

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

Efecto intestinal y esplénico en *Mus musculus* con la administración oral de prebióticos y cepas probióticas

Área de Investigación:
Medicina – Ciencias Básicas

Autor:
Ms. Rodas Malca, Vladimir Alexander

Jurado Evaluador:

Presidente: Caballero Alvarado, José Antonio
Secretario: Córdova Paz Soldán, Ofelia Magdalena
Vocal: Zárate Arce, Marco Antonio

Asesora:
Mejía Delgado, Elva Manuela
Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0296-2695>

TRUJILLO – PERÚ

2021

Fecha de sustentación: 02/junio/2021

INDICE

	Resumen	IV
	Abstract	V
I	Introducción	1
II	Planteamiento de la investigación	5
	Enunciado del problema	5
	Justificación	5
	Objetivos	7
	Objetivo general	7
	Objetivos específicos	7
III	Metodología	9
	Diseño de estudio	
	Población, muestra y muestreo	9
	Operacionalización de variable	11
	Procedimientos y técnicas	15
	Análisis estadístico de datos	19
	Aspectos éticos	20
IV	Resultados	22
V	Discusión	31
VI	Conclusiones	34
VII	Recomendaciones	36
VIII	Referencia Bibliográficas	37

RESUMEN

Objetivos: Demostrar que la administración oral de prebióticos y cepas probióticas produce un efecto beneficioso inmuno-histopatológico intestinal y esplénico del *Mus musculus*.

Material y métodos: La población de estudio fueron *Mus musculus* (Ratones albinos) los que se les administró prebióticos o cepas probióticas, luego se analizaron las muestras a través de estudios histopatológicos de intestino y bazo de cada ratón, se realizaron las fijaciones y coloración de las muestras. El análisis estadístico se dio por la prueba T de Bonferroni; se usaron las pruebas de comparaciones múltiples en la variable de inflamación, el análisis de varianza Kruskal-Wallis fue usado para determinar la diferencia entre los grupos.

Resultados: El grupo que recibió 5 cepas probióticas y 1 prebiótico presentó una diferencia histológica significativa a comparaciones de los demás grupos: mayor número de placas de peyer y de proteínas como albúmina y globulinas ($p < 0.001$); al igual que mayor altura en las criptas y vellosidades del intestino delgado y grueso así como una mucosa más gruesa, presentando además una relación vellosidad/cripta que presentó diferencia significativa ($p < 0.001$).

Conclusiones: Las cepas Probióticas, producen cambios inmuno-histo Morfometricos, aumentando su actividad inmune que a su vez si van acompañadas de sustancias prebióticas el resultado será el óptimo.

Palabras clave: Microbioma gastrointestinal, prebiótico, probiótico, *Mus musculus*.

ABSTRACT

Objective: Demonstrate that oral administration of prebiotics and probiotic strains produces a beneficial intestinal and splenic histopathological effect of *Mus musculus*.

Material y methods: The study population was albino mice (*Mus musculus*) to which prebiotics or probiotic strains were administered, then the histopathological samples of the intestine and spleen of each mouse were analyzed, the fixations and staining of the samples were carried out. The statistical analysis was given by the Bonferroni T test; Multiple comparison tests were used in the inflammation variable, the Kruskal-Wallis analysis of variance was used to determine the difference between the groups.

Results: The group that received 5 probiotic strains and 1 prebiotic presented a significant histological difference compared to the other groups: a greater number of peyer's patches and proteins such as albumin and globulins, unlike the other groups ($p < 0.001$); as well as greater height in the crypts and villi of the small and large intestine, as well as a thicker mucosa with a villi / crypt ratio that presented a significant difference ($p < 0.001$).

Conclusion: Probiotic strains modify the activity of the small, large intestine and spleen; *Mus musculus*, increasing its immune activity, producing histomorphometric changes, which in turn, if accompanied by prebiotic substances, the result will be the optimal.

