo de efectos adversos. Valorando las principales diferencias entre ambos tipos de células, sabemos que en las bacterias existe un único cromosoma, no rodeado de membrana nuclear y que está en contacto directo con el citoplasma, esto hace que esté accesible a los antibióticos que actúan sobre síntesis de ADN, además de esto, cuentan con presencia de ribosomas del tipo 70S y cuentan con una pared celular de peptidoglicano, esta estructura confiere rigidez y forma a la bacteria.³¹

Las bacterias gram-negativas tiene mayor resistencia que las gram-positivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana celular externa que rodea la capa de peptidoglucano, esta capa contiene LPS y tiene un papel importante de barrera, esta capa también contiene proteínas (40% de su peso total) como las porinas, proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos que permiten el acceso al peptidoglucano. Los antibióticos más lipófilos difunden a través de la bicapa lipídica y algunos utilizan un mecanismo de transporte con gasto de energía. Una vez en el interior del microorganismo, los antimicrobianos

deben evitar su hidrolisis o su transformación en un producto inactivo y reconocer de forma efectiva una diana antes de que algún sistema de expulsión lo lance fuera de la bacteria.³¹

A nivel molecular, los antimicrobianos tienen su acción en diferentes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos.³¹

Se pueden clasificar en bactericidas (ejercen una acción letal) o bacteriostáticos (inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano), un mismo antibiótico puede comportarse como ambos dependiendo de la concentración alcanzada en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo; generalmente los que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con aspectos del metabolismo del ADN son bactericidas; y los que inhiben la síntesis proteica excepto los aminoglucósidos, son bacteriostáticos.³¹

Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan que la bacteria se encuentre en crecimiento activo, y para su acción bactericida requiere que el medio en que se encuentre sea isotónico o hipotónico, lo que hará que finalmente la bacteria estalle cuando la pared celular se pierda o se desestructure.³¹

La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas y en cada una de estas pueden actuar los antibióticos: etapa citoplásmica (síntesis de precursores de

peptidoglucano), transporte a través de la membrana citoplásmica y la organización final de la estructura del peptidoglucano.³¹

La vancomicina, es un glucopéptido tricíclico, inhibe la síntesis de los fosfolípidos de la pared celular bacteriana, así como la polimerización de los peptidoglucanos, impide la transferencia del disacárido pentapéptido, unido al transportador lipídico de la membrana citoplásmica, al aceptor de la pared celular. Esto se debe a que estos compuestos recubren el extremo D-alanin-D-alanina del disacárido-pentapéptido, evitando la acción de las glucosiltransferasas y transpeptidasas, y con esto evitan la elongación del peptidoglucano. Debido al gran tamaño de estas moléculas no pueden pasar a través de la pared de las bacterias gram negativas, así que solo resultan activas frente a gram positivos (y cepas multirresistentes); son bactericidas frente a *Staphylococcus* spp., y bacteriostáticas frente a *Enterococcus* spp.^{31,32} Ha adquirido importancia médica por su efectividad contra organismos multirresistentes como el Estafilococo resistente a la meticiclina, también se usa para tratar colitis asociada a antibióticos causadas por *Clostridium difficile* o *Estafilococos*.³²

El genoma bacteriano codifica para síntesis de proteínas y esta información se transmite a través del ARNm (Ácido ribonucleico mensajero) producido a partir del molde de ADN (transcripción), y finalmente para la síntesis de ARNr (Ácido ribonucleico ribosómico) que formara parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide para

poder transmitir esta información a la descendencia, esto ocurre en varias fases con ayuda de enzimas y sustratos que es donde actúan algunos antibióticos.³¹

Aquí encontramos a las quinolonas, que actúan en este tipo de enzimas, generalmente estos antibióticos no son selectivos en su acción y pueden llevar a cierta toxicidad para las células eucariontes, la mayoría suelen ser bactericidas rápidos e independientes del inoculo y de la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria. Las fluoroquinolonas, inhiben especialmente la replicación del ADN bacteriano e interfieren con la acción de la ADN girasa (topoisomerasa II) durante el crecimiento y la reproducción bacteriana. La unión de la quinolona a la enzima y al ADN forma un complejo en triada que inhibe el paso de reincorporación, lo que puede causar muerte celular al inducir la escisión del ADN.^{31,33}

El cromosoma bacteriano está constituido por una doble cadena de ADN que es 1.000 veces más largo que la propia bacteria, por lo que se encuentra muy plegado sobre sí mismo en una forma superenrollada. Esta configuración no es accesible para que pueda realizarse la replicación y transcripción del ADN bacteriano, por lo que debe desenrollarse. Las topoisomerasas son las enzimas encargadas del superenrollamiento y desenrollamiento del ADN, así como del corte, unión y separación de las hebras de ADN, necesarias para los procesos de síntesis de ADN. Las quinolonas ejercen su acción bloqueando las topoisomerasas II (ADN-girasa) y IV, estas, se acoplan al ADN, provocan un pequeño corte en las hebras de ADN que después es reparado, y quedan de nuevo libres. Las fluoroquinolonas, se unen al ADN roto y a la topoisomerasa formando un complejo ternario quinolona-ADN-

topoisomerasa de forma irreversible, impidiendo que el proceso de transcripción o replicación continúen.³¹

Las quinolonas son los antibióticos de mayor uso, los hay de generaciones dependiendo de su espectro de actividad y propiedades farmacocinéticas. El ciprofloxacino pertenece a los de tercera generación y tiene mejor actividad frente a grampositivos (*S. aureus*), gramnegativos (*Gonococo*, *Meningococo*, *H. influenzae*, *H. ducreyi*, *M. catarrhalis* y organismos fastidiosos, por sus propiedades farmacocinéticas permiten su empleo sistémico, también actúa sobre Enterobacteriasceas gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa*. Este es bactericida contra *E. coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Enterobacter sp*, *Campylobacter sp* y *Neisseria sp*. Su mecanismo de acción también incluye la desintegración de la membrana celular.^{31,33}

Los nitroimidazoles, por ejemplo, el metronidazol, altera el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos, penetran en el citoplasma con facilidad por difusión pasiva y ahí el grupo NO₂ del anillo imidazólico, que se comporta como aceptor de electrones, se reduce por nitroreductasas bacterianas del metabolismo anaerobio, liberándose radicales nitritos que dañan el ADN por oxidación. Tienen actividad frente a *Clostridium spp.*, microorganismos gramnegativos anaerobios y microorganismos microaerófilos (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Gardnerella vaginalis*) y protozoos (*tricomonas*, *giardias*, *amebas*, *Balantidium coli*).³¹

1.6.2 Probióticos

La Palabra “Probiótico” proviene del griego y significa “para la vida”, son muchas las definiciones que se han dado a lo largo de los años, pero de forma general se consideran como una preparación o producto que contiene microorganismos definidos, viables, inocuos y en cantidades suficientes, que modulan la microbiota en el huésped y ejercen efectos benéficos en su salud a través del tubo intestinal, fueron descritos por primera vez por Metchinkoff en 1908, pero los efectos benéficos de estos, se conocen desde tiempos antiguos, los romanos y griegos ya usaban diversas recetas de leche fermentada^{5,34}.

Para seleccionar una cepa probiótica, la OMS, FAO y EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) sugieren que se deben tomar en cuenta dos principales criterios: seguridad y funcionalidad.

La seguridad se define por su origen, por la ausencia de asociación con cultivos patógenos y el perfil de resistencia a antibióticos; la funcionalidad está definida por su supervivencia en el tracto gastrointestinal (resistencia a la sales biliares y enzimas, al pH bajo del estómago), competitividad con respecto a la microbiota que habita en el ecosistema intestinal y su efecto inmunomodulador; en cuanto al aspecto tecnológico se sugiere que sea capaz de sobrevivir y mantener sus propiedades tanto en su proceso de almacenamiento como de distribución^{34,35}.

Los productos probióticos pueden contener una o más cepas microbianas, la mayoría pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*,

Streptococcus, *Enterococcus*; de cepas gram-positivas los géneros que más se utilizan son Bacilo y algunas cepas de levaduras como *Sacharomyces*^{34,36,37}.

Su uso se ha visto ampliamente utilizado en patologías principalmente gastrointestinales como: diarrea aguda, intolerancia a la lactosa, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, constipación, etc. También se ha visto que tiene efectos inmunomoduladores y alergias, candidiasis, caries dental, son productores naturales de vitaminas del grupo B, mejoran la absorción de vitaminas y minerales, estimulan la generación de ácidos orgánicos y aminoácidos; otra función que se ha encontrado es que son capaces de producir enzimas como esterasa, lipasa y coenzimas; algunos productos de su metabolismo también pueden mostrar actividad antibiótica (acidofilina, bacitracina, lactacin), anticancerígena y propiedades inmunosupresoras^{5,36,37}.

Los probióticos tienen varias ventajas, la principal es que tiene efecto sobre el desarrollo de la microbiota que habita en el organismo, lo cual asegura un equilibrio entre bacterias patógenas y las benéficas, también reestablece la microbiota natural después de la terapia con antibióticos y contrarresta la actividad de la microbiota intestinal patógena que se introduce por alimentos contaminados o del medio ambiente. Así pues, los probióticos pueden impedir el desarrollo de bacterias patógenas como: *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, varias especies de *Shigella*, *Staphylococcus* y *Yersinia*, evitando con esto intoxicación alimentaria^{34,38}.

Existen algunos mecanismos por los que los probióticos son benéficos:

- Antagonismo mediante producción de sustancias antimicrobianas que ayudan a la profilaxis y tratamiento de infecciones, por ejemplo *L. reuteri*, que produce reuterina que elimina directamente microbios nocivos e promueve la respuesta inmune.
- Disminuyen la permeabilidad del epitelio intestinal.
- Mantenimiento del balance de la microbiota, esta capacidad conduce a la formación de una barrera mucosa que evitan colonización de bacterias patógenas.
- Aumento en la producción de anticuerpos del tipo IgA y la reducción de la inflamación del intestino.
- Se pueden adherir a las células epiteliales, bloqueando a los patógenos, esto puede activar una cascada de señalización que modulará a el sistema inmune.
- Inhibición en la producción de toxinas bacterianas, esto puede ser por inhibición de la adsorción ya que algunas cepas pueden unir su pared a toxinas. El nutriente esencial para casi todas las bacterias, excepto las ácido-lácticas, es el hierro^{35,37}.

Se han visto beneficios también a nivel dental, de infecciones del tracto urinario, enterocolitis necrosante, reducción en el colesterol total y en LDL, mejora el nivel de glucosa en ayunas de pacientes con DMT2, HbA1 y reducción del riesgo

cardiovascular, así como de la concentración de insulina y aumento en la tasa de curación a corto plazo en mujeres con candidiasis vulvovaginal.²⁸

Por su lado, se ha visto que la administración de *Akkermansia muciniphila*, conduce a la restauración de la barrera intestinal, puede prevenir o tratar varios problemas metabólicos y en estudios en ratones se ha visto que puede reducir la inflamación metabólica que ayuda a disminuir peso y masa grasa, además se ha manejado como un sensor de energía, pues aumenta cuando disminuyen las calorías y disminuye cuando hay energía extra y permite la absorción de energía cuando está disponible.²⁸

En cuanto a la respuesta inmune, se ha visto que los probióticos la pueden modular no solo a nivel a de mucosa intestinal, sino a nivel sistémico, por lo anterior se está investigando su implicación como profiláctico y terapéutico de enfermedades inflamatorias. Su consumo podría beneficiar en algunas situaciones que alteran el balance de la microbiota y la respuesta inmune, por ejemplo, alimentación con fórmula láctea, tratamiento con antibióticos, envejecimiento, enfermedades gastrointestinales, estrés, entre otras. El mecanismo podría ser, en el caso de las bacterias ácido lácticas, que pueden ser captadas por las células M que están en el epitelio, y así facilitar la estimulación del tejido linfoide asociado a mucosa intestinal; las células dendríticas capturan bacterias probióticas por sus prolongaciones citoplasmáticas que acceden al espacio luminal; dependiendo la cepa de probiótico, es la acción que se dará, ya sea de inhibición o de estimulación en la producción de

citoquinas IL-10 e IL-12, lo que influirá al final en la tolerancia o una respuesta inmune Th1, respectivamente^{35,36}.

Las células epiteliales se estimulan cuando interactúan con bacterias probióticas, se ha visto que la mezcla de varias cepas , induce la producción de TNF- α y activa vías de señalización; otra acción favorable de los probióticos es la producción de inmunoglobulina A y M, así como de interferón, modula producción de citoquinas de respuesta adaptativa, liberación de quemoquinas, activación de células NK (natural killer), desarrollo de células T reguladoras y aumento de la actividad fagocítica de monocitos o neutrófilos en individuos sanos. También se ha visto que aumentan la inmunidad en lactantes y reducen el riesgo de diarrea inducida por rotavirus; otro beneficio que se ha visto en modelos animales con diabetes fue que mejora los síntomas de esta^{5,36}.

En las alergias, se ha contemplado la opción de usar probióticos también, aunque son pocos los estudios que han encontrado efectos positivos especialmente en niños, y se debe tomar en cuenta que el efecto que pueden tener a este nivel depende de la cepa administrada, tipo de intervención, tipo de enfermedad y combinación con otros suplementos, se cree que el periodo ideal de administración de probióticos es el prenatal^{36,37}.

En la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, se encuentra un desbalance entre bacterias patógenas y protectoras (disbiosis), así pues, lo que se busca al suplementar con probióticos es colonizar el intestino con cepas que mejoren la

respuesta inmune protectora, esto se logra mediante la producción de citoquinas antiinflamatorias^{34,36,38}.

En la constipación se ha visto gran efecto de algunas cepas específicas que mejoran tanto el número como la consistencia en las deposiciones, así como disminución del dolor, las cepas más estudiadas en dicho efecto pertenecen principalmente al filo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se ha visto que la mezcla de muchos de ellos genera reducción más significativa de síntomas relacionados con el estreñimiento, y el beneficio aumenta si se adiciona fibra dietaria^{36,38}.

En el síndrome de colon irritable, que existe dolor abdominal, defecación alterada, consistencia de heces modificada, flatulencias e inflamación, se ha visto que ciertas cepas de probióticos han mejorado estos síntomas, esto se logra principalmente reestableciendo el balance de la microbiota^{34,36}.

En la intolerancia a la lactosa, caracterizada por dolor abdominal, diarrea, náuseas, flatulencias y/o distensión abdominal, el uso de probióticos redujo los síntomas, aunque de manera general lo que se concluye con más peso es que el único síntoma que mejora es el meteorismo^{34,36}.

Se ha estudiado mucho el efecto que tienen los probióticos en los niveles séricos de colesterol y lipoproteínas de baja densidad y también del metabolismo de la glucosa, esto ha sido tanto en animales como en humanos, el mecanismo no está del todo claro, pero algunos lo atribuyen a la supresión de la reabsorción de ácidos biliares en la circulación enterohepática y aumento en la excreción de esteroides

ácidos en las heces, así pues se cree que es producto de la precipitación del colesterol con ácidos biliares libres formados por las hidrolasas de las bacterias; también se ha observado que pueden disminuir la enzima HMG-Coa reductasa en el hígado que participa en la síntesis de colesterol. Otro mecanismo es que se pueden unir al colesterol en el intestino, o bien tienen la capacidad de convertir el colesterol en coprostanol para ser excretado en las heces^{34,37,38}.

El consumo de probióticos se ha asociado con cambios en el perfil de microorganismos, se ha visto que con su uso aumenta la concentración de bacterias gram-positivas y disminuyen las gram-negativas en las heces, esto a su vez hace que reduzca la endotoxemia pues los niveles circulantes de LPS también bajan, disminuyendo el riesgo de presentar obesidad y diabetes. También se ha encontrado que en ratones la administración de preparados con cepas de probióticos tipo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* mejoró la esteatosis y resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa^{2,5,35}.

La ingestión de *Lactobacillus casei* retrasó el inicio de diabetes en ratones diabéticos no obesos, así como en ratones con diabetes inducida por aloxano. Se ha visto que el pronóstico de la diabetes por inyección neonatal de STZ puede mitigarse alimentando a las ratas con pienso al que se le agregó *Lactobacillus rhamnosus*, también se ha visto que la administración de un producto lácteo que contiene *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*, en ratas tratadas con STZ mejoró la tolerancia a la glucosa, disminuyó colesterol LDL y VLDL totales y también los triglicéridos^{2,36}.

En general los productos probióticos contienen al menos 10^6 - 10^7 UFC, altas dosis son más efectivas ya que una gran cantidad muere en el estómago antes de llegar al colon.²⁸

Como ya se mencionó, las bacterias probióticas generalmente son gram-positivas, las más comúnmente utilizadas como probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Son llamadas BAL, por su facultad de convertir en ácido láctico los hidratos de carbono³⁹.

***Lactobacillus rhamnosus* HN001**

Las bacterias del género *Lactobacillus*, son bacterias ácido-lácticas, anaerobios y/o tolerantes a condiciones aerobias; pueden ser homo o heterofermentativos basado en el producto final de su fermentación (ácido láctico, acetato, etanol y CO₂) y pueden ser mesofílicos o termofílicos, dependiendo su temperatura óptima de desarrollo, también tienen la facultad de adherirse a la mucosa y producir bacteriocinas que son moléculas con estructura tipo péptido con acción bactericida⁴⁰.

Lactobacillus rhamnosus HN001 también es llamado DR20, es una cepa aislada por primera vez en Nueva Zelanda del queso Cheddar, se considera dentro del grupo BAL, sobrevive al tránsito gastrointestinal, pues es resistente a la bilis, al pH bajo y a las enzimas digestivas, además se ha observado que es capaz de adherirse al epitelio intestinal. Se ha visto que interfiere con bacterias patógenas como *Salmonella* o *E. coli* enterotoxigénico. Su mayor efecto comprobado ha sido el de

reforzar las defensas, esta modulación de la inmunidad resulta en un efecto antiinflamatorio, especialmente en sujetos inmunodeprimidos; se sabe que estimula la actividad citotóxica de las células NK (Natural Killer) involucradas en la defensa del organismo tanto frente a infecciones como a tumores, principal mente en adultos mayores, así también se ha asociado a aumento de IgA lo cual demuestra su capacidad de estimular el sistema inmune local⁴¹.

***Bifidobacterium longum* BB536**

Las bifidobacterias por su parte son habitantes naturales del tracto gastrointestinal, es más abundante en infantes que en adultos y juega un papel importante en el balance microbiano intestinal y modulación del sistema inmune; los efectos más importantes de este género radican en prevención de enfermedades diarreicas y protección cancerígena en el colon. Este género puede sobrevivir a las condiciones extremas de acidez en el estómago, así como a la presencia de sales biliares en el duodeno⁴². Producen enzima B-galactosidasa que ayuda en casos de intolerancia a la lactosa, y un aumento en su concentración en la microbiota intestinal, incrementa la conversión de hidratos de carbono en ácidos orgánicos como el láctico y el acético, otra función que tienen es que estimulan el peristaltismo y normalizan el tránsito intestinal cuando es lento³⁹.

Bifidobacterium longum BB536, tiene buena resistencia al medio ácido, es una cepa anaerobia con buena capacidad de crecimiento, así como buena capacidad de adhesión con bacterias patógenas. Es la especie que predomina en las heces

humanas y es la más utilizada a nivel industrial; también se ha visto que su principal beneficio en el organismo es reprimir la proliferación de bacterias dañinas como *Escherichia*, *Clostridium* y *Eubacterium* que finalmente resulta en la inhibición de la síntesis de productos tóxicos como el amoniaco y aumento de los niveles de AGV, todo esto contribuye a que se genere un ambiente colónico más sano⁴³. Otra acción que se ha encontrado de esta cepa es la modulación del balance de linfocitos Th, mediante la activación de la inmunidad innata TLR9 (Toll Like Receptor)³⁹.

También se ha comprobado su efectividad en la reducción de colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL y el índice aterogénico en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, este efecto aumenta cuando está acompañado de un prebiótico, en otros estudios se ha visto incluso aumento de colesterol HDL, la posible explicación de su efecto hipocolesterolemizante es que las bifidobacterias al fermentar hidratos de carbono y con esto producir AGCC son capaces de reducir la síntesis de colesterol hepático, otros autores han encontrado que los probióticos son capaces de inhibir la absorción intestinal de colesterol por su unión con los ácidos biliares, además favorecen la excreción de este a través de las heces por medio de interacciones peptídicas electrostáticas e hidrofóbicas⁴⁴. La administración dietética de *B. longum* disminuyó de manera significativa la incidencia de tumores en colon, así como su volumen, y se observó que al suplementar ejercía actividad antitumoral⁴⁵.

1.6.3 Prebióticos y simbióticos

Los prebióticos se definen como componentes de fermentación selectiva que causan cambios específicos en la actividad o estructura de la microbiota intestinal y con esto benefician al huésped.²⁸

Son carbohidratos no digeribles, oligosacáridos o polisacáridos cortos como la inulina, oligofructosa, galactofructosa, galacto-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos. Estos deben ser capaces de resistir los ácidos gástricos pero aun así ser degradados por las enzimas digestivas y ser absorbidas por el tracto superior del sistema digestivo, deben fermentarse por la microbiota y estimulan el crecimiento y la actividad metabólica de una sola bacteria o un número limitado de bacterias beneficiosas en el colon, es decir, tiene actividad selectiva.²⁸

Las principales especies objetivo de los prebióticos son los Lactobacillus y Bifidobacterias y su principal efecto radica en aumentar la producción de AGCC y disminución del pH. Un ejemplo del beneficio que confieren los prebióticos es por ejemplo, la inulina y la oligofructosa que benefician al organismo aumentando las bacterias gram-positivas y disminuyendo a su vez los niveles de LPS y su consecuente endotoxemia, normalizando así el tono inflamatorio^{5,28,35}.

Otro efecto benéfico de la inulina es que ayuda en la prevención de efectos nocivos de las dietas ricas en grasa sobre la capa mucosa y las funciones metabólicas, es decir, la dieta occidental baja en fibra causa debilitamiento de la barrera mucosa del colon y esto conduce a un crecimiento de la microbiota que hace susceptible al huésped a patógenos e inflamación; por otro lado la mezcla de galacto-

oligosacáridos y fructo-oligosacáridos son capaces de aumentar Bifidobacterias y disminuir *Clostridium* en el intestino mientras que los galacto-oligosacáridos solo aumentan los Lactobacillus.²⁸

Los criterios para seleccionar un prebiótico son los siguientes: resistencia a la digestión en la parte superior del tubo digestivo, fermentación por la microbiota intestinal, que tenga algún beneficio para el huésped y que estimule de manera selectiva. Los prebióticos pueden ser utilizados como alternativa a los probióticos o como soporte adicional para ellos; estos oligosacáridos, causan una reducción de pH intestinal y mantienen la retención osmótica de agua en el intestino, es importante tomar en cuenta que una dosis excesiva de estos puede llevar a flatulencia y diarrea que los probióticos no causan^{34,35,37}.