Keywords: Gastrointestinal microbiome, prebiotics, probiotics, *Mus musculus*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, ha aumentado la expectativa de vida y con ello el interés por mantenernos sanos, al igual que se incrementó la importancia de los factores que afectan la salud es por ello que el tema de la alimentación ocasiona mucha preocupación al igual que su impacto sobre la salud de las personas (1). En años recientes, se ha formulado el concepto de “alimento funcional” el cual se define como “alimentos que presentan ciertos componentes, con beneficios en el cuerpo humano, logrando recuperar la homeostasis y disminuyendo la probabilidad de contraer enfermedades incluso presentando efectos nutricionales sobreañadidos” (2).

Por otro lado, la ingesta de la “dieta mediterránea”, la cual está conformada por frutas, verduras, legumbres, y productos lácteos fermentados, sin dejar de mencionar otros como: pescados, vino tinto y aceite de oliva en base a una alimentación y forma de vida saludable, ha demostrado tener efectos beneficiosos en enfermedades crónicas, en particular sobre ciertas enfermedades cardiovasculares y tipos de cáncer. Por esta razón, la bibliografía especializada considera que las bondades y seguimiento de la dieta mediterránea residen en su conformación nutricia, particularmente porque cuenta con las cepas probióticas y/o prebióticos siendo los principales estos últimos (3,4).

Se consideran probióticos a microorganismos vivos que al ser suministrados en una porción específica producen beneficios en la salud del receptor (5); mientras que, prebiótico se refiere a sustancias seleccionadas y fermentadas que ejercen

modificaciones en la microbiota gastrointestinal (6), confiriendo así beneficios a la salud del huésped. Estos nutrientes son absorbidos en el intestino donde residen diversos tipos de bacterias (microbiota) las cuales se mantienen en simbiosis con el hospedero, por lo que van a influir de manera permanente en la fisiología de este. Existen investigaciones elaboradas en diferentes contextos fisiológicos y patológicos que demuestran la importante relación bacteria-hospedero que se da en la mucosa intestinal, generando así un perfeccionamiento del sistema inmune (7). Por ello hoy en día, se ha retomado un alto interés en la microbiota intestinal como un factor determinante en la salud y en la dolencia humana (8). Incluso las sociedades científicas especialistas en el tema han propuesto modelos nuevos que relacionan el sistema inmunitario, los nutrientes y el cáncer (9,10) o los antimutágenos y la dieta (11).

Esto toma mayor importancia ya que la evidencia epidemiológica demuestra que las enfermedades gastrointestinales han presentado un incremento acelerado, lo que se evidencia al analizar su presencia y progresividad en los últimos decenios (12).

Tomando en cuenta ello, los bienes llamados alimentos funcionales son de vital importancia en el entorno de nuestra alimentación y el mejoramiento de la salud. Los cuales no solo deben ser considerados importantes para estar saludables, sino también debe incluirse para evitar y mejorar ciertas enfermedades (13).

Los trabajos de investigación, dejan evidenciar la importancia de tener conocimiento acerca del desarrollo y la forma de actuar de los probióticos en seres

humanos sanos (14) como por ejemplo, el yogurt que habitualmente consumimos incluye dos bacterias lácticas, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que favorecen poblando el intestino además de dar protección contra afecciones gastrointestinales. La importancia de estas cepas es vital en la etapa neonatal. Su presencia estimula el desarrollo del sistema inmunológico y la tolerancia oral a los alérgenos, generando una acción sostenida con respecto a las defensas del cuerpo humano además mejora la función enzimática de la digestión (15).

Diversos estudios realizados in Vitro han evidenciado el impacto de los probióticos en patologías como intolerancia a la lactosa, infecciones del tracto uterino, diarreas, hipercolesterolemia, vaginitis, alergia alimentaria y desórdenes inmunológicos (16). Por lo cual se debe considerar la evaluación del sistema inmune; los folículos, linfocitos intraepiteliales, Ig A, placas de Peyer y linfocitos de lámina propia. Así como los nódulos linfáticos mesentéricos: células plasmáticas, centros germinales y los granulocitos de médula ósea (17,18).

Aunque se cuenta con una gran cantidad de investigaciones que ponen de manifiesto la importancia de los prebióticos y cepas probióticas sobre la disminución o mejoramiento de diversas enfermedades continúa sin ser completamente aplicado en la práctica clínica. Comúnmente se usa en la presencia de patologías intestinales como la diarrea pero también tiene uso en patologías funcionales y hasta en alteraciones extraintestinales como alergias o en la afectación por *H. pylori*. Por lo que se aconseja que cada cepa probiótica sea

estudiada de manera individual para así establecer su efectividad además que sea segura para el consumo.

Es por ello que el presente trabajo pretende aportar conocimientos acerca de los efectos a beneficiosos a nivel inmunológico e histopatológico intestinal y esplénico del *Mus musculus* de la administración oral de prebióticos y cepas probióticas.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Enunciado del problema

¿Cómo influye la administración oral de prebióticos y cepas probióticas en el tejido intestinal y esplénico de *Mus musculus*?

2. Justificación

En la actualidad, los probióticos han tomado gran importancia global ya que los estudios In-Vitro demuestran acción benéfica en las personas como: equilibrar la microbiota intestinal, estimular el sistema inmune, actuar contra patógenos, entre otros (19).

Posiblemente el término “Probiótico”, que etimológicamente procede del griego “pro bios” (por la vida) y recientemente fue redefinido por la Organización Mundial de la Salud como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador”(20). Los probióticos más destacados son las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son comensales del sistema gastrointestinal humano y que han sido comúnmente usadas en diversas fermentaciones de alimentos (21).

No obstante, esta definición está en continua evolución en un intento de adaptarse a los nuevos conocimientos que surgen de los trabajos de investigación con probióticos. En este sentido, varios científicos han demostrado que algunos microorganismos inactivados, e incluso sus componentes celulares, pueden ejercer un efecto beneficioso en la salud, por lo que todos estos hallazgos deberán considerarse en futuras revisiones del concepto de probióticos (22).

Los prebióticos son compuestos no digeribles de la dieta (formados principalmente de galacto y fructo oligosacáridos), que promueven efectos benéficos al estimular de manera selectiva el desarrollo y/o producción de bacterias del colon, que mejoran la salud del anfitrión (23).

Incluso, existen investigaciones en animales libres de bacterias en las que se evidencian ausencia total de microbiota intestinal lo que genera modificaciones significativas en la función y estructura intestinal, esto se evidencia con disminución de la cantidad de vellosidades y criptas poco profundas, así como leucocitos disminuidos en número, además de disminución de la densidad y el número de las placas de peyer; todo ello demostraría el efecto benéfico de las cepas prebióticas y probióticas (24,25).

En esta situación, y al no encontrarse estudios en vivo realizados se propuso estudiar el efecto de prebióticos y de las cepas Probióticas en tejido intestinal y esplénico del *Mus musculus*.

3. Objetivos

a) General

Demostrar que la administración oral de prebióticos y cepas probióticas produce un efecto beneficioso inmunológico histopatológico intestinal y esplénico del *Mus musculus*.

b) Específicos

- Demostrar que el efecto inmuno- Histo - Morfometrico de los prebióticos y cepas Probióticas administradas vía oral es favorable en el tejido intestinal y esplénico de *Mus musculus*.
- Determinar la inmuno- Histo – Morfometrica intestinal y esplénica del grupo en estudio con dos cepas Probióticas (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*).
- Determinar la inmuno- Histo - Morfometrico intestinal y esplénica del grupo en estudio con cinco cepas Probióticas. (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidófilus* y *Lactobacillus casei immunitas*).
- Determinar la inmuno- Histo - Morfometrico intestinal y esplénica del grupo en estudio con prebióticos (FOS-fructooligosacáridos) y dos cepas Probióticas (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*).
- Determinar la inmuno- Histo - Morfometrico intestinal y esplénica del

grupo en estudio con prebióticos (FOS-fructooligosacáridos) y cinco cepas Probióticas (Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium, Lactobacillus acidófilus y Lactobacillus casei inmunitas).

- Determinar la inmuno- Histo - Morfometrico intestinal y esplénica del grupo en estudio con fármaco (Vacuna Gel NB NF) con 2 cepas probioticas (Lactobacillus acidophilus y bulgaricus) en concentración \geq $\times 10^7$ ufc/100 ml.

III. METODOLOGÍA

3.1. Diseño de estudio

Estudio cuantitativo, experimental, aplicado.

3.2. Población, muestra y muestreo

Población: Estuvo conformada por especímenes Ratones albinos (*Mus musculus*) hembras adultas, obtenidos del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

Los especímenes fueron sometidos a un periodo de adaptación de 14 días con el mismo régimen de alimentación.