Los prebióticos pueden ser fibra dietética, pero la fibra no siempre es un prebiótico. Son considerados fibra dietética los siguientes polisacáridos no amiláceos: celulosa, hemicelulosa, pectina, gomas, sustancias obtenidas de algas marinas, lactulosa, oligosacáridos de soya, inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), transgalactooligosacáridos (TOS) isomaltooligosacáridos (OMI) y oligosacáridos de soja (SBOS). Según el número de monómeros los prebióticos se clasifican en disacáridos, oligosacáridos (3-10 monómeros), y polisacáridos, pero los criterios para clasificar los prebióticos más usados son los oligosacáridos^{34,36}.

Los prebióticos están presentes en productos naturales, pero también pueden ser añadidos a los alimentos, esto se hace con el fin de mejorar su valor nutricional. Así pues, el objetivo principal de los prebióticos es estimular el crecimiento y la actividad de bacterias benéficas en el tracto gastrointestinal, los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son en su mayoría AGCC que son utilizados como fuente de energía. El consumo de prebióticos se ha visto que beneficia en varias condiciones patológicas, por ejemplo se ha visto menor frecuencia de carcinoma colorrectal en personas que comen frutas y verduras, este beneficio se atribuye principalmente a la inulina y la oligofructosa, también se ha visto mejoría en parámetros como LDL (lipoproteínas de baja densidad), estimulación del sistema inmune, aumento en la absorción de calcio, mantenimiento de pH intestinal, alivio de las úlceras pépticas y en micosis vaginal; estudios en ratas han demostrado que también su consumo ayuda a una reducción de niveles de triglicéridos^{34,37}.

Los simbióticos son utilizados tanto para mejorar la supervivencia de microorganismos benéficos como para estimular la proliferación de cepas de bacterias específicas nativas del tracto gastrointestinal, para elegir los componentes de un simbiótico se debe seleccionar un probiótico y prebiótico apropiado, de forma que separados, tengan un efecto benéfico para la salud, la combinación de Bifidobacterium o Lactobacillus con fructooligosacáridos es la combinación más popular^{34,35,38}.

Los beneficios que se han encontrado en humanos al consumir simbióticos son: incremento del recuento de Lactobacillus y Bifidobacterium y mantenimiento del

equilibrio de la microbiota intestinal, mejora de la función hepática en pacientes con cirrosis, inmunomodulación, prevención de la translocación bacteriana y reducción de la incidencia de infecciones nosocomiales en pacientes posquirúrgicos. La translocación de productos del metabolismo bacteriano como LPS, etanol y AGCC, pueden llevar a esteatosis hepática^{34,37,38}.

Estudios en ratas, han demostrado que hay un aumento de IgA después del consumo de un simbiótico compuesto por: *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis*, inulina y oligofruktosa, este les redujo el colesterol y la presión arterial^{34,35}.

Se ha visto que, al fermentarse la oligofruktosa produce ácido butírico, que promueve la diferenciación de células L en el colon proximal y aumenta así la síntesis de GLP-1 que participa en el metabolismo de la glucosa y favorece la sensación de saciedad. Así pues, se ha observado que las fibras solubles pueden retrasar el vaciado gástrico, retardar la entrada de glucosa al torrente sanguíneo y disminuir la glucosa postprandial. Los efectos observados al consumir oligofruktosa explican la disminución posprandial de la glucemia en sujetos sanos^{5,35}.

Se ha demostrado que el consumo de prebióticos mejora la diabetes inducida por dietas ricas en grasa en ratones, esto se observó administrando oligofruktosa, pues mejoró la tolerancia a la glucosa, redujo los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1².

A pesar de todos los hallazgos favorables encontrados en cuanto al control de la glucosa y mejora de los lípidos en sangre, los probióticos, prebióticos y simbióticos, no pueden ser prescritos como medicina alternativa para los pacientes con diabetes mellitus, pero si se pueden sugerir como complemento, además de la medicina y modificación en el estilo de vida³⁵.

1.6.4 Trasplante de microbiota fecal (TMF)

Como se mencionó anteriormente, la alteración del ecosistema bacteriano intestinal (disbiosis) o cualquier cambio en la ecología microbiana intestinal juega un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades, tanto intestinales, autoinmunes como metabólicas. Existen varios estudios que demuestran que al recuperar la normalidad de la microbiota mediante transferencia directa de esta desde un donante sano, es muy efectivo para tratar o mejorar ciertas condiciones patológicas.⁴⁶

A este procedimiento que consiste en la administración de contenido fecal desde un individuo sano al paciente con el fin de restaurar la microbiota intestinal protectora, se le ha llamado trasplante de microbiota fecal (TMF).⁴⁶

El TMF o también llamado bacterioterapia fecal, tiene varias vías de aplicación , por ejemplo, puede ser vía nasogástrica, nasoyeyunal, nasoduodenal, por colonoscopia, endoscopía, sigmoidoscopia o enema de materia fecal mezclada en solución salina u otra sustancia, aun no existe un consenso de qué vía es la mejor

para realizarlo³¹. También se han usado cápsulas con recubrimiento entérico y cápsulas con heces o con bacterias liofilizadas (Figura 5)^{11,28}.

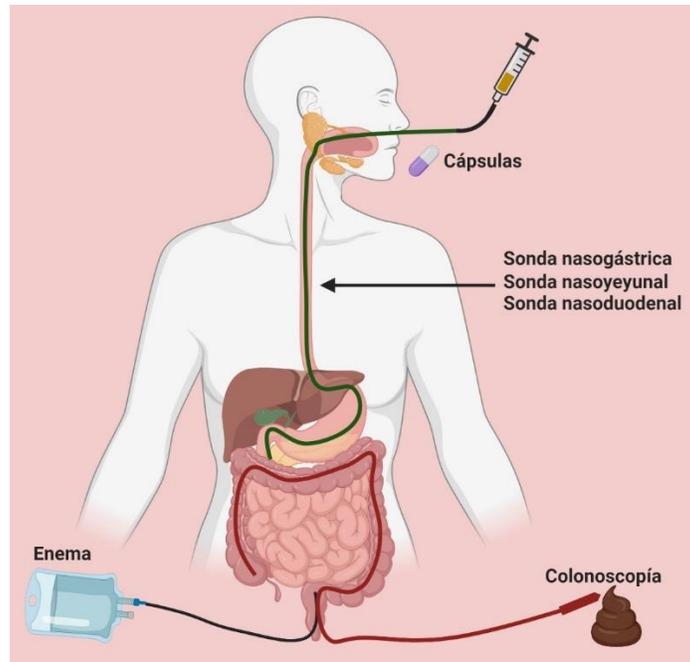


Figura 5. Vías de administración de trasplante de microbiota fecal conocidas hasta el momento.
Fuente: Hassan N, *et al.* (2019)²⁸.

Independientemente de la ruta, existe suficiente evidencia de que es una opción eficiente y terapéutica para varias enfermedades intestinales, pues restaura la composición y función de la microbiota intestinal haciéndola similar a la del donador, actualmente el problema de seguridad del trasplante es un obstáculo principal para usarlo en más pacientes debido a la complejidad de la comunidad microbiana de las heces.²⁸

El procedimiento de TMF data del siglo IV en China, Ge Hong describió el uso de materia fecal humana por vía oral para pacientes con intoxicación alimentaria o

diarrea grave, y era conocido como “sopa amarilla”; ya en el siglo XVI, Li Shizhen describió el uso de soluciones fecales fermentadas, suspensiones fecales frescas, heces secas o heces de infantes para el tratamiento de trastornos gastrointestinales^{48,49}. En el siglo XVII, se utilizó mucho en el área veterinaria ya sea vía oral o rectal, a este procedimiento se le llamó “transfaunación”; en muchos países es una práctica común, y lo hacen recolectando heces de la madre y administrándolas a su hijo para poblar de bacterias benéficas el intestino del bebé. Se registra el primer caso de esta práctica en 1958 a 4 pacientes con enterocolitis pseudomembranosa, y a partir de ahí ya hay más de 700 casos reportados con una tasa alta de éxito^{47,48}.

El TMF ha sido muy estudiado y se ha demostrado que las heces son un conjunto complejo biológicamente activo de organismos vivos con mucho potencial terapéutico, así pues, la microbiota intestinal es este componente activo de las heces, y por lo anterior, su transferencia de un donante sano a una persona que sufre una patología física o síntomas de esta se le ha denominado trasplante de microbiota fecal⁴⁸.

Se considera que el TMF regenera la microbiota del individuo con una gran diversidad de bacterias que por competencia excluyen a *Clostridium difficile*; esta infección nosocomial es por bacterias gram-positivas y es en la que más se ha aplicado este procedimiento; al recibir antibióticos, el ecosistema se altera porque se elimina incluso las bacterias benéficas, lo que hace que *C. difficile* crezca pues

sus esporas son resistentes a los antibióticos y genera toxinas que pueden provocar diarrea, dolor abdominal y fiebre^{47,48,49}.

El TMF se ha estudiado más allá de afecciones gastrointestinales (Enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable), pues se ha contemplado como estrategia terapéutica para otras enfermedades como síndrome metabólico, obesidad, DM2, resistencia a la insulina, hipercolesterolemia, esteatosis hepática, afecciones neuropsiquiátricas, enfermedades autoinmunes, cáncer de colon, inmunidad antitumoral, síndrome de fatiga crónica, infecciones resistentes a medicamentos, encefalopatía hepática, alergias y otras⁴⁷.

Los cambios que se producen después del procedimiento se mantienen a largo plazo, y se ha visto también que a los 14 días después del procedimiento ya se pueden ver resultados, confirmando una composición muy similar a la del donante.¹¹

Como ya se mencionó, se ha caracterizado la microbiota de individuos delgados y obesos y se han encontrado diferencias muy marcadas entre ambos. En ratones obesos, la microbiota intestinal mostró aumento en la proporción de Firmicutes a Bacteroidetes con mayor extracción de energía de la dieta; la transferencia de microbiota intestinal de gemelos humanos discordantes de la obesidad a ratones libres de gérmenes los llevó a mayor adiposidad y masa corporal en los ratones trasplantados con microbiota obesa^{49,50}.

Se ha estudiado el TMF en pacientes con síndrome metabólico, estos recibieron microbiota fecal de donantes magros masculinos y tuvieron un notable aumento en

la sensibilidad a la insulina, aumento de la diversidad microbiana y aumento de bacterias productoras de butirato (*Roseburia intestinalis*), cambios que en el grupo control no hubo^{47,50}. En otro estudio que se hizo en 18 pacientes con síndrome metabólico, se les dio infusión de microbiota fecal procedente de personas con IMC <23, viendo que hubo un aumento significativo de la sensibilidad a la insulina a nivel hepático y periférico.¹¹

Existe la posibilidad de transmitir infecciones al hacer la TMF, es por eso por lo que se deben hacer rigurosas pruebas para seleccionar al donante. Debido a la relación que se ha encontrado en la variación de la diversidad bacteriana entre individuos delgados y obesos, es importante tomar en cuenta también el IMC (Índice de Masa Corporal) al momento de elegir donantes; después de la elección se evalúan las muestras para detectar algún agente patógeno^{48,50,51}.

Los tipos de donantes de microbiota pueden clasificarse en cuanto a su relación con el receptor en 4 grupos: familiares de sangre (54%), individuos con contacto íntimo (pareja) (8%), voluntarios sanos sin relación (25%), donante no especificado (12%).^{11,52} En la Figura 6 se presentan los principales criterios de exclusión de donantes de microbiota fecal.

Se ha propuesto que el monitoreo de los donantes habituales sea con un intervalo de cada 3 o 4 meses.¹¹

<p>Absolutos</p> <p><i>Infeciosos</i></p> <p>Infección por VIH, hepatitis B y C</p> <p>Riesgo de transmisión (en los últimos 12 meses) de VIH, hepatitis B y C</p> <p>Conductas sexuales de riesgo</p> <p>Uso de drogas ilícitas</p> <p>Tatuajes o <i>piercings</i> en los últimos 6 meses</p> <p>Actual o historia previa de encarcelamiento</p> <p>Enfermedad transmisible actual</p> <p>Factores de riesgo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob</p> <p>Viajes en los últimos 6 meses a países con enfermedades diarreicas endémicas o de alto riesgo de diarrea del viajero</p> <p><i>Comorbilidades gastrointestinales</i></p> <p>Enfermedad inflamatoria intestinal</p> <p>Síndrome de intestino irritable, estreñimiento crónico o diarrea crónica</p> <p>Antecedentes de neoplasia maligna gastrointestinal o poliposis</p> <p><i>Factores que pueden alterar la microbiota intestinal</i></p> <p>Uso de antibióticos en los últimos 3 meses</p> <p>Uso de medicación inmunosupresora: glucocorticoides, inhibidores de la calcineurina, agentes biológicos</p> <p>Uso de tratamiento antineoplásico</p> <p><i>Específicos del receptor</i></p> <p>Ingesta reciente de alérgeno al cual el receptor es alérgico</p> <p>Relativos</p> <p><i>Cirugía mayor previa en el aparato digestivo</i></p> <p><i>Síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 L1</i></p> <p><i>Enfermedades autoinmunes tipo esclerosis múltiple, enfermedades del tejido conectivo</i></p> <p><i>Enfermedades atópicas (asma, eccema, patologías eosinofílicas del tracto gastrointestinal)</i></p> <p><i>Síndromes de dolor crónico (fibromialgia, síndrome de fatiga crónica)</i></p>
--

Figura 6. Criterios de exclusión para donar microbiota fecal. Fuente: Garcia A, et al. (2015)¹¹.

Procedimiento

Algunos autores sugieren la utilización de un laxante osmótico la noche previa a la donación, independientemente de la vía elegida. Se ha sugerido como evacuantes el polietilenglicol en la preparación del receptor, también el uso de loperamida oral en dosis única o múltiple (2 mg iniciales seguido de 2 mg cada 2 horas hasta un total de 8 mg), esto para retener la solución trasplantada.^{11,46}

En cuanto a antibióticos, muchos sugieren suspender el tratamiento, entre 1 y 3 días antes; para la supervivencia en el tracto digestivo alto se sugiere usar antisecretores cuando se usa vía nasogástrica o nasoyeyunal en la preparación del receptor (Inhibidores de la Bomba de Protones la noche anterior y la mañana del procedimiento) esto para disminuir un posible efecto deletéreo de la secreción gástrica en la solución instilada.¹¹

Hablando ya de la muestra y su preparación se ha sugerido la cantidad que va desde 5 hasta 300 g, la mayoría utiliza heces frescas, conservadas en nevera, cuyo tiempo de donación transcurrido sea menos a 6 horas y nunca mayor a 24 horas. También se ha descrito el uso de un crioprotector añadido a la suspensión de heces, para almacenarla durante 1-8 semana a -80 C hasta su utilización, con resultados similares a los de heces frescas, al hacer el proceso de congelación se puede eliminar el olor fecal, reducir el volumen instilado y hasta abrir la posibilidad a futuros bancos de heces.¹¹

Dentro de los diluyentes que se han utilizado se encuentran el suero salino fisiológico 0.9%, agua, leche o yogurt. El volumen varía entre 50 a 500 cc, para preparar la solución, las heces y el diluyente se deben homogeneizar en una batidora hasta alcanzar consistencia líquida y posteriormente debe filtrarse para eliminar la mayor cantidad posible de productos residuales. Una vez preparada la solución puede ser depositada en bolsas para su administración vía enema rectal o en jeringas para la administración por vía nasogástrica o colonoscópica. Se ha visto

que a mayor volumen de administración mayor tasa de resolución de la infección por *C. difficile*.^{11,46}

La vía digestiva alta (nasogástrica, nasoduodenal, nasoyeyunal) permite la llegada de bacterias al íleon terminal y a todo el colon, está demostrada su eficacia pero presenta el inconveniente de rechazo por parte del paciente, por su parte, la vía digestiva baja por enemas o instilación endoscópica, sigue siendo la forma más fácil y barata de efectuarlo con poco riesgo para el paciente, recientemente la colonoscopia se ha vuelto una opción atractiva porque ofrece una visualización directa de la mucosa cólica y puede entregar un gran volumen de materia fecal a lo largo de todo el colon e incluso en íleon terminal, pero es más costosa, tardada, incomoda y con más efectos adversos como perforación. El modo de administrar la solución que se ha propuesto es instilar toda la solución o bien de forma gradual cada 5-10 cm en retirada, pero existe el riesgo de perforación.¹¹

Algunos autores encontraron que la administración por vía intestinal inferior es más efectiva que la que se hace por tracto superior, esto se puede deber a que muchos tipos de bacterias se afectan por la vía de administración, por ejemplo, Bacteroidetes que es sensible a los ácidos del estómago y el tracto inferior le ofrece un ambiente más suave.⁴⁶

No existe evidencia para establecer el número o la frecuencia de TMF necesario para el éxito terapéutico, pero se han visto resultados desde una sola dosis.

En cuanto al receptor, no hay un consenso que diga cuales son los candidatos ideales, solo se ha propuesto que se descarten pacientes con inmunosupresión secundaria a quimioterapia, infección por VIH con recuento de CD4 <240/mm³ o uso prolongado de corticoides a altas dosis, también se toma como exclusión embarazo, antibióticos, estar en cuidado intensivos, uso de fármacos vasoactivos, cirrosis descompensada, trasplante de medula ósea reciente o el uso de anti-TNF. Para evaluar al receptor hay que entrevistarlo sobre antecedentes, infecciones pre-TMF, análisis de sangre con serología.¹¹

Hay que tomar en cuenta que por más estrictos que se sea en los requisitos del donante puede ocurrir la transmisión de infecciones, ya sea por norovirus, colitis ulcerosa, peritonitis.

El TMF se presenta como un procedimiento efectivo con aplicabilidad casi universal, bajo coste, pero también con ella llega su naturaleza desagradable, esto parece preocuparle más al personal de salud que a los pacientes, pues estos últimos, prefieren elegir este procedimiento y evitar todos los síntomas que trae consigo la infección por ejemplo por *C. difficile*. Así pues, se puede ofrecer este tratamiento para pacientes que así lo requieran e ir abriendo camino en otras indicaciones poco estudiadas, pero todo cuidando la seguridad ante todo del paciente.^{11,48}

Los efectos adversos son escasos y leves, generalmente es un procedimiento bien tolerado y seguro, los malestares inmediatos incluyen diarrea, malestar abdominal, náuseas, distensión abdominal, flatulencias, diarreas, calambres abdominales, estreñimiento, vómitos y fiebre transitoria, prurito, malestar rectal, dolores de cabeza

y dolor de garganta, clínica catarral, elevación de la Proteína C reactiva, ampollas en la lengua, estos síntomas desaparecen a los 2 días posteriores^{48,51,52}.

Mucho se ha dicho que el TMF supera a los probióticos, pues al final estos últimos contienen bacterias específicas y existen dudas sobre si sobrevive la cantidad suficiente a los ácidos del estómago y que lleguen viables al intestino; las cepas probióticas deben superar a la microbiota residente y ocupar un nicho ecológico.²⁸

Puesto que la microbiota residente es inherentemente resistente al colonizador externo, las cepas probióticas pueden no colonizar y funcionar en el intestino, además los probióticos restauran la microbiota durante un periodo intermedio, mientras que se ha visto que el trasplante entrega muchas bacterias fecales al colon y causa restauración permanente de la microbiota.²⁸

Los probióticos rara vez permanecen en el colon más de 14 días después de que el paciente deja de tomarlos, mientras que los efectos del TMF pueden persistir hasta 24 semanas, lo que quiere decir que este último puede causar cambios más pronunciados.²⁸

1.7 Modelos experimentales

Los modelos animales resultan valiosos en el estudio de diferentes enfermedades, ya que en humanos suele ser complejo, sobre todo porque no es posible controlar todas las variables que influyen en el desarrollo de estas⁵³.

Los más utilizados son los mamíferos, sobre todo por la proporción del tamaño de sus órganos respecto a su peso corporal, así pues, en casi todos, el corazón pesa

de 5 a 6 g/Kg de peso corporal, mientras que la sangre representa comúnmente el 7% del peso corporal⁵⁴.

El ratón es el mamífero mejor conocido y caracterizado, por ende, el más utilizado, y lo que lo hace ideal es el hecho de que se conoce perfectamente su genoma, por su tamaño es fácilmente manejable, es de mantenimiento económico, tiene un corto periodo gestacional, alta tasa de reproducción y alcanzan muy pronto su madurez sexual⁵⁴.

Las cepas exogámicas (outbred strain) son obtenidas por cruzamiento al azar a partir de una gran cantidad de progenitores lo que hace que tengan gran variabilidad genética y por ello representan de manera adecuada a la población humana por su heterogeneidad. El ratón es un modelo isomórfico, pues presenta síntomas semejantes a los de los humanos, aunque la causa de la enfermedad difiera entre estos y el modelo, pues muchas veces o la mayoría, estas causas son inducidas⁴⁸.

Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología. El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola; el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30 g, pero depende de la especie. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactancia. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas. El peso de un ratón macho adulto oscila entre los 20 y 40 g, su

expectativa de vida es de 1.5 a 3 años, su consumo de agua varia de 15 ml/100 g/día y de alimento de 12-18 g/100 g/día, son coprófagos^{54,55}.

Su comportamiento es sociable y se mantienen en grupos, pero estos grupos deben formarse luego del destete, pues los machos comienzan a mostrar agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan establecido al destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas. El acto de comer es cíclico, con un pico máximo durante el periodo de oscuridad. El mayor consumo de agua es durante las horas de oscuridad. El consumo de alimento y agua varía entre las cepas de ratones. El ratón generalmente divide su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar. Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca de él o sobre las crías⁵⁵.

Para realizar investigación biomédica en animales que sea éticamente aceptable, este se tiene que regir por las tres R de la experimentación humanizada, estas son: Reducir, Reemplazar y Refinar. El término reducir se refiere a disminuir al máximo el número de animales a utilizar en la investigación; reemplazar nos habla de que siempre que sea posible sustituir un animal por otro modelo experimental se debe hacer, a menos que resulte imprescindible el uso de animales; y refinar, que los métodos y técnicas utilizadas produzcan el menos sufrimiento y estrés posible en el animal^{54,55}.

La dieta estándar de un roedor en cuanto a composición química se refiere consiste en proteína cruda 20%, grasa cruda 9.81%, fibra cruda 2.15%, cenizas 6.38%, siendo su consumo diario aproximado de 3 a 6 g de alimento y 3-7 ml de agua⁵⁵.

1.7.1 Modelos animales para el estudio de la DM2

Los estudios sobre diabetes en humanos resultan difíciles a nivel experimental pues son muchos los factores que intervienen para que esta se desarrolle además de la predisposición^{53,56}. A pesar de que en la última década ha habido una extensa lista de información sobre factores genéticos y ambientales, falta aún demasiado por dilucidar, es por eso que los modelos animales tiene un papel fundamental en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos así como en la evaluación, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad⁵⁷.

En particular, los ratones cuentan con características especiales como rápido desarrollo de hiperglucemia que los hacen idóneos para el estudio de la diabetes. En modelos animales la diabetes se puede presentar de manera espontánea como inducida o ambas⁵³.

Los modelos espontáneos son cepas que no se alteran y que proceden de animales en los que se ha detectado la enfermedad de forma espontánea, no siempre son totalmente espontáneos, sino que se le tienen que hacer modificaciones adicionales para que desarrollen la enfermedad.

Los modelos inducidos, permiten reproducir manifestaciones clínicas de la DM2; la inducción de la enfermedad puede ser por 3 mecanismos principales: inducción hormonal, en la que se administran corticoides, somatostatina, glucagón, catecolaminas y tiroxina; manipulación genética, esto permite conseguir modelos que sobreexpresen o carezcan de cierta proteína por ejemplo implicada en el metabolismo de la glucosa; y por último administración de fármacos, que resultan tóxicos para las células beta, ejemplo de estos fármacos son el aloxano y la estreptozotocina (STZ)⁵³.

El aloxano, altera la permeabilidad de la célula beta, es un derivado de la urea causa necrosis selectiva, provocando DM1, su acción toxica inicia a través de radicales superóxido o peróxido de hidrógeno, puede afectar otros órganos internos y produce diabetes grave⁶⁰. La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro^{58,59}. Es un agente alquilante, que interfiere con el transporte de la glucosa (utiliza el transportador GLUT2) y la función de la glucoquinasa, actúa específicamente sobre las células beta del páncreas e induce múltiples puntos de ruptura en la doble hélice del ADN causando daño y muerte por la polirribosilación y generación de radicales a través de la vía xantina-oxidasa^{38,39}. El tipo de diabetes que induce es dependiente de la dosis administrada tanto en cantidad como en frecuencia, pues se ha visto que a dosis bajas provoca DM2^{56,60}, La STZ es utilizada por su mayor estabilidad y efectividad respecto a otros³⁷. Además de que tiene una vida media más larga (15 minutos) y la hiperglucemia que induce es más sostenida⁶⁰.

1.7.2 Composición de la microbiota del ratón

Como sabemos, las ratas y los ratones son de los animales más utilizados para el estudio de la microbiota, esto se debe a sus similitudes tanto fisiológicas como anatómicas a nivel de órganos, tejidos y células.

La utilización de ratones en lugar de ratas supone ciertas ventajas, una de ellas es como ya se mencionó, el tamaño, el costo de alojamiento bajo y disponibilidad de cepas de ratones transgénicos bien establecidos como modelos para ciertas enfermedades humanas, además los animales libre de gérmenes presentan un elevado uso como receptores de trasplantes de microbiota, pues pueden reconstituirse eficientemente con comunidades microbianas aisladas de otras especies, incluidos los humanos, haciendo que las características del donante se reproduzcan en el receptor, cuando se ha hecho este procedimiento con muestras de heces de sujetos obesos o desnutridos, ha sido suficiente para fenocopiar estas características, por ejemplo de recolección de energía, esto demuestra que a pesar de la diferencia entre especies, el modelo murino es una herramienta valiosa para estudiar microbiota intestinal humana.^{29,61}

La microbiota intestinal del ratón se caracteriza por su gran estabilidad, al igual que el humano, ciertos cambios en la dieta o factores como el estrés afectan su composición, estas similitudes permiten que los hallazgos encontrados se puedan extrapolar hasta cierto punto a los seres humanos. Hablando ya de un modelo experimental, en especial libre de patógenos, se encuentra una microbiota menos compleja que en los humanos, encontrando géneros específicos en cada región, La

mayor parte de su microbiota intestinal se encuentra en ciego y colon, (10^{10} bacterias/g); en el ciego los géneros más prevalentes son *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* y *Eubacterium*, así como *E. coli* en el colon en cambio predominan los microorganismos anaerobios. El grupo de bacterias que se encuentra en mayor número es el *Lactobacillus*⁶².

En un artículo publicado en 2018 por Hart y colaboradores, se realizaron transferencias de microbiota de ratones de la cepa CD1 a cepas diferentes, y se encontró que a pesar de ser diferente el perfil de cada uno de los 4 grupos experimentales que se formaron, el patrón se mantuvo durante 9 generaciones, esto demuestra la estabilidad de la microbiota aun con diferencias tanto en composición como en complejidad, esto hace del ratón, un recurso experimental invaluable que puede sin problema usarse para investigar efectos de la microbiota en el fenotipo del modelo de ratón, un ejemplo de esto en donde se pueden emplear estos modelos son en enfermedades gastrointestinales, cáncer colorrectal y obesidad, que son patologías que se han asociado con alteraciones en taxones como *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y/o *Rikenellaceae*, haciendo que se puedan usar para estudios específicos de microbiota complejos.⁶³

En el estudio mencionado, se encontró cierto perfil de abundancia en la cepa CD1 y se observó que predominan las familias *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae* (Bacteroidetes) y grupo *Clostridiales vadin* (Firmicutes) en comparación con otros.⁶³

2. JUSTIFICACIÓN

El uso de nuevas intervenciones encaminadas a mejorar la composición de la microbiota intestinal han demostrado tener un impacto positivo sobre las alteraciones metabólicas como lo es la diabetes. El control de la DM2 es problema imperativo de tratar, su alcance afecta cada vez más a grupos poblacionales jóvenes, debido a los malos hábitos alimenticios y a diversos factores ambientales entre ellos la microbiota que particularmente en la DM2 se encuentra alterada. Por lo que conocer los mecanismos por los cuales la microbiota participa en esta enfermedad, resulta importante tanto para incidir de manera temprana como profiláctico, o bien, como terapéutico para un mejor control glucémico y disminución de complicaciones que a la diabetes acompañan. Intervenir a este nivel ayudaría a disminuir la aparición de la enfermedad además de reducir sus complicaciones incluyendo enfermedad cardiaca.

La incorporación de probióticos a la dieta puede ser la pauta inicial para mantener la homeostasis de la microbiota intestinal previniendo alteraciones y estimulando mecanismos que tienen que ver con el control del apetito y saciedad, que al final desembocarán en disminución del riesgo de aparición de obesidad y diabetes, por todo lo anterior se ha considerado a la microbiota como un órgano más. Otra alternativa para volver al equilibrio de la microbiota intestinal, es trasplantar una microbiota en equilibrio, es decir proveniente de pacientes sanos, aunque no es una práctica médica aprobada en México para enfermedades metabólicas, este procedimiento se ha llevado a cabo en padecimientos como la colitis

pseudomembranosa y otros trastornos gastrointestinales. Sin embargo, no se sabe a ciencia cierta el impacto sobre el metabolismo del individuo y los riesgos que pueda implicar en la salud del receptor, aunque se podría inferir un impacto benéfico al reestablecer el equilibrio en las poblaciones bacterianas.

En el presente trabajo proponemos comparar el uso de probióticos comerciales que contienen las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium longum* BB536 en el control glicémico, peso y estado en general de ratones diabetizados y de ratones sanos, consideramos que el uso de probióticos es suficiente para la mejora metabólica en la DM2 inducida en el modelo murino, y que además tendrá un efecto sobre el control glicémico en ratones sanos evidenciando el beneficio del consumo de los probióticos. Además de la administración regular de probióticos, decidimos evaluar el trasplante de microbiota sana total a ratones diabetizados, esto con la finalidad de determinar si la administración de una o dos cepas de bacterias es suficiente o si se requiere de trasplantar todo el ambiente de la microbiota, pues hay otros factores como, metabolitos y algunos bacteriófagos que pueden participar también en el establecimiento del equilibrio en el intestino.

3. HIPÓTESIS

La administración de probióticos comerciales *Lactobacillus rhamnosus HN001* y *Bifidobacterium longum BB536* disminuyen el nivel de glucosa en sangre en ratones diabetizados, además el trasplante de microbiota sana en ratones diabetizados tiene un impacto positivo sobre los niveles glicémicos en sangre periférica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus HN001* y *Bifidobacterium longum BB536*) y del trasplante de microbiota de ratones sanos sobre el nivel glucémico en ratones diabéticos y sanos.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar el nivel de glucosa en ratones diabéticos y sanos a los cuales se les administrará probióticos (*Lactobacillus rhamnosus HN001* y *Bifidobacterium longum BB536*) durante 21 días.

Evaluar el nivel de glucosa en ratones diabéticos y sanos trasplantados con microbiota proveniente de ratones sanos en tres dosis.

Comparar el efecto en el control glucémico de ratones diabéticos del trasplante de microbiota sana, administración de probióticos versus grupo control.

Comparar el efecto en el control glucémico de ratones sanos del trasplante de microbiota sana, administración de probióticos versus grupo control.

5. METODOLOGIA

5.1 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 libres de patógenos específicos de 8 semanas de edad, en los cuales el peso oscila entre 40-50 gramos, suministrados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México. Los animales se mantuvieron en un estante ventilado aislado en condiciones asépticas, a una temperatura de 24 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones fueron alojados en grupos de 3 en cajas de policarbonato con cama de viruta con alimento balanceado y agua *ad libitum* estériles. Estos estudios se realizarán de acuerdo con las directrices que marca la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio⁶⁴.

5.2 Inducción de diabetes experimental

La diabetes se inducirá utilizando el método descrito por Bequer *et al* (2016), con algunas modificaciones incorporadas por nuestro equipo de investigación³⁷. Los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno de 4 horas, después del cual se procedió a la administración de 40mg/kg de peso de un liofilizado de estreptozotocina STZ (Goldbio, EE. UU.) disuelta en 2 ml de solución tampón de citrato (pH 4.5)⁵⁷. La administración se realizó por vía subcutánea introduciendo una

aguja en el pliegue cutáneo dorsal del cuello y se realizó durante 3 días consecutivos.

Después de 10 días se tomó la glucosa en ayuno para comprobar el diagnóstico de diabetes (glucemia >200 mg/dL)⁵⁸. A partir de este momento se tomó de manera semanal la glucemia y peso de cada ratón; también se tomará muestra sanguínea al inicio y final de la intervención durante 10 semanas.

5.3 Curva de tolerancia a la glucosa (CTOG)

Se tomó su peso de manera semanal con una báscula analítica marca Scout Pro (OHAUS) durante 10 semanas, también fueron marcados para su identificación.

Se realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) tomando una medición inicial después de 4 a 5 horas de ayuno con un equipo One Touch Ultra® de LifeScan, posteriormente se administró una sobrecarga de dextrosa monohidratada (80 mg/kg) en un volumen de 200 μ L con una cánula gastroesofágica para roedor y se tomó la concentración de glucosa en el tiempo 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la descarga.

Se colectaron heces de los ratones antes del proceso de diabetización, esta se realizó usando tubos falcon graduados de 15 ml, a los cuales se les agregará el doble de volumen de glicerol al 20 %, esta muestra será guardada a -70°C para su conservación y posterior uso.

5.4 Control de ingesta de alimento y agua

La ingesta de la cantidad de alimento fue tomada en cada experimento dejando la cantidad preestablecida de 200 gr de alimento por caja y pesando semanalmente el alimento sobrante. Este valor fue restado al valor inicial y con la diferencia se calculó el promedio de ingesta por ratón tanto de agua como de alimento.

5.5 Control de peso

Los animales fueron pesados antes de cada procedimiento mediante el uso de una balanza analítica marca Scout Pro (OHAUS). Los ratones fueron colocados en un recipiente previamente tarado y posteriormente se registraba el peso. Los pesos fueron tomados semanalmente tanto a ratones diabetizados como sanos.

5.6 Eliminación de microbiota nativa con antibióticos

Con el fin de eliminar la microbiota intestinal nativa, y para que este sea un medio apto para el trasplante de microbiota fecal, se administró por vía intraperitoneal a cada ratón 300 μ L de un coctel de antibióticos que consistió en 5 mg/kg de metronidazol (Novag, México), 25 mg/kg de ciprofloxacino (Senosiain, México), y 50 mg/kg de vancomicina (PiSA Farmacológica) durante 3 días consecutivos.^{28,29,30-33}.

5.7 Trasplante de microbiota fecal en ratones

Después de 2 días del término de esquema de antibióticos, se realizó el trasplante de microbiota fecal, este se llevó a cabo después de 5 horas de ayuno.⁴⁶

Para iniciar el procedimiento, se administró por vía gastroesofágica una solución de 200 μ L de Bicarbonato de Sodio al 1.33%, esto con la finalidad de disminuir los

niveles de acidez estomacal. Posteriormente se anestesió a cada ratón con 200 µL de Pentobarbital sódico (PiSA Agropecuaria, México), este se preparó con 1 ml de Pisabental® aforado a 10 ml con PBS, el procedimiento se realizó por vía intraperitoneal en posición decúbito supino⁶⁵.

Una vez comprobado que los ratones están bajo efecto de la anestesia se procedió a administrar por vía gastroesofágica 300 µL de solución de heces utilizando un catéter I.V. 17 G x 1 ½, esta solución se preparó a partir de la muestra recolectada y almacenada previamente, luego se procedió a aforar con 10 ml de PBS (Buffer fosfato salino) como vehículo y se agitó en vórtex para homogenizar la mezcla; la solución final fue la administrada y el procedimiento se repitió durante 2 días consecutivos.

5.8 Administración de probióticos en ratones

Los probióticos utilizados en este estudio fueron suministrados por Alfa Wassermann S.A. de C.V. (Italia): *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium longum* BB536. Se suspendieron en agua potable en dos diferentes concentraciones, las cuales se detallan más adelante y fueron administrados el mismo día de su preparación. Los probióticos fueron administrados mediante sonda gastroesofágica al grupo correspondiente durante 21 días en una concentración de 4 mil millones UFC de *Bifidobacterium longum* BB536 y 1 mil millones UFC de *Lactobacillus rhamnosus* HN001.

En la primer concentración se calculó la dosis mediante fórmula de acuerdo al peso corporal de los ratones y tomando como referencia el peso promedio de un humano, así pues, lo que correspondió a cada ratón fue 264 mg/Kg de peso corporal, quedando al final 11.88 mg por cada ratón.

Se decidió administrar para este experimento 2.5 veces la dosis calculada quedando en 30 mg por cada ratón, el volumen final inoculado fue de 300 μL ⁵⁴.

Fórmula para dosis en ratones:

$$\text{Dosis}_1 = \text{Dosis}_2 \left(\frac{W_1}{W_2} \right)^{-.25}$$

Donde:

W_1 : Peso corporal, en gramos, del animal cuya dosis se quiere calcular

W_2 : Peso corporal, en gramos, del animal cuya dosis se conoce

Dosis_1 : Dosis desconocida, en mg/Kg, que corresponde a W_1

Dosis_2 : Dosis conocida, en mg/Kg, que corresponde a W_2

En la segunda concentración se calculó la dosis que se administraría a cada ratón haciendo pruebas de dilución del liofilizado en agua potable y así dar lo máximo posible del producto sin exceder el volumen gástrico, así pues lo que correspondió a cada ratón fue 150 mg, que contenían un aproximado de .25 billones de UFC, al grupo control se administró solo agua potable, el volumen final inoculado fue de 300 μL .

5.3 Diseño experimental

Los animales se distribuyeron de modo aleatorio en diferentes grupos (Figura 7 y 8)



Figura 7. Diseño experimental de intervención con probióticos y trasplante de microbiota fecal proveniente de ratón sano en ratones diabetizados con STZ.

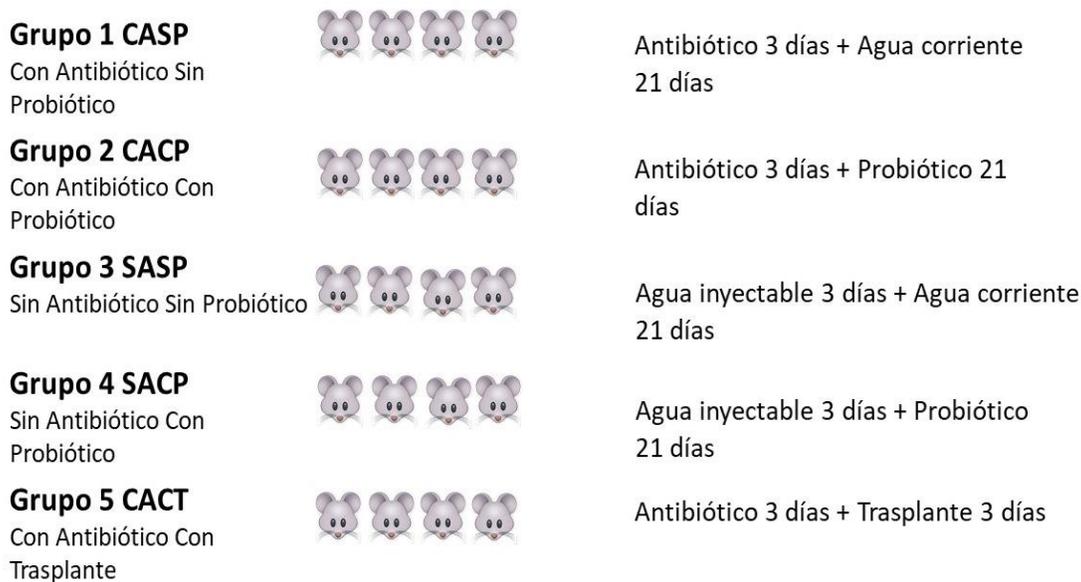


Figura 8. Diseño experimental de intervención con probióticos y trasplante de microbiota fecal proveniente de ratón sano en ratones sanos.

5.4 Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando el mínimo necesario de ratones, como lo recomienda el comité de bioética en experimentación animal. De acuerdo con el diseño del estudio, se utilizar 3 y 4 ratones por condición respectivamente.

Los resultados serán expresados como la media aritmética, desviación estándar y error estándar. Para evaluar si los datos se distribuían con normalidad se utilizó la prueba Shapiro Wilk y la significación de las diferencias entre los grupos se tomó cuando la $p < 0.05$. Se realizó el análisis de la varianza (test de ANOVA) seguido del test de Tukey-Kramer cuando las varianzas eran homogéneas y Games-Howell cuando estas no eran homogéneas, y como prueba no paramétrica utilizamos Kruskal- Wallis cuando no se encontró normalidad en los datos.

Para evaluar el efecto antes y después de la intervención se utilizó T de student y prueba de signos cuando no se encontró normalidad en las muestras. Se usó el paquete estadístico IBM SPSS statistics 25.

5.5 Consideraciones éticas

Estos estudios se realizarán de acuerdo con las directrices que marca la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio⁶⁴.

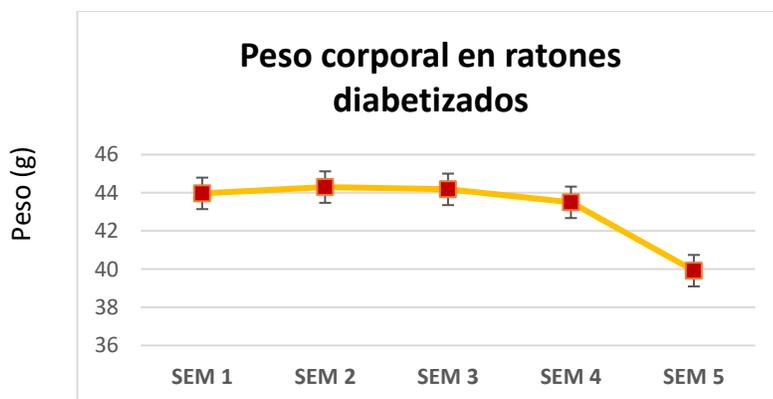
6. RESULTADOS

6.1 Modelo de diabetización con Estreptozotocina

Con la finalidad de estandarizar el modelo de diabetización, 20 ratones macho de la cepa CD1 fueron distribuidos en grupos de tres ratones. A cada uno se les administró 120 mg/kg de peso de STZ por vía subcutánea dividido en tres dosis diarias de 40 mg/kg, después de 10 días se tomó la glucosa en ayuno, dando por hecho la diabetización con cifras cercanas de 200 mg/dL, los resultados arrojaron que el 45% de los ratones sometidos al procedimiento (9 ratones) fueron diabetizados.

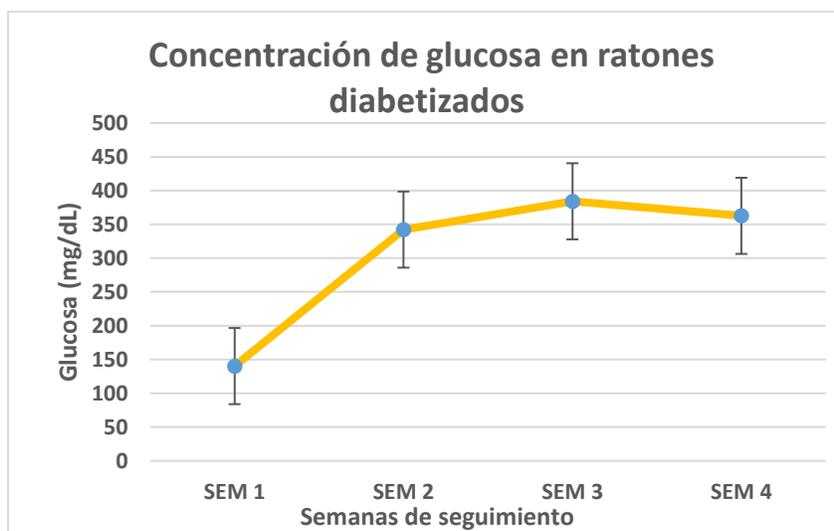
A todos los ratones diagnosticados se les hizo seguimiento de consumo de alimento, peso corporal y glucosa en ayuno de manera semanal.

Los animales diabetizados mostraron patrones de peso con tendencia a disminución comparando el peso inicial con el obtenido después de 5 semanas de seguimiento (43.97 ± 2.20 g y 39.92 ± 4 g respectivamente), cabe mencionar que la diabetización se llevó a cabo en la semana 2 del seguimiento. (Gráfica 1).



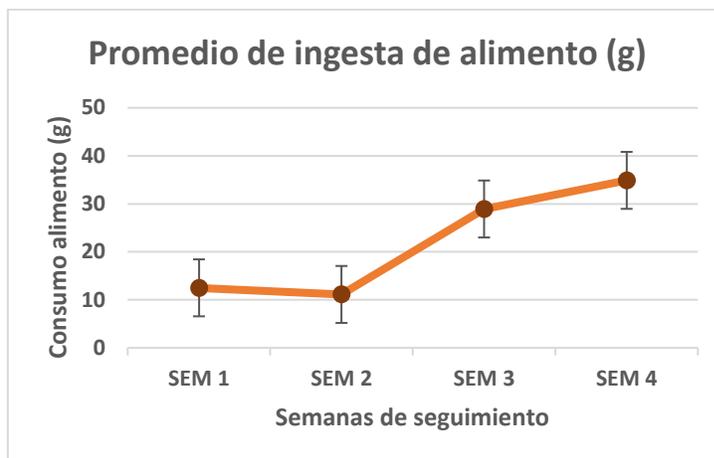
Gráfica 1. Promedio del peso corporal en ratones diabetizados con STZ. Seguimiento durante 5 semanas. N=9 ratones.

Los ratones mostraron al inicio de la intervención un promedio de glucosa regular para la cepa de la que se trata (140 ± 26.85 mg/dL). Posterior a la administración de STZ aumentó de manera considerable los niveles glucémicos a alrededor de 342.2 ± 112.13 mg/dL, con tendencia a aumentar en las siguientes mediciones que se programaron (Gráfica 2).