Muestra: Para la obtención del tamaño muestral se usó la fórmula de Maxel para investigación en Laboratorio.

$$n=(Z\alpha/2+Z\beta)^2 \delta^2$$

Donde:

$Z\alpha/2= 1.96$ para una seguridad del 95% ($\alpha=00,5$)

$Z\beta= 0.84$ para un poder de la prueba del 80%

$\delta=$ Coeficiente de Variación de las diferencias ($1\leq\delta\leq 3$)

Tomando valores:

$Z\alpha/2= 1.96$

$Z\beta= 0.84$

$\delta=1$

n= 8

La muestra por cada grupo fue de 8 ratones haciendo un total de 56 roedores de la especie *Mus musculus*.

Criterios de inclusión:

- Ratones (*Mus musculus*) sanos
- Sexo Femenino
- En intervalo de edad de 32 días
- Pesos corporales entre 20 ± 2 g

Criterios de exclusión:

- Ratones que no cumplan lo establecido en los criterios de inclusión.
- Ratones que enfermen durante la experimentación.

3.3. Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	CATEGORÍA	TIPO DE VARIABLE Y ESCALA DE MEDICIÓN
Administración oral de prebióticos y cepas probióticas	Nutrientes que serán administrados de manera oral por medio de yogurt, que serán absorbidos en el intestino.	5 cepas probióticas <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> • <i>Bifidobacterium</i> • <i>Lactobacillus bulgaricus</i> • <i>Streptococcus thermophilus</i> • <i>Lactobacillus casei immunitas</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Administración de ninguna cepa probiótica • Administración de 2 cepas probióticas. • Administración de 2 cepas probióticas y un prebiótico. • Administración de 5 cepas probióticas. 	Cuantitativa, de Razón

		Prebióticos: FOS-fructooligosacáridos	<ul style="list-style-type: none"> • Administración de 5 cepas probióticas y un prebiótico. 	
Efecto a nivel histológico intestinal	Modificaciones a nivel histológico intestinal	Placas de Peyer	<ul style="list-style-type: none"> • Valor hallado 	Cuantitativa, de Razón
		Linfocitos de la lámina propia	<ul style="list-style-type: none"> • Valor exacto hallado 	Cuantitativa, de Razón
		Proteína Totales (mg/dL)	<ul style="list-style-type: none"> • Albúmina (mg/dL) • Globulina (mg/dL) 	Cuantitativa, de Razón
		Altura de Vellosidades por mm²	<ul style="list-style-type: none"> • Valor hallado en milímetros (mm) 	Cuantitativa, de Razón
		Numero de Vellosidades por mm²	<ul style="list-style-type: none"> • Valor hallado 	Cuantitativa, de Razón
		Vascularización	<ul style="list-style-type: none"> • 0 = Normal 	Cuantitativa, ordinal

	<ul style="list-style-type: none"> • 1+ = dilatación de los vasos con estasis de los eritrocitos • 2+ = diapedesis eritrocitaria • 3+ = hemorragia intersticial • 4+ = hemorragia extensiva 	
Inflamación intestino	<ul style="list-style-type: none"> • 0=ninguna • 1+=infiltración confinada a la mucosa • 2+=infiltración de mucosa más mínima submucosa • 3+= PMN agregado en submucosa • 4+=infiltración propia de la muscular. 	Cuantitativa, ordinal
Altura de la Cripta en Intestino	<ul style="list-style-type: none"> • Valor hallado en milímetros (mm) 	Cuantitativa, de Razón

Relación	• Valor hallado	Cuantitativ
Vellosidad/Cripta		a, de
a		Razón
Espesor de la mucosa en Intestino	• Valor hallado en milímetros (mm)	Cuantitativ a, de Razón
Goblet Cells del Intestino	<ul style="list-style-type: none"> • 0 = células mucosas presentes a lo largo de toda la longitud de la vellosidad • 1+ = células mucosas presentes en el 75% de la longitud • 2+ = células mucosas presentes en el 50% de la longitud • 3+= células mucosas presentes en el 25% de longitud • 4+ = células mucosas no presentes. 	Cuantitativ a, ordinal