Gráfica 2. Concentración media de glucosa en ratones diabetizados con STZ, monitoreados durante 4 semanas. N=9

Para conocer el patrón de alimentación de los animales diabetizados a lo largo del experimento, se monitoreo el peso del alimento consumido de manera semanal y se encontró un aumento franco en el consumo. El promedio de consumo total inicial fue alrededor de 12.5 ± 1.3 g, resultando al final de las 4 semanas en casi el triple comparado con el inicial (34.8 ± 5.7 g) (Gráfica 3).



Gráfica 3. Media de ingesta de alimento total de ratones diabetizados durante el monitoreo de 4 semanas. N= 9 ratones.

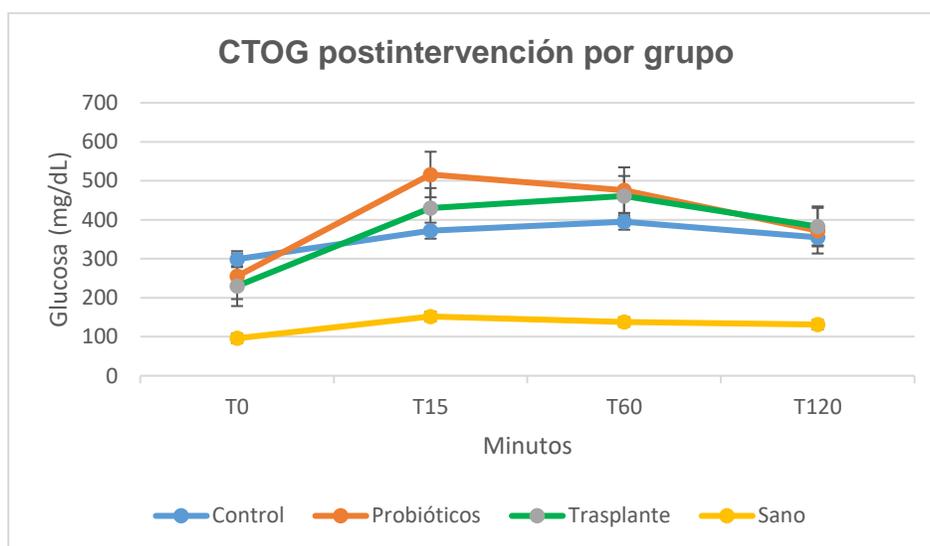
6.2 Intervención con probióticos y TMF en ratones diabetizados

Después de estandarizar el modelo de diabetización, se inició la intervención con probióticos y trasplante de microbiota fecal proveniente de ratón sano, a continuación se presentan los resultados de las mediciones que se realizaron en cuanto a glucosa, peso corporal, consumo de alimento y consumo de agua.

6.2.1 Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)

Al realizar la CTOG después de la intervención en los diferentes grupos experimentales, se observó que todos los grupos iniciaron esta con niveles parecidos oscilando entre 230 ± 90 mg/dL y 299 ± 99 mg/dL para el tiempo basal (T0), sin embargo, al minuto 15 (T15), el grupo al que se le administró probiótico tuvo una elevación mayor al resto de los grupos (516 ± 105 mg/dL) que fue el pico máximo alcanzado, manteniéndose siempre superior a los otros grupos hasta el minuto 60

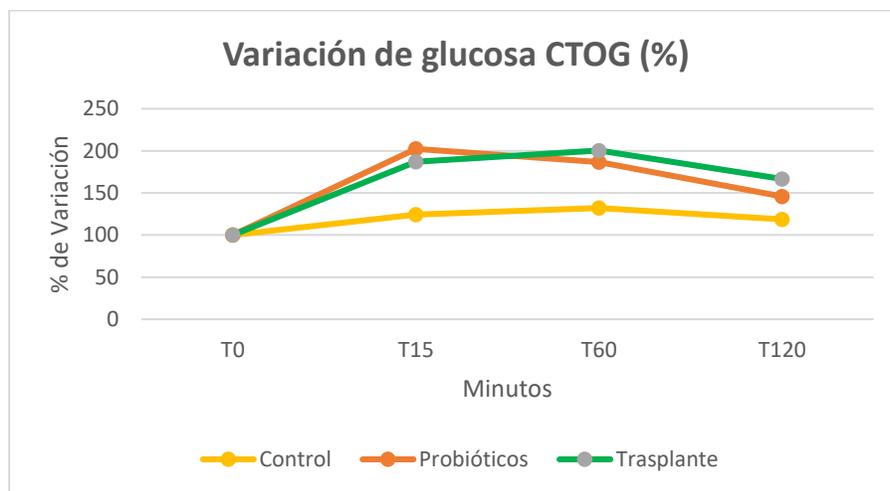
(T60) donde logra empatarse con el grupo trasplantado; para el minuto 120 (T120), los tres grupos parecen terminar en niveles parecidos (grupo control 355 ± 125 mg/dL, grupo probióticos 372 ± 131 mg/dL, grupo trasplante 383 ± 208 mg/dL) sin embargo cabe mencionar que el grupo control nunca tuvo elevaciones importantes respecto a su nivel inicial y que ningún grupo recuperó sus concentraciones basales al final de la prueba (Gráfica 4). Se puede observar el comportamiento de un grupo de ratones sanos, para apreciar las diferencias que se presentan en cuanto a los niveles comparándolos con ratones diabetizados.



Gráfica 4. CTOG en ratones diabetizados realizada en la semana 0 posterior al trasplante de microbiota sana y administración de probióticos. Los 3 grupos experimentales fueron dejados en ayuno de 4hr, se tomo la glucosa basal, posteriormente se administraron 80mg/kg de dextrosa anhidra y se volvió a determinar a los 15, 60 y 120 min. N=9 ratones

Al tomar en cuenta la variación en porcentaje, con base en la glucosa inicial (T0)(Gráfica 5), se observa con más claridad la elevación mas pronunciada en los grupos con probiótico y trasplantados en compararción con el grupo control cuyos

cambios fueron de máximo 132%, mientras que el grupo con probióticos alcanzó hasta un 202 % en el minuto 15 (T15), así pues, respecto al pico máximo alcanzado, fue el grupo con probióticos el que mejor se recuperó, pasando de un 202% en el minuto 15 a 146% en el minuto 120 (-56%).



Gráfica 5. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa en ratones diabetizados con STZ con base en el tiempo 0 de la CTOG. Los grupos experimentales fueron dejados en ayuno de 4hr, se tomó la glucosa basal y posteriormente se administraron 80mg/kg de glucosa anhidra y se volvió a determinar a los 15, 60 y 120 min. El porcentaje de variación para cada tiempo fue determinado tomando en cuenta la glucosa al T0 como el 100%. N= 9 ratones

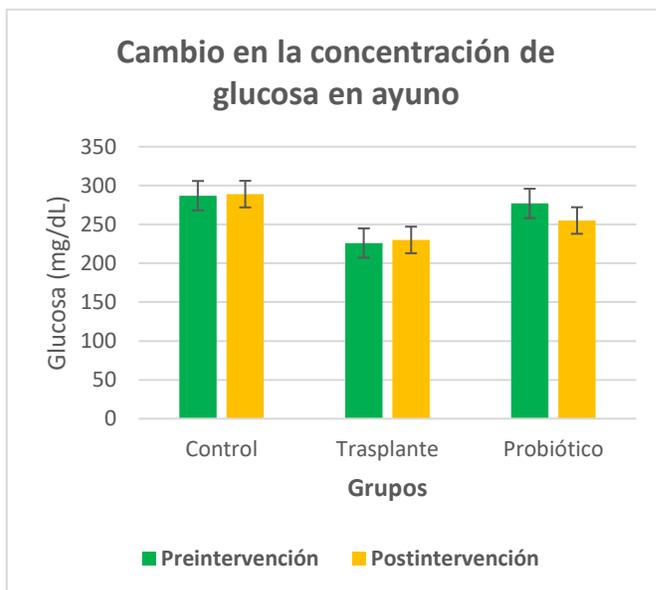
6.2.2 Glucosa en ayuno

Se observaron ligeros cambios en los niveles de glucosa en sangre antes y después de la intervención en los 3 grupos experimentales, el grupo control prácticamente mantuvo sus niveles de glucosa de 287 ± 125 mg/dL a 289 ± 114 mg/dL (p 0.536), el grupo que recibió trasplante de microbiota de ratón sano también mostró una tendencia modesta a mantenerse, pues sus niveles antes y después de la intervención pasaron de 226 ± 20 mg/dL a 230 ± 90 mg/dL (p 0.228), sin embargo en

el grupo que recibió probiótico se observó una ligera disminución que fue de 277 ± 78 mg/dL a 255 ± 58 mg/dL (p 0.440), sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de este cambio en ninguno de los 3 grupos (Figura 9).

Al hacer la comparación entre grupos, se observó que el grupo control presentó niveles en sangre mayores en la medición hecha antes de la intervención (287 ± 125 mg/dL), seguido del grupo probióticos (277 ± 78 mg/dL) y finalmente el grupo trasplantado inició con niveles más bajos (226 ± 20 mg/dL), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0.670).

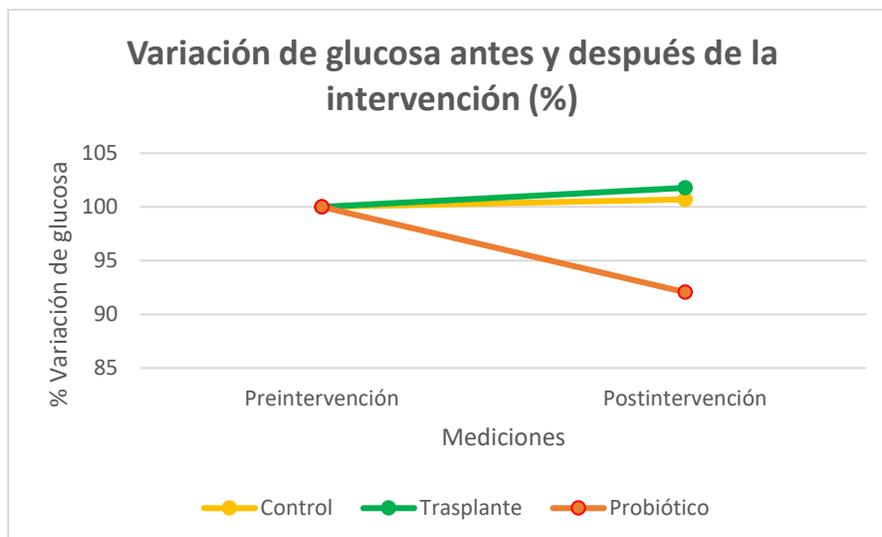
Al comparar los resultados de los grupos después de la intervención, se encontró que el grupo control presentó niveles más elevados, seguido del grupo con probiótico y finalmente el grupo trasplantado fue el que menos nivel de glucosa presentó (289 ± 114 mg/dL, 255 ± 58 mg/dL y 230 ± 90 mg/dL respectivamente), sin embargo, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0.737) (Figura 9).



Concentración de glucosa (mg/dL)			
	Control	Trasplante	Probiótico
Preintervención	287±125	226±20	277±78
Postintervención	289±114	230±90	255±58
Valor p	0.536	0.228	0.440

Figura 9. Cambio en la concentración de glucosa en ayuno de ratones diabetizados antes y después de la intervención con probiótico y trasplante de microbiota sana. La medición preintervención se realizó en la semana 4, después de que el modelo de diabetizó y justo antes de iniciar la intervención, la medición postintervención se realizó en la semana 9 después de la intervención (la administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). El impacto de la intervención se calculó con la prueba T de student y ANOVA para ver diferencias entre grupos. * $p < 0.05$. N=9

Al graficar estos datos en porcentaje de variación con base en la medición inicial versus final, se observa la tendencia tanto del grupo control como trasplante a aumentar la glucosa posterior a la intervención, mientras que el grupo con probiótico tiende a disminuirla, pero como se mencionó anteriormente no se encontró diferencia estadísticamente significativa en esta tendencia (Gráfica 6).



Gráfica 6. Porcentaje de variación de la concentración de glucosa en ayuno de ratones diabetizados entre las mediciones antes y después de la administración de probióticos y trasplante de microbiota sana, la medición preintervención se realizó en la semana 4, la medición postintervención se realizó en la semana 9. El porcentaje de variación fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. N=9 ratones.

6.2.3 Evaluación del peso de los ratones

Las primeras 4 semanas del experimento estuvieron enfocadas a la diabetización de los ratones, una vez conseguido esto, se dio seguimiento al peso corporal, en el cual se observaron cambios en los 3 grupos después de la intervención con probióticos y TMF, el grupo control mostró un aumento sostenido desde la semana 4 hasta la semana 10 de 45.2 ± 1.8 g a 46.2 ± 0.2 g, al igual que el grupo con trasplante cuyo peso aumentó de 46.4 ± 4.2 g a 48 ± 4.5 g, en cambio el grupo con probiótico tuvo una tendencia a disminuir para la semana 7 (40.4 ± 2.7 g a 39.4 ± 1.2 g) y posteriormente aumentó a 41 ± 2.6 g, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las mediciones tomadas durante las 10 semanas de seguimiento (Figura 10).

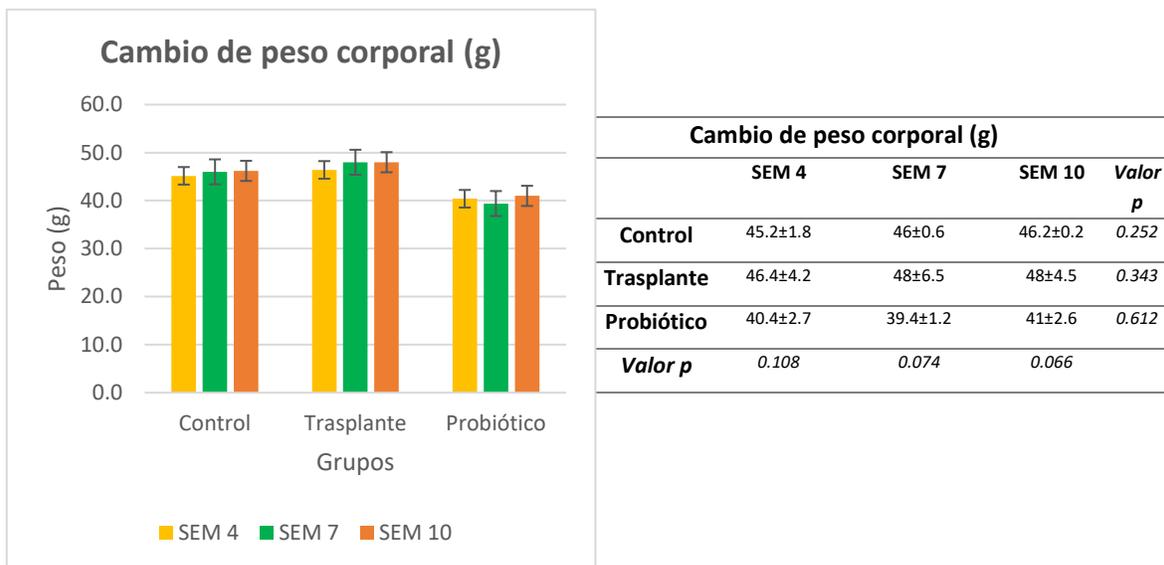
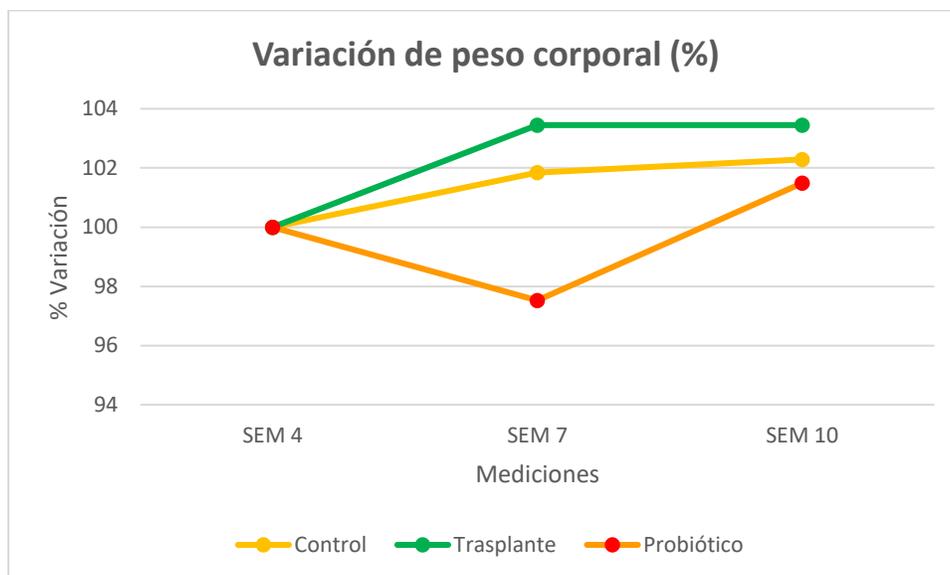


Figura 10. Cambio en el peso corporal de ratones diabetizados a lo largo de 10 semanas de seguimiento, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). Para medir el impacto de la intervención se calculó con la prueba T de student y para ver diferencias entre grupos ANOVA. * $p < 0.05$. N=9 ratones.

Al hacer la comparación entre grupos de intervención, se encontró en todas las semanas de seguimiento un patrón de peso en cada uno, el grupo control y trasplante siempre mantuvieron un peso mayor que el grupo al que se le administró probióticos (control=45.2±1.8 g, trasplante=46.4±4.2 g y probiótico=40.4±2.7 g) y este comportamiento de peso se mantuvo hasta el final, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de intervención (SEM 4 → p 0.108, SEM 7 → p 0.074 y SEM 10 → p 0.066, esto se muestra en la Figura 10.

En la Gráfica 7 se muestra el comportamiento de peso a lo largo del seguimiento en porcentaje de variación, mostrando que tanto el grupo control como trasplante

tendieron a incrementar su peso, mientras que el grupo con probióticos lo disminuyó en la semana 7 y posteriormente lo aumentó, pero como se mencionó anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se tomó como basal la medición que se realizó en la semana 4 antes de la intervención.



Gráfica 7. Porcentaje de variación de peso corporal en ratones diabéticos a lo largo de 10 semanas de seguimiento, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabietizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). El porcentaje de variación fue determinado tomando la semana 4 como 100%. N= 9 ratones.

6.2.4 Evaluación del consumo de alimento

Cuando se analizó el consumo de alimento, se observó que el grupo al que se le realizó trasplante lo disminuyó de 5.1 ± 0.4 g/día a 3.8 ± 0.3 g/día, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el transcurso de las semanas de seguimiento (p 0.250). En el grupo al que se le administró probióticos se notó una disminución en el consumo entre la semana 4 y 7 de 6.4 ± 1.1 g/día a

5.8±1.3 g/día, sin diferencias estadísticamente significativas (p 0.110), posteriormente entre la semana 7 y 10 que fue el lapso postintervención se notó un importante aumento en el consumo, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0.140). En el grupo control, hubo una disminución en el consumo de alimento, pero esta se presentó entre la semana 4 y 7 (9.3±3 g/día y 8.3±2.6 g/día respectivamente) con diferencias estadísticamente significativas (p 0.016), posterior a esto, se observó un aumento entre la semana 7 y 10 de 9±1.8 g/día, pero aquí ya no se encontró significancia estadística (p 0.916) (Figura 11).

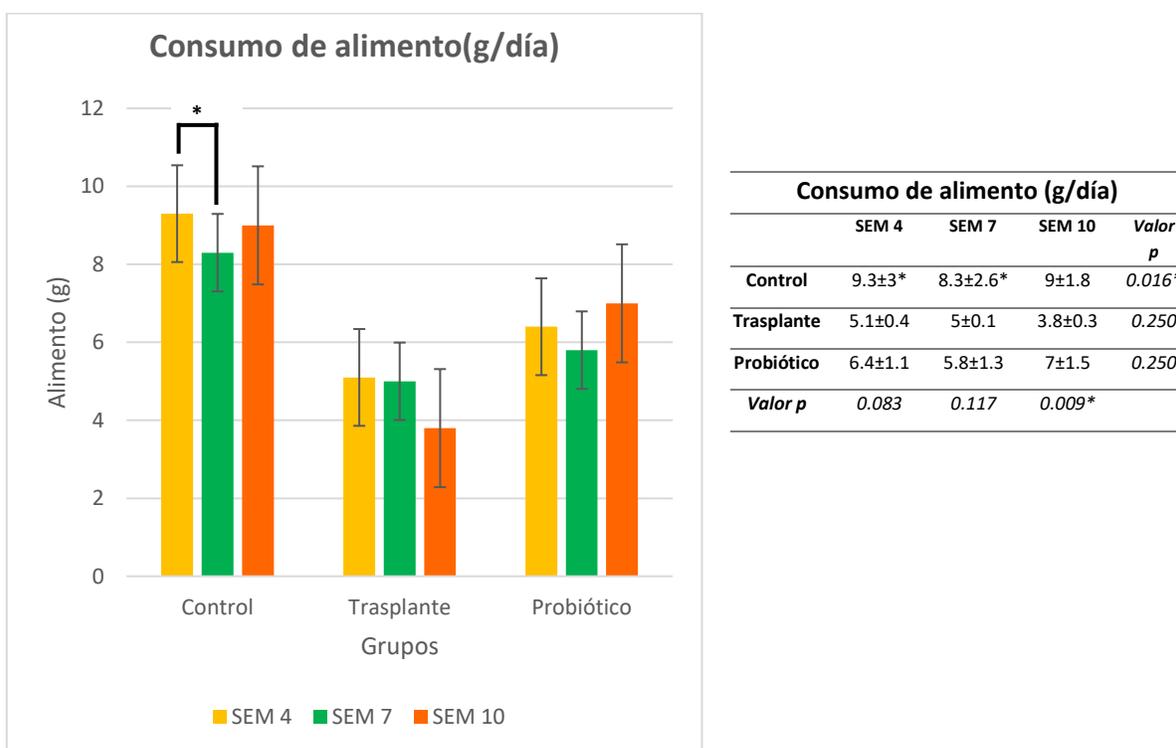
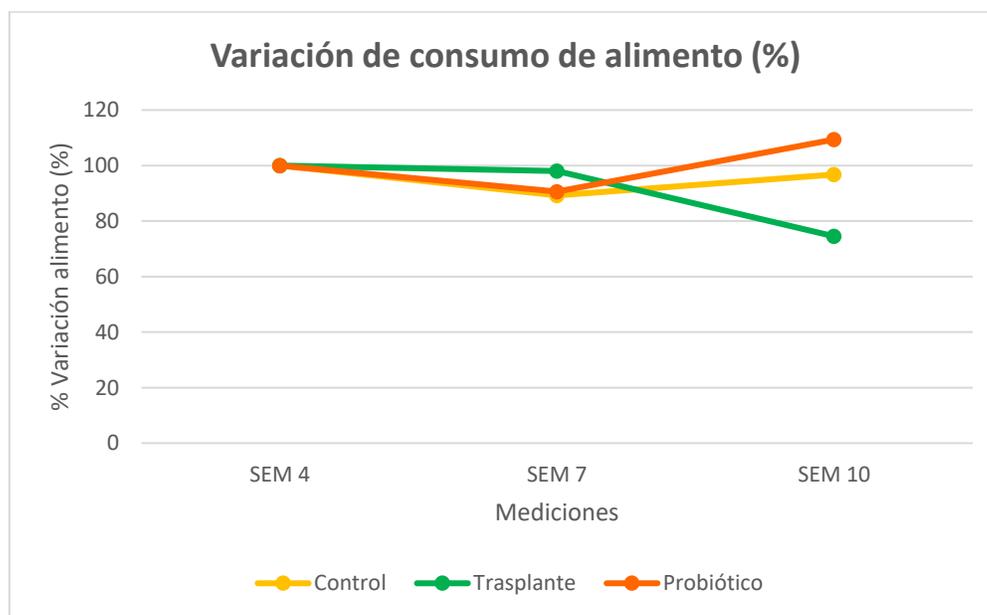


Figura 11. Cambio en el consumo de alimento de ratones diabetizados a lo largo de 10 semanas de seguimiento, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. Se muestra que tanto el grupo con probióticos como el grupo control mostraron cambios en el consumo de alimento. Para medir el

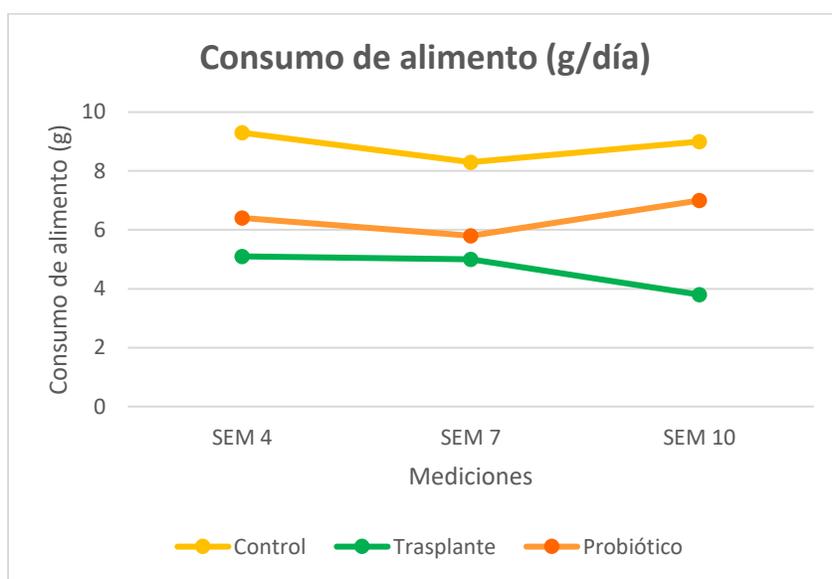
impacto de la intervención se calculó con la prueba *t* de student y para ver diferencias entre grupos ANOVA. * $p < 0.05$. N= 9 ratones.