Efecto a nivel	Modificaciones	Bazo	• Modificaciones	Cuantitativ
histológico	a nivel		histopatológicas.	a, de
esplénico	histológico			Razón
	esplénico			

3.4. Procedimientos y Técnicas

Se llevó a cabo un trabajo experimental en el laboratorio de microbiología de la Escuela de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. Los ratones se adquirieron en el bioterio del Instituto Nacional de Salud - Perú, pertenecientes a la especie *Mus musculus* Balb/c/CNPB; además, se usaron hembras adultas de 32 días de edad exacta, con un peso medio de 20 g, fueron alojados en jaulas de policarbonato (jaula tipo III, Techniplast, Italia) con una temperatura adecuada entre 22 a 24° C, con libre acceso de comida y agua y con fotoperiodos de 12 horas.

La muestra estuvo conformada por 56 ratones hembras, las cuales se distribuyeron por aleatorización simple en siete grupos conformado de ocho ratones cada uno (cinco grupos experimentales y dos controles), a los que se asignó un código de identificación (Tabla 1). Para el periodo de adaptación de la muestra se tomó en cuenta 14 días en el laboratorio con el mismo régimen alimenticio, en este lapso no se suministró prebióticos o cepas probióticas, ni se le realizó algún tipo de procedimiento. El 15° día se consideró como el primer día donde se efectuó la toma de pesos de los ratones y demás

observaciones necesarias que fueron especificadas la ficha de investigación de cada ratón.

Tabla 1. Los siete grupos según clasificación y alimentación de los ratones.

Grupo	Tipo	Alimentación habitual	Alimentación adicional con 1 ml c/8 horas
I Grupo	Control	Arroz	Ninguna
II Grupo	Control	Arroz	Ninguna
III Grupo	Caso	Arroz	Yogurt con 2 cepas Probióticas (Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus).
IV Grupo	Caso	Arroz	Yogurt con 2 cepas Probióticas (Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus). + prebióticos (FOS-fructooligosacáridos)
V Grupo	Caso	Arroz	Fármaco (Vacuna Gel NB NF) con 2 cepas Probióticas (Lactobacillus bulgaricus y acidophilus) en concentración no menor a $\geq x10^7$ UFC/100 ml.
VI Grupo	Caso	Arroz	Yogurt con 5 cepas Probióticas (Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium, Lactobacillus

			bulgaricus, Streptococcus thermophilus y Lactobacillus casei inmunitas).
VII	Caso	Arroz	Yogurt con 5 cepas Probióticas (Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus y Lactobacillus casei inmunitas) + prebióticos (FOS-fructooligosacáridos)
Grupo			

El alimento asignado para cada ratón constó de 1 ml de yogur cada 8 horas, el que contenía o 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de prebióticos o 1.18×10^8 UFC de probióticos; el proceso de recuento de UFC se realizó mediante diluciones seriadas 1:10 con posterior extensión en una placa de 0.1 ml de dicha dilución, las placas fueron incubadas hasta que las colonias pudieran visualizarse para su posterior recuento.. En el caso del fármaco (Vacuna Gel NB NF) por cada 1 ml recibió 10^7 UFC de probióticos

A los grupos III, IV, V, VI, VII; se les alimentó por un lapso de 60 días, luego de los cuales se les sacrifico usando la técnica de decorticación; en seguida a los ratones se les realizó autopsia; extrayendo el intestino delgado, intestino grueso y bazo para ser analizados. En proceso de simple ciego se obtuvieron vistas micro y macroscópicas del intestino delgado, intestino grueso y bazo de los ratones parte del experimento. Similar procedimiento se realizó con el grupo I y II, luego de los primeros 14 días de adaptación

en el primer grupo y luego de 74 días de alimentación en el segundo, teniendo así dos controles al inicio y al final del experimento.