En la Gráfica 8 se muestra el consumo de alimento a lo largo del seguimiento en porcentaje de variación, mostrando que el grupo control tuvo una tendencia a disminuir su consumo para la semana 7, posteriormente lo aumentó ligeramente de 89.2% a 96.8%, sin recuperar su nivel basal de antes de intervenir; el grupo con probiótico por su parte mostró una disminución para la semana 7 y después de esta, subió entre la semana 7 y 10 de 90.6% a 109.4%; mientras que el grupo trasplante siempre tuvo una tendencia a disminuir su consumo, llegando incluso a un 74.5% en la semana 10.



Gráfica 8. Porcentaje de variación en el consumo de alimento en ratones diabetizados, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). El porcentaje de variación fue determinado tomando la semana 4 como 100%. N=9 ratones.

Al comparar entre grupos experimentales se encontró que durante los 3 cortes de medición que se hicieron, se mantuvo un patrón de consumo, siendo siempre mayor en el grupo control, seguido del grupo de probiótico y al final el grupo que menos alimento consumió durante todo el experimento fueron los trasplantados, en estas tendencias los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron el grupo control y trasplante en la semana 10 ($p < 0.009$) (Gráfica 9).

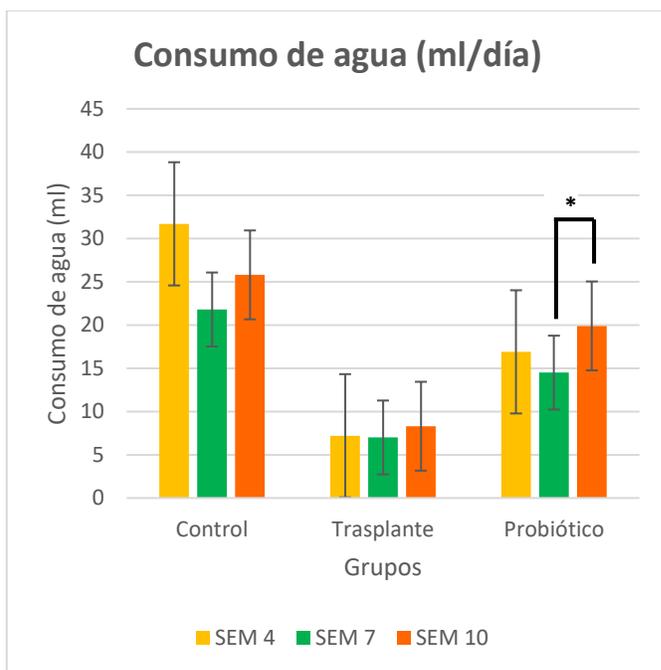


Gráfica 9. Cambio en el consumo de alimento de ratones diabetizados a lo largo de 10 semanas de seguimiento, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). Se muestra la diferencia entre grupos, con una tendencia tanto del grupo control como probiótico a aumentar su consumo, mientras el grupo trasplante mostro una disminución de este. $*p < 0.05$

6.2.5 Evaluación del consumo de agua

Al evaluar el consumo de agua en las diferentes semanas de seguimiento, se encontró que el grupo control tuvo una tendencia a disminuir su consumo entre la

semana 4 y 7 de 31.7 ± 24.5 ml/día a 21.8 ± 9 ml/día, posterior a esto presentó un ligero aumento en la semana 10 hasta llegar a 25.8 ± 15.6 ml/día, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; el grupo trasplante mostró el mismo comportamiento disminuyendo su consumo de 7.2 ± 0.5 ml/día a 7 ± 1.7 ml/día entre la semana 4 y 7, pero tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas; por su parte el grupo con probióticos, también disminuyó su consumo de agua entre la semana 4 y 7 de 16.9 ± 3.1 ml/día a 14.5 ± 10.4 ml/día sin significancia estadística, pero entre la semana 4 y 7 presentó un marcado aumento hasta llegar a un consumo de 19.9 ± 12.5 ml/día, esto con diferencias estadísticamente significativas ($p 0.039$) (Figura 12).

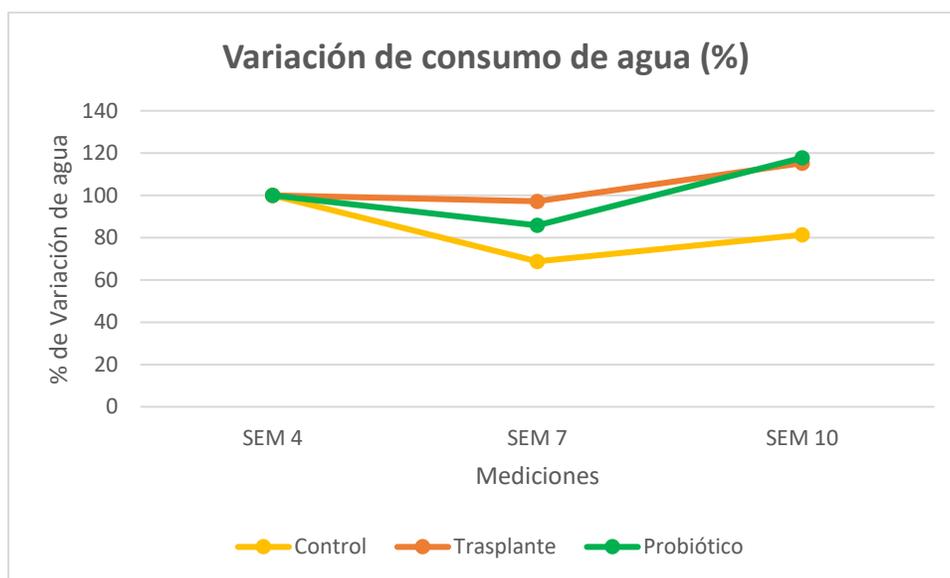


	SEM 4	SEM 7	SEM 10	Valor <i>p</i>
Control	31.7 ± 24.5	21.8 ± 9	25.8 ± 15.6	0.292
Trasplante	7.2 ± 0.5	7 ± 1.7	8.3 ± 2.3	1.000
Probiótico	16.9 ± 3.1	$14.5 \pm 10.4^*$	$19.9 \pm 12.5^*$	0.039*

Figura 12. Cambio en el consumo de agua de ratones diabetizados a lo largo de 10 semanas de seguimiento, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). Se muestra que el grupo con probióticos fue el único que tuvo diferencias estadísticamente significativas en su consumo con tendencia a incremento.

Para medir el impacto de la intervención se calculó con la prueba T de student y para ver diferencias entre grupos ANOVA. * $p < 0.05$.

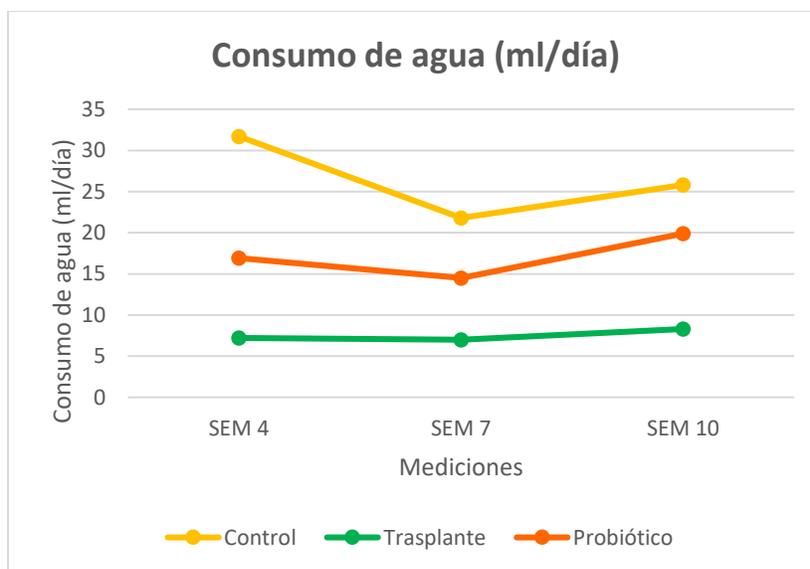
En la Gráfica 10 se muestra el consumo de alimento a lo largo del seguimiento en porcentaje de variación, mostrando que el grupo control tuvo una tendencia a disminuir su consumo para la semana 7 y luego lo aumentó ligeramente, pero no volvió a su consumo inicial de antes de la intervención, esto mismo sucedió con el grupo trasplante, sin embargo, en ningún grupo encontramos diferencias estadísticamente significativas; por su parte el grupo con probiótico mostró una disminución en su consumo en la semana 7 y un posterior aumento para la semana 10 que superó su consumo inicial antes de que comenzara la intervención llegando a un 117.8% con diferencias estadísticamente significativas, como se mencionó anteriormente.



Gráfica 10. Porcentaje de variación en el consumo de agua en ratones diabetizados, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las

semanas 5, 6, y 7). El porcentaje de variación fue determinado tomando la semana 4 como 100%. N= 9 ratones

En la Gráfica 11, se muestra que durante los 3 cortes de medición que se hicieron, se mantuvo un patrón de consumo, siendo siempre mayor en el grupo control con consumos hasta de 31.7 ± 24.5 ml/día, seguido del grupo probiótico con consumos que no superaron los 19.9 ± 12.5 ml/día, y al final el grupo que menos agua consumió durante todo el experimento fueron los trasplantados con microbiota de ratón sano que se mantuvieron en consumos alrededor de entre 7 ± 1.7 ml/día y 8.3 ± 2.3 ml/día, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos.



Gráfica 11. Cambio en el consumo de agua de ratones diabetizados durante 10 semanas de seguimiento, las primeras 4 semanas se utilizaron para diabetizar a los ratones, la medición de la semana 4 fue tomada antes de la intervención por lo cual se toma como basal, la de la semana 7 fue intraintervención y la de la semana 10 fue postintervención. (La administración de probióticos y trasplante se realizó en las semanas 5, 6, y 7). Se muestra que el grupo control fue el que más agua consumió, seguido del grupo con probióticos mientras que el grupo con trasplante consumió menos agua durante todo el seguimiento. N= 9 ratones

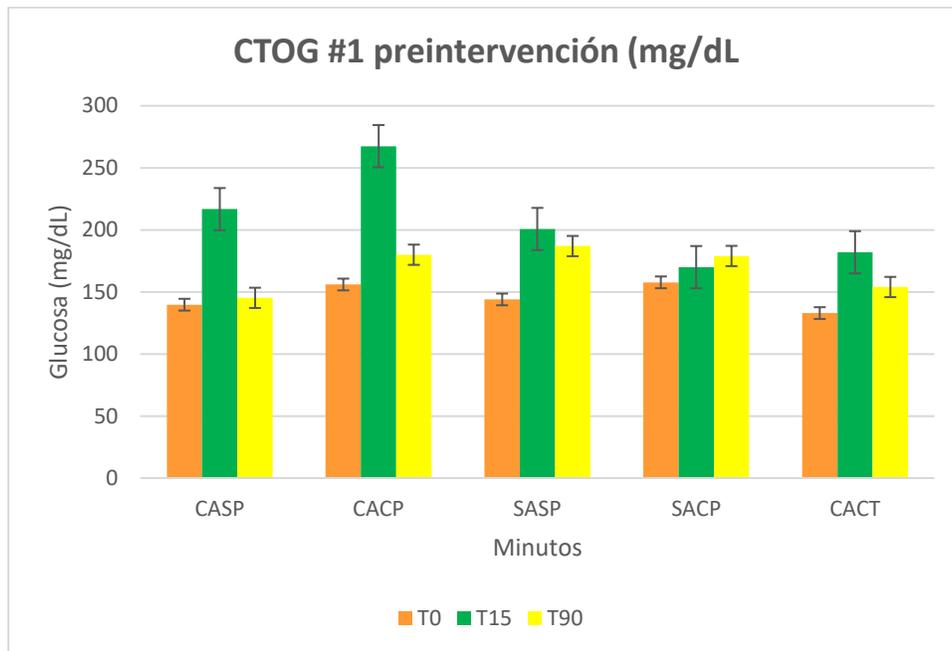
6.3 Intervención con probióticos y TMF en ratones sanos

Se realizó la intervención con probióticos y trasplante de microbiota fecal proveniente de ratón sano, a continuación se presentan los resultados de las mediciones que se realizaron en cuanto a glucosa, peso corporal, consumo de alimento y consumo de agua.

6.3.1 Curvas de Tolerancia a la Glucosa (CTOG) en ratones sanos

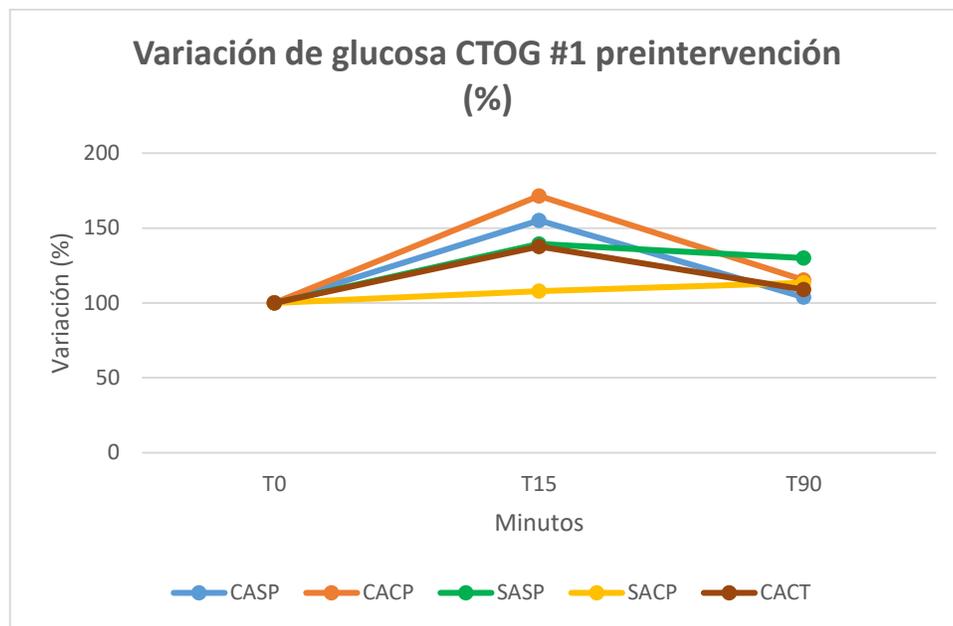
Se realizaron 3 CTOG, la primera antes de iniciar la intervención para tener una medición basal, la segunda inmediatamente después de que se terminó la administración de probióticos y trasplante en la semana 5, y se tomó para evaluar el impacto de la intervención a corto plazo; la tercera CTOG, 4 semanas después que se terminó la intervención (semana 9) para evaluar el impacto a largo plazo.

En la primer CTOG (Gráfica 12), se aprecia un comportamiento dentro de rangos normales en casi todos los grupos, iniciando con niveles en ayuno normales que oscilaban entre 140 ± 28.7 mg/dL y 158 ± 54.5 mg/dL, continuando con una elevación en el tiempo 15 y posteriormente un descenso para el minuto 90, a excepción del grupo SACP, el cual continuó elevándose incluso en la última medición de la curva. También se observa que el grupo CACP es el que presentó niveles mayores de glucemia en el tiempo 15 llegando a 268 ± 87.6 mg/dL.



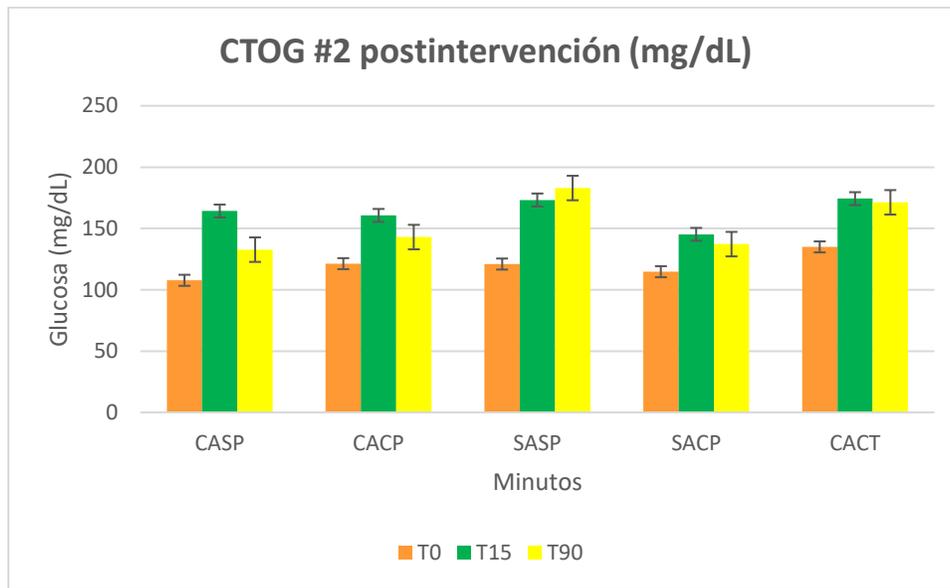
Gráfica 12. CTOG #1 en ratones sanos realizada antes de la intervención. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). T0, T15 y T90, se refieren a los minutos en que fue tomada la glucosa durante la curva. N=20 ratones.

Al tomar en cuenta la variación en %, con base en la glucosa inicial (tiempo 0) (Gráfica 13), se observa con más claridad la elevación mas pronunciada del grupo CACP alcanzando un 171%.



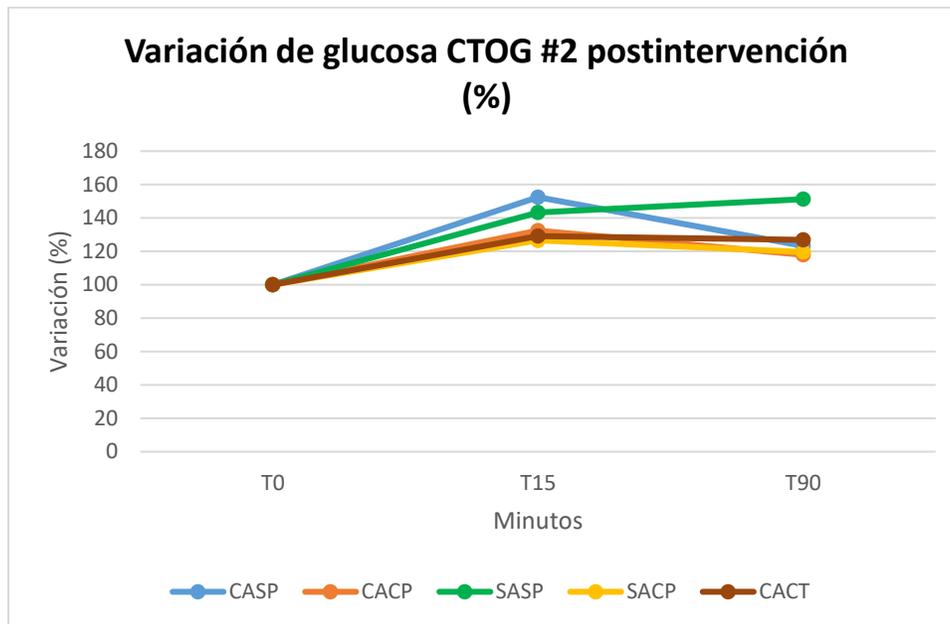
Gráfica 13. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa con base en el tiempo 0 de la CTOG realizada antes de la intervención. El porcentaje de variación para cada tiempo fue determinado tomando en cuenta la glucosa al T0 como el 100%. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). N= 20 ratones

En la segunda CTOG (Gráfica 14), realizada en la semana 5 y con la cual se quiso evaluar el impacto a corto plazo, se puede observar que el grupo CACP que en la primer CTOG presentó niveles muy elevados en el tiempo 15, ahora presentó niveles menores (161 ± 15.6 mg/dL), y que el grupo SACP mejoró sus niveles finales de la curva (T90), en comparación con la primer curva en la cual no logró recuperar sus niveles iniciales, en esta ocasión fue el grupo SASP el que en el minuto 90 continuó con niveles elevados de glucosa (183 ± 89.8 mg/dL).



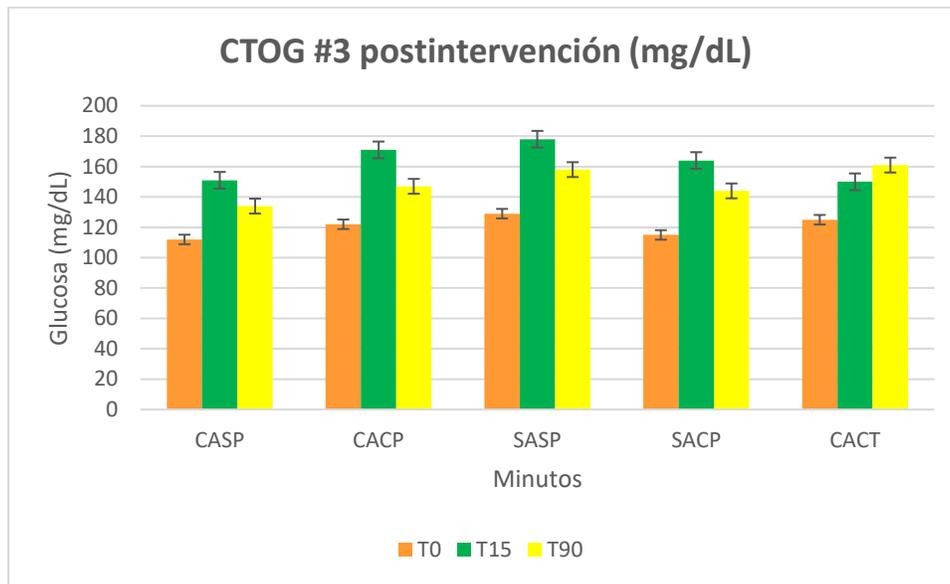
Gráfica 14. CTOG #2 realizada en ratones sanos a los cuales se les administró probióticos durante 21 días. La curva se realizó 3 días después de la última administración del probiótico. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). T0, T15 y T90, se refieren a los minutos en que fue tomada la glucosa durante la curva. N= 20 ratones.

Si se hace la variación en %, con base en la glucosa inicial (tiempo 0)(Gráfica 15), se puede apreciar que fue el grupo CASP el que ahora presentó niveles mayores en el tiempo 15 de la curva llegando a 152%, y que el grupo SASP aun en el tiempo 90 continuó elevándose su glucosa alcanzando un 151% que fue incluso mayor que el tiempo 15 del mismo grupo.



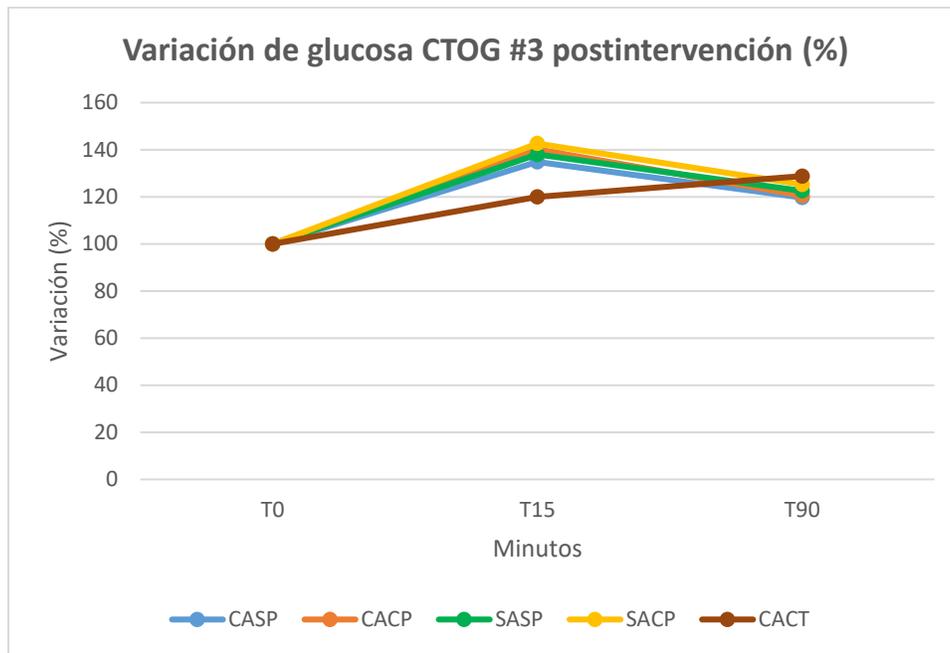
Gráfica 15. Porcentaje de variación en el nivel de glucosa en la CTOG realizada en la semana 5, 3 días después de la última administración del probiótico. El porcentaje de variación para cada tiempo fue determinado tomando en cuenta la glucosa al T0 como el 100%. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). N= 20 ratones.

En la tercer CTOG (Gráfica 16), realizada en la semana 9 (4 semanas después de que se terminó la administración de probiótico y el trasplante), se buscó evaluar el impacto de la intervención a largo plazo, lo que más llamó la atención en esta curva es que el grupo CACT presentó una importante elevación en sus niveles de glucosa en el minuto 90 (161 ± 106 mg/dL), superiores incluso al nivel alcanzado por el mismo en el minuto 15 (150 ± 65.7 mg/dL). El resto de grupos cursó con un comportamiento dentro de lo normal, aunque cabe mencionar que ninguno de los grupos recuperó sus niveles basales.



Gráfica 16. Tercer CTOG en ratones sanos realizada 4 semanas después de que terminó la aplicación de probiótico y trasplante (semana 9). CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). T0, T15 y T90, se refieren a los minutos en que fue tomada la glucosa durante la curva. N=20 ratones.

Cuando calculamos la variación con base en el tiempo basal de la curva (tiempo 0)(Gráfica 17), se puede observar con mayor claridad que casi todos los grupos presentan el comportamiento normal antes mencionado y que es solo el grupo CACT el que tiene una tendencia a aumentar sus concentraciones de glucosa en los dos tiempos posteriores a la carga de glucosa oral, sin presentar en ningún momento una recurecaión visible, aunque cabe mencionar que nunca tuvo una elevación importante en el tiempo 15, pues mientras los demas grupos se elevaban un 140% en promedio , el grupo CACT solo alcanzó un 120%.



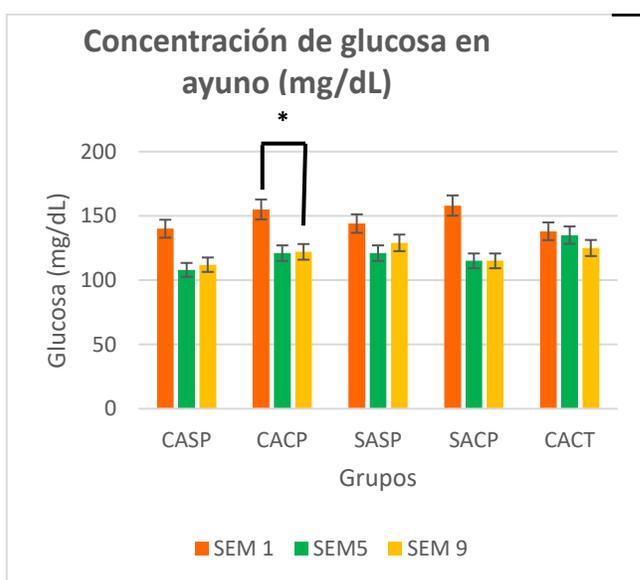
Gráfica 17. Porcentaje de variación de glucosa en la tercer CTOG realizada 4 semanas después de que terminó la aplicación de probiótico y trasplante (semana 9). El porcentaje de variación para cada tiempo fue determinado tomando en cuenta la glucosa al T0 como el 100%. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). N= 20 ratones.

6.3.2 Glucosa en ayuno de ratones sanos

Al evaluar y comparar las concentraciones de glucosa en ayuno de todos los grupos a lo largo de las 9 semanas de seguimiento, se encontraron algunos cambios que se presentan en la Figura 13. En el grupo CASP se observó una marcada disminución en las concentraciones pasando de 140 ± 28.7 mg/dL en la semana 1 a 112 ± 19 mg/dL en la semana 9, por su parte el grupo CACP presentó una disminución también de 155 ± 16.5 mg/dL a 122 ± 13.4 mg/dL, el grupo SASP tuvo una disminución entre la semana 1 y 5 pero para la semana 9 presentó un modesto aumento, El grupo SACP tuvo una disminución importante entre la semana 1 y 5,

pero posteriormente solo se mantuvo para la semana 9 (158 ± 54.5 mg/dL y 115 ± 15.2 mg/dL respectivamente), por su parte el grupo CACT tendió prácticamente a un mantenimiento entre la semana 1 y 5, pero para la semana 9 bajó ligeramente de 135 ± 26.7 mg/dL a 125 ± 58.6 mg/dL, cabe mencionar que solo fue en el grupo CACP que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p 0.005).

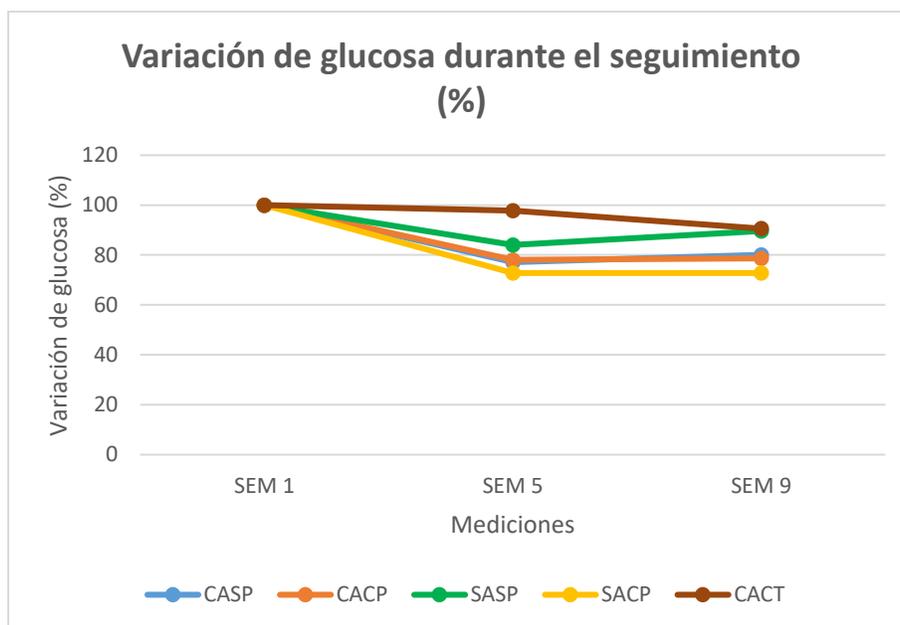
Al hacer la comparación entre grupos, se observó que el grupo CACP y SACP fueron los que presentaron niveles de glucosa más elevados en la medición preintervención (155 ± 16.5 mg/dL y 158 ± 54.5 mg/dL respectivamente), ya en la semana 5 todos grupos disminuyeron sus concentraciones de glucosa a excepción del grupo CACT que fue el único que se mantuvo, y en la semana 9 los grupos con nivel más bajo fueron CASP y SACP con niveles de 112 ± 19 mg/dL y 115 ± 15.2 mg/dL respectivamente, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos en ninguna de las 3 mediciones realizadas (Figura 13).



Concentración de glucosa en ayuno				
	SEM 1	SEM 5	SEM 9	Valor p
CASP	140±28.7	108±20.9	112±19	0.076
CACP	155±16.5	121±17.6	122±13.4	0.005*
SASP	144±19.1	121±32.8	129±10.1	0.625
SACP	158±54.5	115±14.1	115±15.2	0.190
CACT	138±17.6	135±26.7	125±58.6	0.649
Valor p	0.888	0.653	0.895	

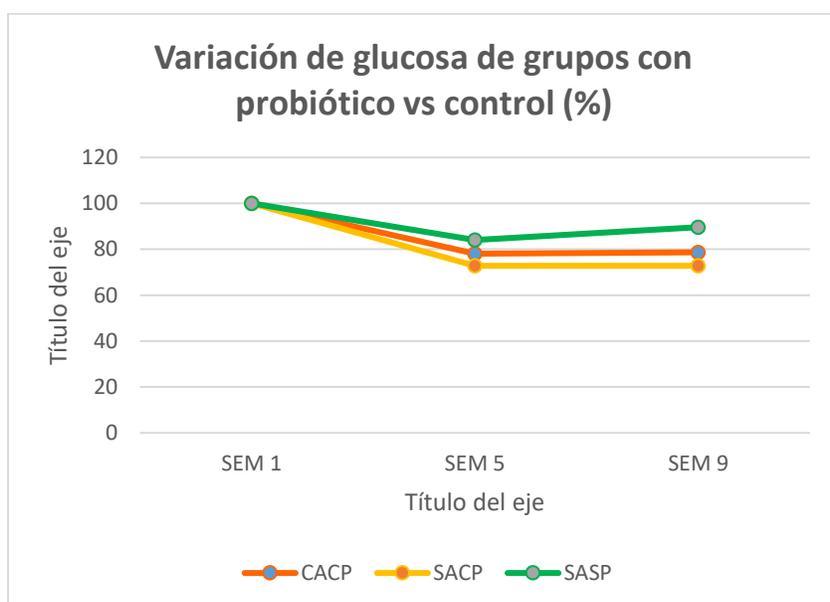
Figura 13. Cambio en la concentración de glucosa a lo largo del seguimiento, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. La administración de probiótico y trasplante se realizó en las semanas 2,3 y 4. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). Para medir el impacto de la intervención se calculó con la prueba T de student y para ver diferencias entre grupos ANOVA. * $p < 0.05$.

Al graficar estos datos en porcentaje de variación con base en la medición inicial (Semana 1), se observa de manera más clara la tendencia de casi todos los grupos a bajar sus niveles de glucosa en la semana 5, y después de esto parecen mantenerse, y solo es el grupo CACT el parece mantenerse en sus niveles en todas las mediciones (Gráfica 18).



Gráfica 18. Porcentaje de variación de la concentración de glucosa en los ratones de las 3 mediciones realizadas, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. El porcentaje fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante).

Si evaluamos el porcentaje de variación solo de los grupos a los que se les administró probióticos versus el grupo control (Gráfica 19), se observa que los grupos a los que se les administró probiótico ya sea con o sin antibiótico (CACP y SACP), presentaron una mayor disminución de la glucosa a lo largo del seguimiento, en cambio en el grupo control (SASP), al que no se administró nada, esta disminución fue mínima.



Gráfica 19. Porcentaje de variación de la concentración de glucosa en ratones sanos de las 3 mediciones realizadas, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. El porcentaje fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico). N=12 ratones.

6.3.3 Evaluación del peso corporal de ratones sanos

Se observaron cambios en el peso corporal después de la intervención en algunos grupos de intervención, en los que se encontró una tendencia a bajar en la semana

5 inmediatamente después de que se terminó la administración fueron CASP, CACP y SACP, mientras que los grupos SASP y CACT aumentaron ligeramente su peso, aunque solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo CASP (p 0.032). Al evaluar el peso de los grupos en la semana 9, lo que se encontró es que aquellos que habían disminuido su peso, lo aumentaron hasta recuperar el peso inicial, incluso CACP y SACP rebasaron por mucho su peso inicial (48.5 ± 4 g y 49.6 ± 3.5 g respectivamente). Por su parte los grupos SASP y CACT tuvieron un comportamiento muy parecido al presentar una tendencia a aumentar su peso durante todas las mediciones realizadas, cabe mencionar que solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la semana 5 y 9 en el grupo SACP (p 0.047) (Figura 14).

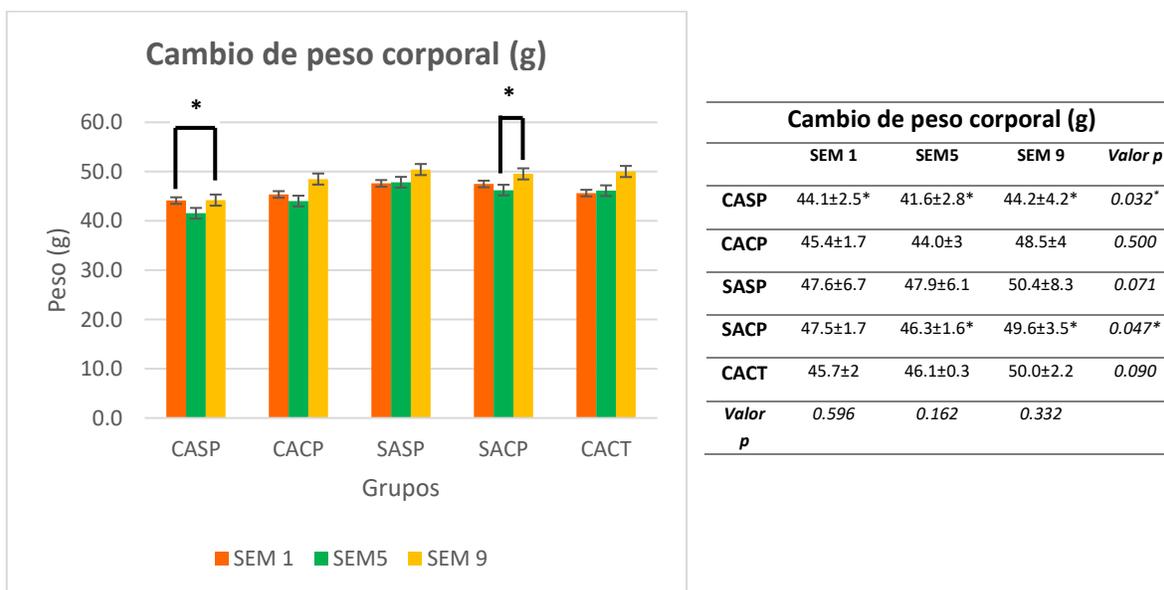
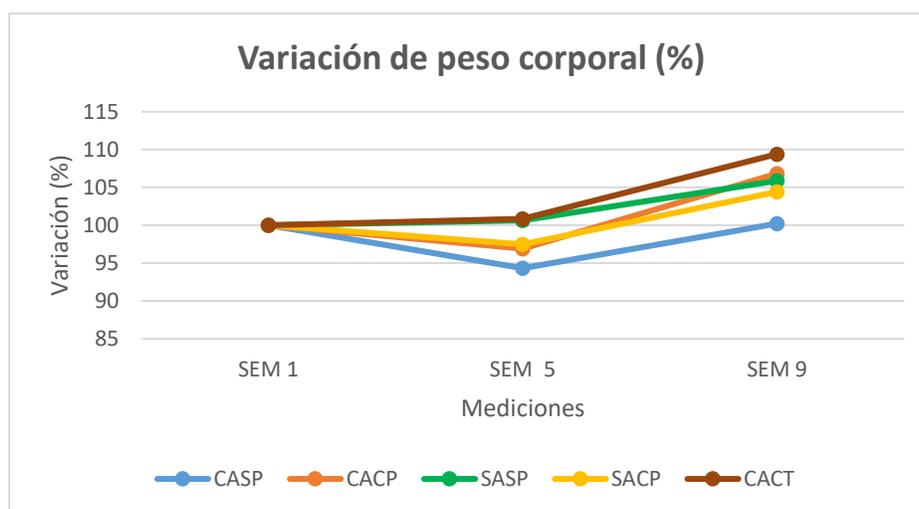


Figura 14. Cambio en el peso corporal, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. La administración de probiótico y trasplante se realizó en las semanas 2,3 y 4. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin

antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). Para medir el impacto de la intervención se calculó con la prueba T de student y para ver diferencias entre grupos ANOVA. *p< 0.05. N= 20 ratones.

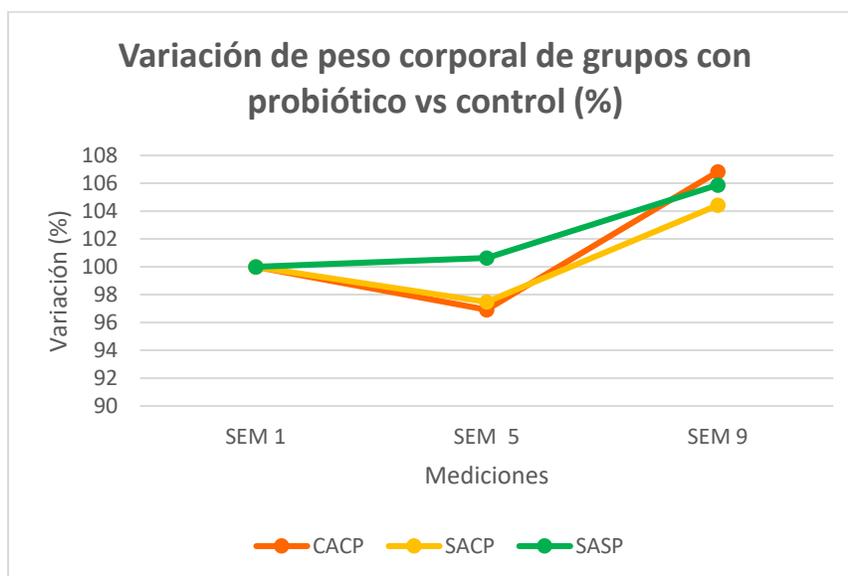
Al hacer la comparación entre grupos, se encontró que el grupo que menos peso presentó durante todo el seguimiento fue CASP pues no sobrepasó los 44.2 ± 4.2 g, mientras que el grupo que mayor peso presentó fue el grupo control (SASP) alcanzando un promedio de peso en la semana 9 de 50.4 ± 8.3 gr a este siguió el grupo CACT con un peso de 50.0 ± 2.2 g en la semana 9, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en ningún momento de las mediciones (Figura 14).

En la Gráfica 20 se muestra el comportamiento de peso a lo largo del seguimiento en porcentaje de variación, mostrando de manera más clara que el grupo que menos variación en su peso tuvo fue el grupo CASP y quedando al final prácticamente igual que su peso inicial, mientras que el más variación presentó alcanzando su máximo en la semana 9 fue el grupo con trasplante (CACT).



Gráfica 20. Porcentaje de variación de peso corporal, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. El porcentaje fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). N= 20 ratones. N=20 ratones.

Si evaluamos el porcentaje de variación solo de los grupos a los que se les administró probióticos (SACP, CACP) versus el grupo control (SASP) (Gráfica 21), se observa que los grupos a los que recibieron probiótico, disminuyeron su peso para semana 5, y para la semana 9 incluso rebasaron el inicial alcanzando un 107% y 104% respectivamente, mientras que se ve de manera clara que el grupo control en todo momento tuvo una tendencia a aumentar su peso corporal.



Gráfica 21. Porcentaje de variación de peso corporal, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. El porcentaje fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico). N= 12 ratones.

6.3.4 Consumo de alimento en ratones sanos

Cuando se analizó el consumo de alimento, se observó que todos los grupos lo disminuyeron entre la semana 1 y 5, siendo el que menor cambio presentó CACT el cual disminuyó solo 0.2 g su consumo (de 5.4 ± 0.6 g/día a 5.2 ± 0.5 g/día), seguido de CASP que bajó de 4.3 ± 0 g/día a 4.0 ± 0 g/día, el resto de grupos tuvo una pérdida mayor, sin embargo en este lapso de tiempo estudiado solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo SACP (p 0.028). Por su parte, el cambio observado entre la semana 5 y 9 fue con tendencia ahora al aumento también en todos los grupos, y nuevamente el grupo que menos variación tuvo fue CACT y el grupo que mayor cambio presentó fue nuevamente SACP pasando de 4.5 ± 0.2 g/día a 5.2 ± 0.8 g/día, pero en este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 15).