A todos los ratones se les tomó muestra sanguínea punzando la zona mandibular. Las biopsias se mantuvieron en formol y fueron transportadas en pomos titulados con el código respectivo de cada ratón, al laboratorio de anatomía patológica del Hospital Regional Docente de Trujillo donde las muestras fueron fijadas por 48 horas en una solución tamponada de formalina con zinc. Luego se aplicó un procedimiento similar a lo realizado por Okoshi, K. y colaboradores (26) en el 2008, quienes lo validaron; las muestras fueron cortadas por un micrótopo en rodajas de 4 μm de espesor; se colocaron en una lámina portaobjetos adhiriéndolas en la misma desparafinándose en xilol en 2 ocasiones por cinco minutos; fueron rehidratadas con etanol de 100% y 95%, y se lavaron en solución tamponada de fosfatos por 5 minutos. Para el análisis histológico básico se manejaron las siguientes técnicas: hematoxilina y eosina (HE) y tricrómica de Gomori (TG). Mientras que para el estudio histoquímico se usó la técnica del ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS). Luego, se procedió al análisis anatomopatológico en forma de simple ciego. El ácido transretinoico atenúa la fibrosis intestinal inducida por radiación en ratones. (27,28).

El material que se usó para la extracción sanguínea comprendió: agujas comunes (BD Microlance, Becton Dickinson, EE.UU.) de 21G a 23G, dependiendo de las dimensiones del ratón además de tubos Eppendorf para recoger la muestra sanguínea. De la misma forma, se dispuso lancetas usadas particularmente para este

tipo de trabajo (Goldenrod animal lancet, 4 mm, 5 mm y 5,5 mm, Medipoint, EE.UU.)(29).

La obtención se realizó sujetando al ratón de la piel del cuello generando la tracción necesaria como para disminuir transitoriamente el retorno venoso yugular, facilitando así el sangrado, aunque se tomó cuidado de que el ratón respire sin dificultad(30).

Asimismo, el experimento se efectuó bajo los principios elementales que se aplican en las investigaciones biomédicas con animales que fueron creados en el año 1985 por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas de la Organización Mundial de la Salud(31).

Análisis estadístico de datos:

Las diferencias entre los grupos han sido evaluadas usando el análisis de varianza. La prueba T de Bonferroni fue usada para las pruebas de comparaciones múltiples. Segmentos individuales de intestino han sido categorizados para inflamación (la inflamación basada en la infiltración polimorfonuclear de la pared intestinal: 0=ninguna, 1+=infiltración confinada a la mucosa, 2+=infiltración de mucosa más mínima submucosa, 3+= PMN agregado en submucosa, y 4+=infiltración propia de la muscular(32).

La Vascularización fue estimada de acuerdo al grado de llenado de los vasos sanguíneos y de la fuga de los eritrocitos de los vasos: 0 = Normal, 1+ = dilatación de los vasos con estasis de los eritrocitos, 2+ = diapédesis eritrocitaria, 3+ = hemorragia

intersticial, y 4+ = hemorragia extensiva. Goblet cell (0 = células mucosas presentes a lo largo de toda la longitud de la vellosidad, 1+ = células mucosas presentes en el 75% de la longitud; 2+ = células mucosa presentes en el 50% de la longitud; 3+= células mucosas presentes en el 25% de longitud; y 4+ = células mucosas no presentes.) según el score subjetivo descrito por Guzmán- Stein et al.

Las diferencias en inflamación, Vascularización han sido evaluadas por el análisis de varianza de Kruskal-Wallis, Cuando el valor de P obtenido de las pruebas estadísticas Kruskal-Wallis sea significativo, la prueba de comparación múltiple fue usada para determinar la diferencia entre los grupos. Para el análisis de la parte estadística se usó el programa SPSS v26.0.

Los datos serán expresados en promedios \pm SD para el número de especímenes presentados en paréntesis. Valores de p de comparaciones entre 2 grupos de cada fase determinada por la Prueba T student o la Prueba de Mann-Whitney. Se consideró $p < 0.05$ estadísticamente significativo.

Aspectos éticos

El presente trabajo fue presentado para su evaluación y aprobación a los Comités de Ética Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego y del Hospital Regional Docente de Trujillo. Se hizo uso de las 3 “R”s que implica refinar, reemplazar y reducir para hacer uso de la cantidad mínima de animales en investigación (33) además de tomar en cuenta los principios establecidos en el Simposio Internacional sobre el animal de laboratorio al servicio del hombre celebrado en Lyon en 1979 donde se describe que los animales de laboratorio podrán

y deberán ser usados como reactivos ecológicos y biológicos beneficiando a la salud pública y la ciencia, cada vez que no puedan ser reemplazados por distintos procesos (34).

IV. RESULTADOS:

Lo primero que se pudo evaluar acerca del efecto a nivel histológico intestinal fue el número de placas de peyer donde se encontró que el grupo que recibió 5 cepas probióticas y prebióticos desarrolló mayor cantidad de estas placas. Se observa diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5 con 11 placas de peyer y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 4 con 9.38 placas de peyer y los otros grupos, y significativa ($p < 0.05$) entre el caso 2 (8.88 placas de peyer) y los controles (control 1 y 2 con 7.50 y 7.63 placas de peyer respectivamente) (**Figura 1**).

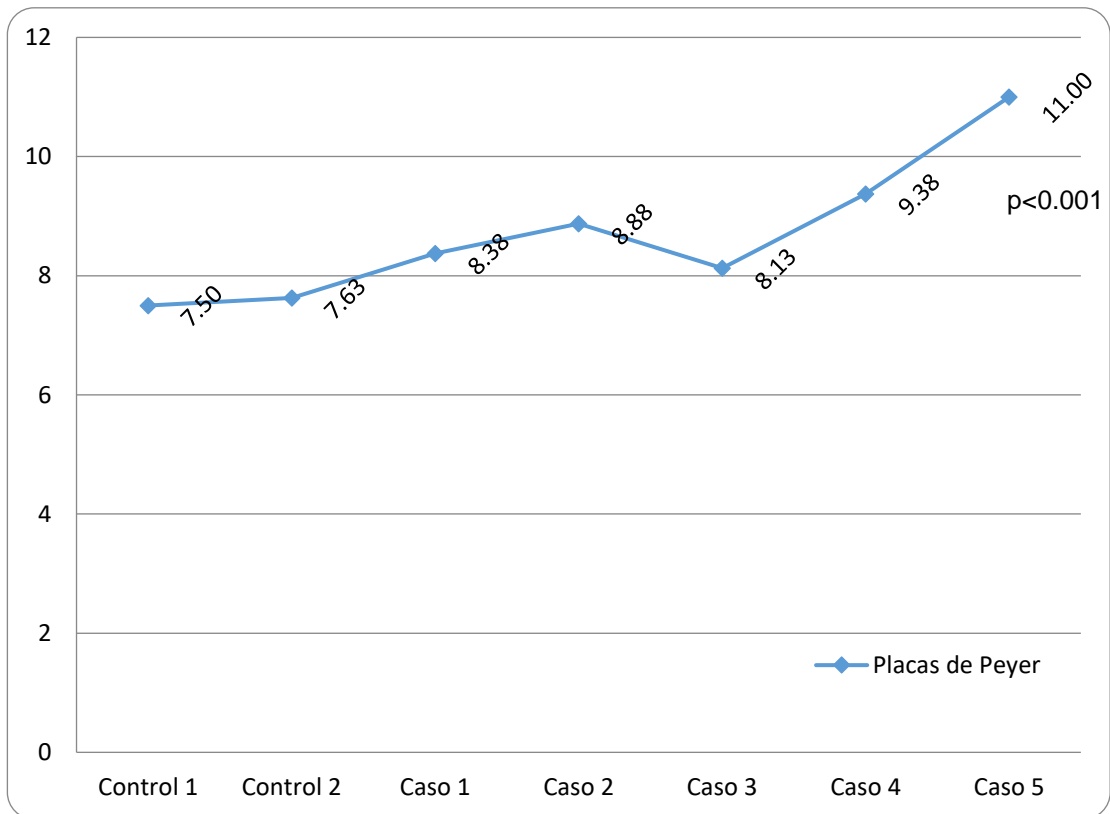


Figura 1: Promedio de Placas de Peyer según grupo de investigación

En relación a las proteínas totales y fraccionadas halladas en el intestino de los ratones se evidenció un número mayor en el grupo que recibió 5 cepas probióticas y prebióticos a comparación de los demás grupos evaluados. Se encuentra diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 4 y los casos 1 y 3; y significativa ($p < 0.05$) entre el caso 2 y caso 3; y el caso 1 y los controles. En relación a la Albumina se encuentra diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 4 y los casos 1 y 3; y significativa ($p < 0.05$) entre el caso 2 y caso 3. En las Globulinas se encuentra diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 4 y los casos 1 y 3; y significativa ($p < 0.05$) entre el caso 2 y el control 1 (**Figura 2**).