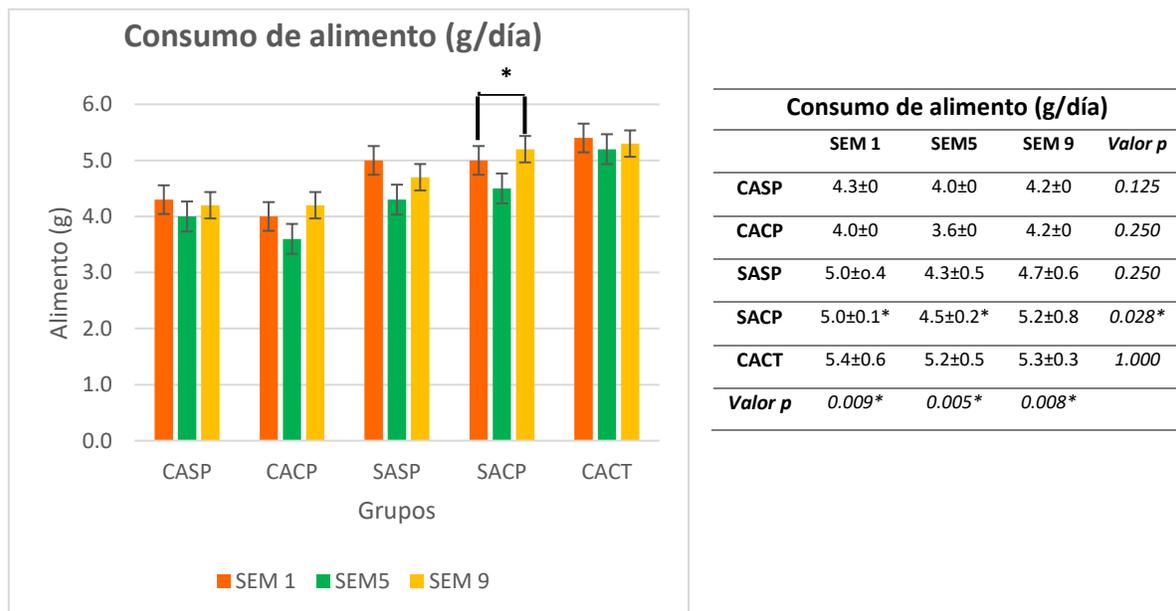
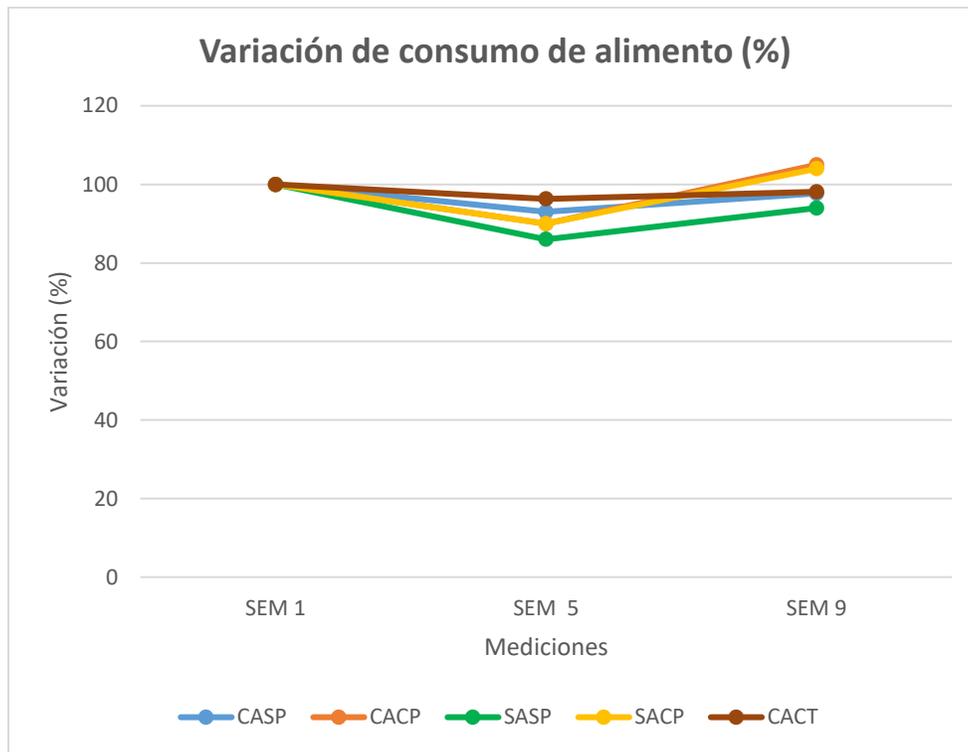


Figura 15. Cambio en el consumo de alimento de ratones sanos, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. La administración de probiótico y trasplante se realizó en las semanas 2,3 y 4. CASP (grupo con

antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante). * $p < 0.05$. N= 20 ratones.

Al comparar entre grupos experimentales se encontró que durante los 3 cortes de medición que se hicieron, se mantuvo un patrón de consumo, siendo siempre este mayor en los grupos SASP, SACP y CACT superando incluso los 5 g/día, mientras que los otros grupos (CASP CACP) nunca superaron los 4.3 g/día, es importante mencionar que en los tres puntos de medición siempre se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

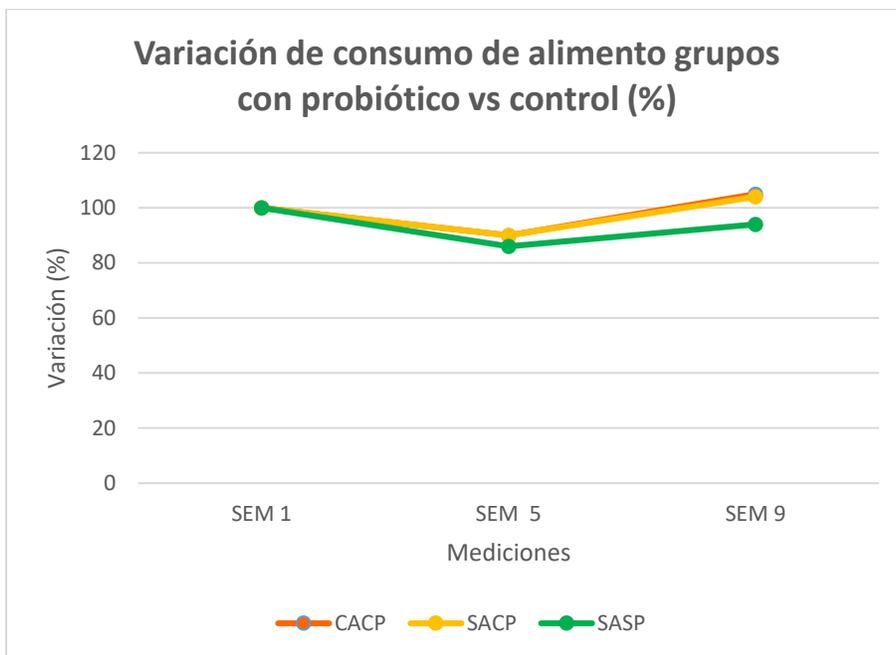
En la Gráfica 22 se muestra el consumo de alimento a lo largo del seguimiento en porcentaje de variación, y se puede apreciar con claridad como el grupo CACP y SACP, tuvieron prácticamente el mismo comportamiento y variación en las 3 mediciones hechas y fueron los únicos que en la semana 9 incluso rebasaron el peso con el que iniciaron la intervención. El grupo que más variación tuvo respecto al consumo de la semana 1 fue el SASP llegando en la semana 5 hasta 86%.



Gráfica 22. Porcentaje de variación en el consumo de alimento de ratones sanos, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. El porcentaje fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. CASP (grupo con antibiótico sin probiótico), CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico), CACT (grupo con antibiótico con trasplante).

En la Gráfica 23 se muestra el consumo de alimento de los grupos a los que se administró probiótico ya sea con o sin antibiótico y se compara con el grupo control (SASP), en esta se puede notar lo antes mencionado que independientemente de la administración de antibiótico, ambos grupos con probiótico presentan una disminución en su consumo en la semana 5 y un posterior aumento para la semana 9 incluso superando el consumo basal de la semana 1, mientras que el grupo control

(SASP) disminuyó su consumo de manera más pronunciada en la semana 5 y nunca recuperó su consumo basal en la semana 9.



Gráfica 23. Porcentaje de variación en el consumo de alimento de ratones sanos, la medición preintervención se realizó en la semana 1, la segunda medición se hizo en la semana 5 inmediatamente después de terminada la administración de probiótico y la última medición se tomó en la semana 9. El porcentaje fue determinado tomando la glucosa preintervención como el 100%. CACP (grupo con antibiótico con probiótico), SASP (grupo sin antibiótico sin probiótico), SACP (grupo sin antibiótico con probiótico).

7. DISCUSIÓN

La DM2 se caracteriza por hiperglucemia desde un fondo de resistencia a la insulina, cuyas consecuencias pueden llegar a causar complicaciones en los pacientes que la padecen. Existen algunas evidencias del impacto que tiene tanto el trasplante de microbiota fecal como la administración de probióticos en diferentes patologías de origen metabólico, tanto en humanos como en modelos experimentales. En el caso de la DMT2, la cual es una enfermedad de alto impacto en nuestra población, el

estudio de alternativas que permitan mejorar la salud en estos pacientes es de suma importancia. Sin embargo, el estudio en individuos diabéticos es difícil debido a la gran cantidad de factores que pueden influir en la microbiota intestinal, que como ya hemos descrito, puede verse alterada además de por la misma patología, por factores externos como la dieta, el uso de antibióticos, el consumo de agua clorada, así como factores genéticos propios de cada paciente. Por tal motivo, el uso de modelos animales, particularmente de DT2 en donde se presentan las mismas características que la DM2 en humanos, incluyendo polifagia, polidipsia, poliuria, pérdida de peso, deterioro orgánico, resistencia a la insulina e hiperglicemia, permiten la evaluación de la modificación de la microbiota nativa usando varias estrategias, una es el trasplante fecal y otra es la administración de probióticos, para su implementación como alternativa complementaria al tratamiento de estos pacientes.

Si bien, el uso de probióticos se encuentra asociado con un estado de bienestar en la salud de los individuos que los consumen, poco se sabe del potencial a nivel metabólico en pacientes con DM2, y siendo esta una enfermedad de mayor impacto en salud pública es importante el desarrollo de modelos animales que permitan la evaluación de distintas alternativas terapéuticas complementarias al tratamiento nutricional y farmacológico.

En el presente trabajo evaluamos la administración de probióticos de una formulación comercial compuesta por *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium longum* BB536, y el trasplante fecal de microbiota proveniente de

ratones sanos en un modelo de ratones diabetizados por la administración de estreptozotocina, un antibiótico el cual posee una acción citotóxica sobre las células beta del páncreas. Esta propiedad permite inducir diabetes en los ratones, en este caso una enfermedad no insulino dependiente, con signos y síntomas similares a los que ocurren en los pacientes humanos con DMT2, lo cual lo convierte en un modelo predictivo de lo que sucede en los pacientes diabéticos.

Los probióticos de ZirCombi fueron administrados en la dosis más alta posible en los ratones, siendo esto una limitante, pues probablemente no llegamos al número de bacterias viables en el intestino para generar un efecto mayor en el metabolismo de los carbohidratos. Cabe mencionar, que esta formulación es administrada normalmente en padecimientos gastrointestinales asociados con inflamación, colitis o enfermedad de intestino irritable, teniendo diferentes grados de éxito como coadyuvante en el tratamiento de este tipo de patologías, sin embargo, estas dos cepas en esta presentación no habían sido evaluadas en enfermedades metabólicas, por lo que los resultados aquí obtenidos servirán para valorar su implementación y/o recomendación para pacientes con DMT2.

Dentro de las dificultades que se presentaron durante el desarrollo de este proyecto, fue la variabilidad en la efectividad de la estreptozotocina, en donde con la dosis recomendada no se lograba la diabetización estable de los animales, en donde un porcentaje de los animales se recuperaban y tenían niveles de glucosa normales, por lo que se dificultó el continuar trabajando con esta metodología. Sin embargo, en los ratones que se lograron diabetizar de manera estable encontramos que existe una ligera tendencia a disminuir su nivel de glucosa basal, que aunque no fue

estadísticamente significativa, nos da el antecedente de que estos microorganismos pudiesen tener un efecto sobre la hiperglicemia y la resistencia de la insulina como lo reportado por Caifeng *et al*, 2016 quienes reportan que el agente probiótico que administraron tuvo un efecto modesto sobre el control glucémico, y al analizar la sensibilidad se encontró que este efecto fue mayor cuando se usaban productos multiespecie, como nuestro producto, mientras que los que tienen especies individuales mostraron un efecto menor⁶⁸. En el mismo estudio se observó que el impacto para reducir la glucosa en ayuno mejoró cuando los productos fueron tomados durante menos de 8 semanas, no así cuando el tratamiento se prolongó a más de 8 semanas ⁶⁸, pues su efecto disminuyó, nosotros administramos de manera diaria durante 3 semanas los probióticos, cumpliéndose esta condición, sin embargo, quizá requería prolongar un poco más la intervención, con dosis más altas.

Además, en otros estudios en animales diabetizados se han probado varias especies del género *Bifidobacterium* como *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve* y que muestran una mejora en la tolerancia a la glucosa, esto a su vez confirma que este género, ya sea habitando en el intestino humano o introducido como probiótico desempeña un papel protector en la DM2⁶⁹. Por otro lado, el género *Lactobacillus*, también ha mostrado beneficio en modelos murinos de diabetes inducida con estreptozotocina o alimentados con un dieta alta en grasas y sacarosa, los efectos observados son que mejora hiperglucemia, mejora la sensibilidad a la insulina aumentando el transportador GLUT4 en el músculo y disminuye también marcadores proinflamatorios como IL-6

y TNF-a, las cepas utilizadas son *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. sakei*, *L. rhamnosus*, y este último parece aumentar el nivel de adiponectina en la grasa epididimaria, mejorando así la sensibilización a la insulina, también se ha visto que aumenta la abundancia de *Bifidobacterium* en el ciego de ratas, así pues, algunos microbios pueden afectar la fisiología del huésped aumentando otros microorganismos benéficos o por alimentación cruzada^{69,70}.

Más importante aún, la mayoría de estudios sugiere que la combinación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* pueden funcionar de manera sinérgica, ambas producen hidrolasas de sales biliares, que convierten las sales biliares conjugadas primarias en ácidos biliares desconjugados secundarios, estos a su vez activan el receptor de membrana del ácido biliar (TGR5) para producir GLP-1, en general *Lactobacillus* es muy diverso y contiene el mayor número de OTU (Operational taxonomic unit) en el intestino humano entre las bacterias potencialmente probióticas, sus efectos en la DM2 parecen ser específicos de la especie o incluso de la cepa, lo que podría explicar por qué el análisis a nivel de género carece de consistencia entre los estudios que usan esta bacteria⁶⁹. Si bien nuestros resultados no son concluyentes, podemos sugerir que en nuestro modelo presento limitantes en cuanto al tiempo y el número de ratones diabéticos tratados, y que muy probablemente esta combinación de probióticos pueden tener un efecto benéfico en la resistencia a la insulina y por lo tanto en la hiperglicemia de los ratones enfermos, además de que existen indicios como los que reporta Kecheng *et al.*, 2017 en un metaanálisis en humanos donde se buscaba evaluar el impacto de probióticos en los niveles de glucosa y otros parámetros metabólicos de pacientes con DM2, en

donde se encontró que la suplementación redujo significativamente el nivel de glucosa y mejoró la resistencia a la insulina, sin embargo, concluyeron que debido a un alto nivel de heterogeneidad de sus resultados, se necesitan más ensayos clínicos aleatorizados con poblaciones más grandes para confirmar dichos resultados⁶⁶. Kasinska, *et al*, 2015, en un metaanálisis también encontró un efecto significativo de los probióticos, pero solo en la reducción principalmente de HbA1c (Hemoglobina glicosilada), no así sobre la glucosa en ayunas, insulina y otros parámetros al igual que nuestro estudio⁶⁷, por lo que no se descarta en futuros estudios en ratones medir la HbA1c como un parámetro más.

Además de la intervención con probióticos, decidimos evaluar los efectos de trasplantar una microbiota sana en ratones diabetizados, pues en nuestro laboratorio existe el antecedente de que el trasplante de microbiota en ratones de la cepa C57 diabetizados presentaron una mejoría notable en la hiperglicemia y en algunos factores proinflamatorios, sin embargo, los resultados en esta cepa no fueron concluyentes debido a que son muy resistentes a la diabetización, por lo que en este proyecto se utilizaron ratones de la cepa CD1 más sensibles al efecto tóxico de la estreptozotocina. Para realizar el trasplante, a diferencia de la administración continua de probióticos, se realiza una sola dosis, mediante un procedimiento que requiere de la administración previa de antibióticos de amplio espectro que permiten disminuir considerablemente la microbiota nativa para favorecer la colonización de las bacterias trasplantadas.

En ratones diabetizados se observó que el grupo trasplantado con microbiota procedente de ratones sanos y ratones diabéticos sin trasplantar, utilizados como control, mantuvieron sus niveles elevados de glucosa, sin diferencias estadísticamente significativas, datos que difieren a los anteriormente encontrados en experimentos con la cepa C57. Existen reportes de que el TMF puede ser exitoso en humanos tuvo impacto en los niveles sanguíneos de glucosa, así como en la pérdida de peso, tanto así que se tuvo que reducir la dosis de medicamento hipoglucemiantes y este control se mantuvo durante largo tiempo, quizá por el impacto de la microbiota a través de las diferentes vías, que incluyen endotoxemia, inflamación, eje intestino-cerebro, aunque cabe mencionar que este fue estudio de un solo caso⁷¹, sin embargo, el TMF sigue siendo un tratamiento para enfermedades como la infección con *Clostridium difficile*, en donde se desarrolla una colitis pseudomembranosa que compromete la vida de los pacientes, limitando al TMF a enfermedades de origen infeccioso por la falta de evidencias de sus posibles beneficios en enfermedades metabólicas.

Debido a los distintos contratiempos que se tuvieron con los ratones diabetizados, se decidió utilizar ratones sanos para determinar el posible efecto protector de los probióticos en el desarrollo de DM2 o bien a la resistencia a la insulina, encontrando datos muy interesantes. En este grupo de ratones sanos, se decidió administrar antibiótico como un medio para generar disbiosis en la microbiota nativa y observar el efecto protector de los probióticos.

En el experimento de ratones sanos, todos los tratamientos causaron una disminución en el nivel glucémico basal, pero fue más evidente el grupo al que se administró únicamente antibiótico o solo probiótico, sin embargo, el grupo al que se administró antibiótico y probiótico (CACP) fue el único que tuvo diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que fue el probiótico el que logró este efecto, ya que en el grupo al que solo administró antibiótico no se encontraron estas diferencias estadísticamente significativas.

Algunos estudios han evaluado el impacto de diversos antibióticos en el nivel glucémico en modelos animales, pues se ha sugerido que, por ejemplo, las quinolonas pueden causar hipoglucemia al aumentar la liberación de insulina mediante el bloqueo de los canales de K⁺ sensibles al ATP en ratas sanas^{72,73}. El ciprofloxacino es de los más asociados a eventos hipoglucémicos en humanos, sin embargo, se ha visto que este efecto aparece cuando hay otros factores de riesgo como son la edad avanzada, alteración renal o uso concomitante de otros medicamentos como sulfonilureas⁷⁴, sin embargo, al ser uno de los antibióticos utilizados en nuestros tratamientos, no descartamos su posible efecto, aunque al parecer este es mínimo.

Por otro lado, la administración de probióticos ha mostrado mejora en la glucemia y otros parámetros como lo realizó en su estudio Lucas *et al*, 2020, que suplementó durante 38 días con *Hafnia alvei* HA4597 a ratones con hiperfagia inducida⁷⁷.

Sabemos que algunas bacterias son capaces de metabolizar polisacáridos complejos e indigeribles en AGCC, por ejemplo, el butirato, propionato y acetato, los dos primeros se unen a receptores acoplados a la proteína G GPR41 (FFAR3),

GPR43 (FFAR2) que se expresan principalmente en el epitelio colónico, tejido adiposo y células beta pancreáticas e inducen la secreción de la GLP1 de las células L que controla la liberación de insulina y el apetito^{70,75,78}.

También aumenta la secreción de péptido YY (PYY) que suprime la motilidad intestinal y retarda el tránsito, esto a su vez aumenta la absorción de nutrientes y su depósito, contribuyendo por lo tanto a trastornos metabólicos, entre ellos, la glucemia y el vaciado gástrico^{70,75}.

La activación de GPR43, conduce también a una reducción de la acumulación de grasa mediada por insulina, promoviendo la homeostasis de los lípidos y la glucosa, también es un potente inhibidor de la respuesta inflamatoria. En ratones, se ha descubierto que los probióticos que contienen ciertas cepas de *Lactobacillus* tienen un impacto antidiabético con una disminución concomitante de la endotoxemia^{75,78}.

También se ha visto que el propionato y butirato pueden promover la gluconeogénesis intestinal, a través de la transcripción de genes o a través de un circuito neuronal intestinal cerebral que conduce a una adiposidad reducida y un mejor control glucémico. El butirato se ha relacionado con mayor integridad de la pared intestinal, incluso su administración oral ha reducido los niveles de HbA1C, citoquinas proinflamatorias y LPS en ratones. Otro sustrato que se genera de la digestión de la fibra dietética es el succinato que se utiliza también para gluconeogénesis^{75,79}.

Una bacteria interesante que puede considerarse como probiótico para mejorar el control glucémico es *Akkermansia muciniphila*, que degrada la mucina pues se ha visto que previene muchos trastornos metabólicos inducidos por la dieta, incluida la

intolerancia a la glucosa, y sería el más adecuado para este tipo de estudios, no obstante, su cultivo y formulación como probiótico aún no se encuentra disponible⁷⁵. Todo lo anterior sugiere que, las intervenciones realizadas en este estudio presentan un efecto protector moderado ante la resistencia a la insulina en ratones sanos, y los probióticos utilizados en el presente protocolo no tuvieron efecto benéfico significativo en revertir a la DMT2.

Si bien el índice glicémico fue nuestro parámetro principal para determinar la mejoría de los ratones, se evaluaron otros parámetros como el porcentaje de ingesta diaria de alimento para determinar la polifagia, así como el peso semanal de los ratones en todas las condiciones. Aunado a lo anterior, se intentó medir el consumo de agua, pero esto se dificultó y no pudo concretarse ningún resultado.

La polifagia es una característica del modelo de ratón diabético y esto se debe a que, al haber una insuficiente utilización de glucosa por los tejidos, obliga al cuerpo a utilizar otros sustratos como son proteínas y lípidos, esto hace que aumente el apetito, y esto fue observado en el grupo de ratones diabetizados que siempre se mantuvo con niveles mucho mayores de consumo, en comparación con los otros grupos de intervención^{81,91}.

Al evaluar la ingesta de alimento en ratones sanos, se observó que todos los grupos la disminuyeron durante las semanas de administración, pero fue solo el grupo al que se administró únicamente probiótico (SACP) el que tuvo diferencias estadísticamente significativas, teniendo un efecto también el peso corporal, lo cual se discute a continuación.

En cuanto al peso observamos que, el grupo de ratones diabetizados tratados con los probióticos presentaron una tendencia a disminuir su peso, lo que es congruente con lo reportado anteriormente en ratones diabetizados y tratados con *L. rhamnosus*, donde redujeron su peso corporal, grasa epididimaria, leptina, actividad de lipasa, etc⁷⁰.

También coincide con lo encontrado por Cao *et al*, 2019, que evaluó el impacto de 3 cepas de probióticos en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasas, y se encontró que solo *Bacillus subtilis* causó una disminución en la ganancia de peso y glucosa sérica, las otras cepas (*B. licheniformis* y mezcla de *Bacillus*) redujeron el peso corporal de los ratones, pero no hubo cambio en el consumo de alimento, al final concluyó que los probióticos basados en *B. licheniformis* tienen un papel potencial en el tratamiento de diferentes trastornos metabólicos, en nuestro estudio, los cambios en peso observados con tendencia a disminuir en el grupo de ratones tratados con probióticos no fueron estadísticamente significativos⁸³

Por otro lado, el grupo de ratones sanos al que se le administró solo antibiótico (CASP) tuvo una tendencia a bajar su peso y luego recuperarlo al final de la intervención mientras que el grupo al que se administró solo probiótico (SACP) presentó un comportamiento similar, sin embargo, al final de la intervención supero de manera muy evidente su peso inicial, estos hallazgos si tuvieron diferencias estadísticamente significativas. Lo que nos lleva a sugerir, que el efecto en el control del peso corporal ejercido por los probióticos es únicamente durante la intervención y no un efecto a largo plazo.

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo refuerzan la importancia de la microbiota intestinal en el estado de salud en general, pero particularmente sobre el metabolismo, siendo el consumo de probióticos muy importante como medida preventiva en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la DMT2 y la obesidad, sin restarle importancia a la dieta saludable. En el modelo de ratón diabetizado es un modelo artificial

en el cual es posible evaluar diferentes tratamientos incluyendo los probióticos, que, en este caso en particular, no fue una formulación que presentara efectos muy evidentes, sin embargo, se pueden evaluar otras formulaciones, con otras dosis y tal vez un consumo más prolongado y quizá obtengamos una mayor mejoría. Además, este trabajo es el precedente para seguir estudiando alternativas que reviertan la disbiosis causada por la DMT2, y medir su impacto desde otros aspectos además del metabólico, como lo sería el sistema inmune, el cual también se ve afectado en pacientes diabéticos haciéndolos más susceptibles a infecciones y a complicaciones.

En cuanto al TMF, es muy probable que sea una alternativa adicional al tratamiento farmacológico y nutricional en el futuro, sin embargo, hoy en día se sabe de los riesgos que conlleva este tipo de intervenciones, la presencia de bacterias o virus patógenos lo hacen poco viable para el tratamiento de padecimientos metabólicos, no obstante, es un procedimiento que puede seguirse explorando en los modelos animales que permitan su evaluación y su viabilidad.

8. REFERENCIAS

1. Muñoz A, Diaz C, Tinahones F. Microbiota y diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinol Nutr.* 2016;63(10):560-568.
2. Bibiloni R, Membrez M, Jason C. Microbiota intestinal, obesidad y diabetes. *Ann Nestlé [Esp]* 2009;67:39-48.
3. Valero Y, Colina J, Herrera H. La microbiota intestinal y su rol en la diabetes. *An Venez Nutr* 2015; 28(2): 132-144.
4. Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2013; 47 (2): 421-34
5. Farías M, Silva C, Rozowski J. Microbiota Intestinal: Rol en obesidad. *Rev Chil Nutr* Vol. 38, No. 2, junio 2011.
6. Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota. *Diabetes Care*, oct 2010; Vol 33, No. 10. Pp 2277-2284
7. Zheng J, Xiao X, Zhang Q, et al. The placental microbiota is altered among subjects with gestational diabetes mellitus: a pilot study. *Front Physiol.*, 2017. Vol. 8:675. Pp 1-12.
8. Pelzer E, Gomez L, Barrett H, et al. Review: Maternal health and the placental microbiome. *Placenta* 54 (2017) 30-37.
9. Ottman N, Smidt H, de Vos W, Belzer C. The function of our microbiota, who is out there and what do they do. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Aug 9;2:104.

10. Monckeberg F, Corsini G. Microbiota intestinal, metabolismo y balance calórico. *Rev Chil Nutr* 2011, Vol. 38, No. 4, pp 477-481.
11. Garcia A, Rodriguez E, Aguilera L, Ferre C, López A. Trasplante de microbiota fecal *Gastroenterol Hepatol*. 2015; 38(2): 123-134.
12. Sánchez L, Castellano D, Jordán L, et al. Role of gut microbiota on cardio-metabolic parameters and immunity in coronary artery disease patients with and without type-2 diabetes mellitus. *Front Microbiol*, 2017; Vol 8:1936.
13. Moreno L, Hernández D, Silberman M, Capraro S, García J, Soto G, Sandoval E. La transición alimentaria y la doble carga de malnutrición: cambios en los patrones alimentarios de 1961 a 2009 en el contexto socioeconómico mexicano. *Archivos latinoamericanos de nutrición Año 2014*, Vol. 64, No. 4.
14. Pérez I. Diabetes mellitus. *Gac Med Mex*. 2016;152 Suppl 1:50-5.
15. Javeed N, Matveyenko A. Circadian etiology of type 2 diabetes mellitus. *Physiology (Bethesda)*. 2018 Mar 1; 33(2).
16. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014; 11(11): 1185-1200.
17. Murillo Sevillano, I. Diabetes mellitus. Algunas consideraciones necesarias. *MediSur*, 2018. 16(4), 614-617.
18. Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Nota Descriptiva No.312. OMS; 2012. [Consultado 2012 diciembre]. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.

19. Wild S, Roglic G, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27:1047-53.
20. Secretaria de salud Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000 *Salud Pública de México / vol.44, no.3, mayo-junio de 2002*
21. Mortality trends from diabetes mellitus in the seven socioeconomic regions of México, 2000-2007 *Rev Panam Salud Publica* 28(5), 2010 368-375
22. Villalpando, Salvador; La Cruz, Vanessa de; Rojas, Rosalba. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. *Salud Pública de México, [S.l.], v. 52, feb. 2010. ISSN 1606-7916*
23. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. [internet]. Libro de internet.2016. 66 p. Disponible en:
http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf
24. Olaiz-Fernández G, Rojas R, Aguilar-Salinas CA, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000 *Salud Publica Mex* 2007; 49 (S3)
25. Arredondo A, de Icaza E. Financial requirements for the treatment of diabetes in Latin America: implications for the health system and for patients in Mexico. *Diabetología*. 2009 Aug;52(8):1693-5. doi: 10.1007/s00125-009-1417-5.

26. Al-Goblan A, Al-Alfi M, Khan M. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and therapy*. 2014;7:587-591.
27. Yki-Jarvinen H. *Endocrinology and Diabetes*. Chapter Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. (2 edn). Oxford University Press. Jul 2011.
28. Hassan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* 2019 7:e7502.
29. Becattini S, Taur Y, Pamer E. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med* 2016 June; 22(6): 458-478.
30. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson J. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* (2010), 156, 3216-3223
31. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(1):44-52.
32. Harvey R, Champe P, Fisher B. *Microbiología*. 2da edición. Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
33. Arias J. Comparison between ciprofloxacin and antibiotics of other pharmacological groups for urinary tract infection treatment. *Revista Enfermería Actual*; edición semestral; No. 32, enero-junio, 2017.
34. Markowiak P, Slizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 2017, 9, 1021, pp 1-30.

35. Mahboobi S, Rahimi F, Jafarnejad S. Effects of prebiotic and synbiotic supplementation on glycaemia and lipid profile in type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Adv Pharm Bull*, 2018, 8(4), 565-574.
36. Manzano C, Estupiñán D, Poveda E. Efectos clínicos de los probióticos: que dice la evidencia. *Rev Chil Nutr* Vol. 39, No. 1, Marzo 2012.
37. Rosas M. Inmunonutrición, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Of* 2011; Vol 30, No. 4. Pp 54-59.
38. Oliveira G, González I. Actualización de probióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol Nutr*. 2016;63(9):482-494.
39. Olagnero G, Abad A, Bendersky S, et al. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta (B. Aires)*. 2007; 25(121):20-33.
40. Ramirez J, Rosas P, Velazquez M, et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* Año 2011, No. 7, abril-junio.
41. Cáceres P, Gotteland M. Alimentos probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables? *Rev Chil Nutr* Vol. 37, No.1. pp 97-109.
42. Mayorga L, Bustamante P, Gutiérrez A, et al. Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2009; Vol. 8, No. 3, pp 259-264.
43. Araya T, Yaeshima T, Ishibashi N, et al. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. 1995; Vol. 14 (2), 59-66.

44. Sheraji AI, Ismail A, Azlan A, Manap Y. Effects of Bifidobacterium longum BB536 on lipid profile and histopathological changes in hypercholesterolaemic rats. *Beneficial Microbes*, 2015; 6(5): 1-8.
45. Zhang Y, Li S, Gan R. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J. Mol. Sci.* 2015, 16, 7493-7519.
46. Espinoza R, Quera R, Meyer L, Rivera D. Trasplante de microbiota fecal: primer caso reportado en Chile y revisión de la literatura. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (4): 477-482.
47. Nuñez M, Cebada M, Contreras B. Trasplante de microbiota fecal: protocolo de estandarización para la selección de donadores. *An Med (Mex)* 2017; 62(2): 114-119.
48. Sbahi H, Di Palma J. Faecal microbiota transplantation: applications and limitations in treating gastrointestinal disorders. *BMJ Open Gastro* 2016; 3, pp 1-7.
49. Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO, Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therap Adv Gastroenterol.* 2016 Mar;9(2):229-39.
50. Gupta S, Allen E, Petrof E. Fecal microbiota transplantation: in perspectiva. *Terapia Adv Gastroenterol .* 2016 Mar; 9 (2): 229-239.
51. Ho H, Seok Y. Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc* 2016; 49: 257-265.
52. Choi HH, Cho YS. Fecal microbiota transplantation: current applications, effectiveness, and future perspectives. *Clin Esdosc.* 2016 May;49(3):257-65.

53. Arias J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. Nutr. Hosp. 2007 Vol. 22 No. 2 Madrid. Pp 160-168.
54. Navarro J, Ramírez R, Villagrán C. Samsara Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. Editorial, primera edición, octubre 2012.
55. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Centro Nacional de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Salud. Lima, 2008.
56. Figueroa C, Perez I, Mejia R. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas wistar hembra. Rev. MVZ Córdoba 18 (supl): 3699-3707, 2013.
57. Bequer L, Gómez T, Molina J, et al. Streptozotocin diabetogenic action in an experimental neonatal induction model. Biomedica. 2016; Vol. 36, No. 2. Bogotá. Pp 230-238.
58. Damasceno D, Netto A, Lessi I, et al. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanism and fetal outcomes. BioMed Research International. 2014; Vol. 2014.
59. Arora S, Kumar S, Vohora D. Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in Swiss albino mice. Global Journal of Pharmacology, 3(2): 81-84, 2009.
60. Islam M, Rupeshkumar, Bhaskar K. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of type 2 diabetes. International Journal of Pharmacological Research 2017; 7(1): 06-11.

61. Flemer B., Gaci N., Borrel G., Sanderson IR., Chaudhary pp., Tottey W., et al. (2017). Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rats. GUT MICROBES. 428-439 Becattini S, Taur Y, Pamer E.
62. Tannock G. Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. Gastrointestinal Microbiology. 1997. Series. 2 pp 187-215.
63. Hart M, Ericsson A, Lloyd K, et al. Development of outbred CD1 mouse colonies with distinct standardized gut microbiota profiles for use in complex microbiota targeted studies. Scientific Reports. (2018) 8:10107.
64. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO_1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
65. Anestesia en el animal de laboratorio. Parte 2. Research in surgery, Suplemento 5, julio 1990.
66. Kecheng Y, Linghai Z, Qian H, et al. Effect of probiotics on glucosa and lipid metabolism in type 2 Diabetes Mellitus: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. Med Sci Monit, 2017; 23: 3044.3053.
67. Kasinska M, Drzewoski J. Effectiveness of probiotics in type 2 diabetes: a meta-analysis. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej. 2015; 125 (11).
68. Caifeng L, Xin L, Hongqiu H, et al. Effect of probiotics on metabolic profiles in type 2 diabetes mellitus. Medicine open. (2016) 95:26.
69. Gurung M, Li Z, You H, Rodrigues R, Jump D, Morgun A. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. EBio Medicine 51 (2020) 102590.

70. Omotayo O, Sulaiman S, Wahab M. Modulation of gut microbiota in the management of metabolic disorders: the prospects and challenges. *Int J. Mol. Sci.* 2014, 15 4158-4188.
71. Ting-ting C, Xiao-long Y, Hui-juan Y, et al. Fecal microbiota transplantation relieve painful diabética neuropathy. *Medicine open*; 2018; 97:50.
72. Maeda N, Tamagawa T, Niki I, Miura H, Ozawa K, Watanabe G, Nonogaki K, Uemura K, Iguchi A. Increase in insulin release from rat pancreatic islets by quinolone antibiotics. *British Journal of Pharmacology* (1996) 117, 372-376.
73. Yasuvoshi I, Yasuaki S, Masato Y. Effects of gatifloxacin on serum glucosa concentration in normal and diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (3) 527-531 (2006).
74. Granados J, Ceballos M, Amariles P. Disglucemia asociada a fluoroquinolonas: una revisión estructurada. *Rev Med Chile* 2018; 146: 618-626.
75. Suez J, Shapiro H, Elinav E. Role of the microbiome in the normal and aberrant glycaemic response. *Clinical Nutrition Experimental* 6 (2016) 56-73.
76. Preidis G, Versalovic J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology* 2009;136; 2015-2031.
77. Lucas N, Legrand R, Deroissart C, Dominique M, Azhar S, Le Solliec MA, León F, Do Rego JC, Dechelotte P, Fetissoy S, Lambert G. *Hafnia alvei* HA4597 strain reduces food intake and body weight gain and improves body

- composition, glucosa, and lipid metabolism in a mouse modelo hyperphagic obesity. *Microorganism* 2020, 8, 35.
78. Pitocco D, Di Leo M, Tartaglione L, Leva F, PetruzzIELLO C, Saviano A, Pontecorvi A, Ojetti V. The role of gut microbiota in mediating obesity and diabetes mellitus. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020; 24: 1548-1562.
79. Gérard C, Vidal H. Impact of gut microbiota on host glycemic control. *Frontiers in Endocrinology*, january 2019, vol 10, article 29.
80. Heetae L, Youngjoo L, Jiyeon K, et al. Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes*, 2018, Vol 9, No 2, 155-165.
81. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an enviromental factor that regulates fat storage. *PNAS*, noviembre 2004. Vol 101, No. 44.
82. Leshem A, Horesh N, Elinav E. Fecal microbial transplantation and its potential application in cardiometabolic síndrome. *Frontiers in immunology*. June 2019, Vol 10.
83. Cao G, Dai B, Yan Y, et al. *Bacillus licheniformis*, a potential probiotic, inhibits obesity by modulating colonic microflora in C57BL/6J mice model. *Journal of Applied Microbiology*. 127, 880-888, 2019. ISSN 1364-5072.
84. Rodríguez J M, Sobrino O J, Marcos A, Collado M C, Pérez-Martínez G, Martínez-Cuesta M C, Peláez C, Requena T. ¿Existe una relación entre la microbiota intestinal, el consumo de probióticos y la modulación del peso corporal? *Nutr Hosp* Vol. 28 Suplemento 1. 2013.

85. Osorio C, Icochea E, Reyna P, John S. Comparación del rendimiento productivo de pollos de carne suplementados con un probiótico versus un antibiótico. *Rev Inv Vet Perú* 2010; (2): 219-222.
86. Souza L, Araujo D, Astolphi J, Dias L, Ambiel A, Santos L, Carmo Q, Silva P. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. *Colloquium Agrariae*, V. 6, N. 2, Jul-Dez. 2010, p. 33-39.
87. Liu T, Li Y, Zhao M, Mo Q, Feng F. Weight-reducing effect of *Lactobacillus Plantarum* ZJUFT17 isolated from sourdough ecosystem. *Nutrients* 2020, 12, 977.
88. Yanxiong H, Xuhong L, Xiaoyu W, Xifan W, Lingli C, Huiyuan G, Zhang M, Yixuan L. *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* A6 alleviates obesity associated with promoting mitochondrial biogenesis and function of adipose tissue in mice. *Molecules* 2020, 25, 1490.
89. Rout G, Jayanta K, Sushanto G, Yooheon P, Han. Seung S, Gitishree D. Benefaction of probiotics for human health: a review. *Journal of food and drug analysis* 26 (2018) 927-939.
90. Tinahones F. La importancia de la microbiota en la obesidad. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2017; 8 (Suppl).
91. Perez A, Berenguer M. Algunas consideraciones sobre la diabetes mellitus y su control en el nivel primario de salud. *Medisan* Vol. 19 No. 9 Santiago 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la **C. Zulema Bueno Hermosa**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022622, y que lleva por título **“Efecto de la administración de probióticos y del trasplante de microbiota fecal sobre el nivel glucémico en ratones diabéticos no insulino dependientes y sanos”** ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. María Alejandra Terrazas Meraz
Sinodal Presidente

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 25 días del mes de noviembre de 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ALEJANDRA TERRAZAS MERAZ | Fecha:2020-11-27 18:00:15 | Firmante

S/QPPB3Ygg+dQo36lQgCSWpIN1kJUwCQXK31WRjXjzpyzR5pxxVVChsTXBjVMb6qot7zy830NvfEIVDwDl1URCDK4aumWE/WN344QEwJKWIdJ3IB0JKues67aOUQTmrXI+aHuDJd8PspuuMMMG2kM1LPEZkevHX8ZerKLo9hsMZhuLqVGC7kSUAciCAgyWP0L26OQZZEO7hSH3/yK+w+A4KZ/PqkrjOYQzeMdtjKLmck06wvx0Wi4WiuuirQx8Rii6Sjo9B+S yOW0pCo5qagmcDy0W6QAsEBNfXkoRbGJgw43ibqHVv11amJ19hqVjYAwp/5PYCCDffPXp1dWqG6Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pAvG7i](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EyG1dyebyYnAqH93GC5ROftFa3CmPDMt>





MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Zulema Bueno Hermosa, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022622, y que lleva por título **“Efecto de la administración de probióticos y del trasplante de microbiota fecal sobre el nivel glucémico en ratones diabéticos no insulino dependientes y sanos”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra.Margarita de Lorena Ramos García
SINODAL SECRETARIO .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA | Fecha:2020-11-22 21:26:34 | Firmante

W/azPoUOBoxSJdm9JrBZdltvpeHdGztOqCvcSZAo/lBuVLZkuPIBhBsBWwJD0nl7/6dpVkoa2C3AsUytlq5SOC5YNf4+Z9GTJ5Hu6oeC6d9tqieOZ72tv22BSzu47Q8Kl6EzyB7tKLc
n2FuUlwYUrcoYY2NQ7bbkQzeCIFESxbOJz9jk1nkjxaLP/lut0cAXKETltHkQ+jNw1vAprXopKImuUCIbUUaLi38V1F19Q9XV/6BBzrekOtz+DqZSPiOeEkxRO+uvR5TweqcPirSKX
moSKPEB5G//rX/AehXadJSB+WnpqdS05v9mF2dIWpNVIbmbpzVupBldMsTvuEBw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Vm6GMw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IU96ZWhvhCNNwmsBPY9wg8BBF9mBFAI4>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Zulema Bueno Hermosa, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022622, y que lleva por título **“Efecto de la administración de probióticos y del trasplante de microbiota fecal sobre el nivel glucémico en ratones diabéticos no insulín dependientes y sanos”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dr. Juan José Acevedo Fernández
SINODAL VOCAL .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2020-11-21 09:11:05 | Firmante

cuZP45nyjfD48ZehRu7eBywg3GQwguQPym309FHmvUeVbcdE6ZlvpBV4VzE+ZpevS7abWgHFxHGzCdjR/QtzxyGUdg0HEu8JUdYcjNkFFriv4HPZLnMgbP2NnHowXg9uuKF05ERIch+xayRebe6OhmChPTvaVtWpx37QkpmSn4uWHaDdAo5Z6b1qZXilaEAce5ljBHzcBcanjHKpA2GoMPwGJ1EG7IB1quTf4Mw4YvIKQJyps3JpLzQ2J2J2XXbneMf/thF3Fu2CXVUfXi6+q+rzlzxN53MmqbzsnLG5Ov8+c+4sZZZEYUZjF+HOd+aj68iAjyYpcm4o2tI0QVHJmg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3NVUH4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/efZBgx4lx5U76M54kwzRxapeSbCnuX63>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Zulema Bueno Hermosa, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022622, y que lleva por título **“Efecto de la administración de probióticos y del trasplante de microbiota fecal sobre el nivel glucémico en ratones diabéticos no insulino dependientes y sanos”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. América Ivette Barrera Molina
SINODAL Suplente .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA | Fecha:2020-11-23 19:44:20 | Firmante

IJC15F+okIRp1t+KUFuYZEXCf8YN7JNFzJd+Nqw5N/wY11xtPuHjzDo9MJ1aQEMB15e2DXxRrNJMmCqFMWrx7nmFRa8znxR4BJegerYA4d2c65GY7KXiPnpvQzXohFmqINyEMrDkLnfLvITb9gJkM0hRQH1cgsxcN+/iz+kYvlgDYXd5o5IlyrCNRHgOK7ISnRoByyEvKuBn4HPxv5vo8Cebv04DupHEncFQ8xLNppqABHzKEJ+z1iBk/uVRDSJP3BRrX4k069p2Yms0r8qD2T6wN1zcBC0OZnQBL3Z9LPdAIGC99RlqXSWo5kjZbN0z1Q9aRh/MGtEhwG5/2wAg/Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



1PRiF9

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UQ2VmR8CDvbh2kBzLQb4xWJrT1QCoknE>



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por Zulema Bueno Hermosa, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022622, y que lleva por título **“Efecto de la administración de probióticos y del trasplante de microbiota fecal sobre el nivel glucémico en ratones diabéticos no insulino dependientes y sanos”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva darle a la presente.

Atentamente
Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez
SINODAL Suplente .



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2020-11-27 10:06:08 | Firmante

FIG4Gd/pUUDKSE5d1V5KkEHlyx3gfUmMXcYNJIPKJAYFcJuKF9T3Q/WTVcpxseGdp02YU33q+oA5yReDlvt698itDTrGgD/VISCCx+wuthgs3wT6feYQLwqlfT1kDfcxhPxi9MNxpRp2y+1DPnbDTJq1krl7wq8/bez/1jcdHJD9K0IO+VXh2IOOPAW8Pba0MDF9W+fgqXRxAZom+GSXyPJbBdC8KFBjQE42DFBZBS/caijjPNI91MsdizkfmoczJ86aMhPMbNL8Z7DlmakCJFTlagR1pUlepg4yiQobk2nWEY6J/gdVySkLahG8J6HiZB9MQ0Y6qiQd8EGIAZnxg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



x4imAS

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MOxd1FKVC2jhLNyS6E0ioMYW5TkJKS6>