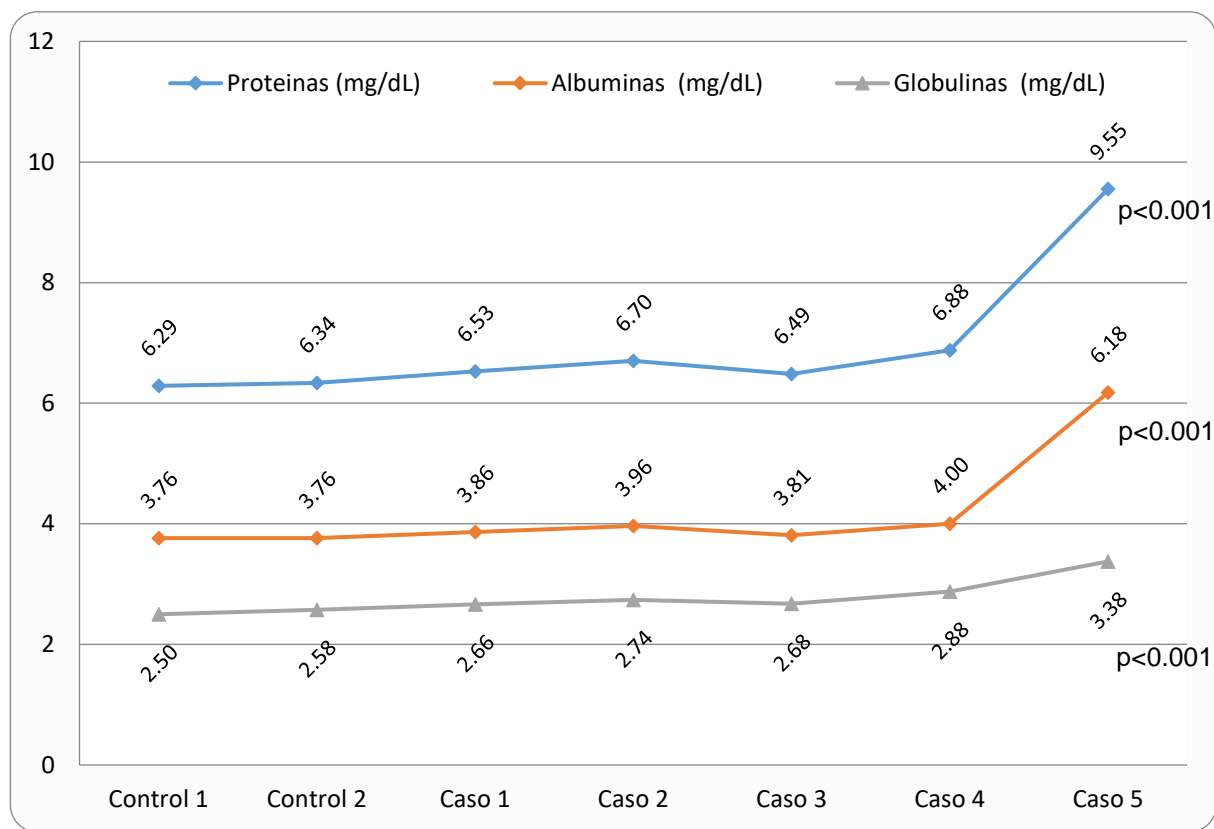


Figura 2: Promedio de Proteínas y Fraccionadas según grupo de investigación.

Con respecto a la altura de las criptas en el intestino se halló que los grupos que habían recibido 5 cepas próbóticas y 5 cepas próbóticas y prebióticos habían desarrollado una mayor altura en comparación a los demás grupos. En relación al intestino delgado se encontro diferencia altamente significativa ($p<0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p<0.01$) entre el caso 4,2 y los controles. En el intestino grueso se encontro diferencia altamente significativa ($p<0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p<0.01$) entre el caso 4 y los otros grupos, y significativa entre el caso 2 y los controles y el caso 3 (**Figura 3**).

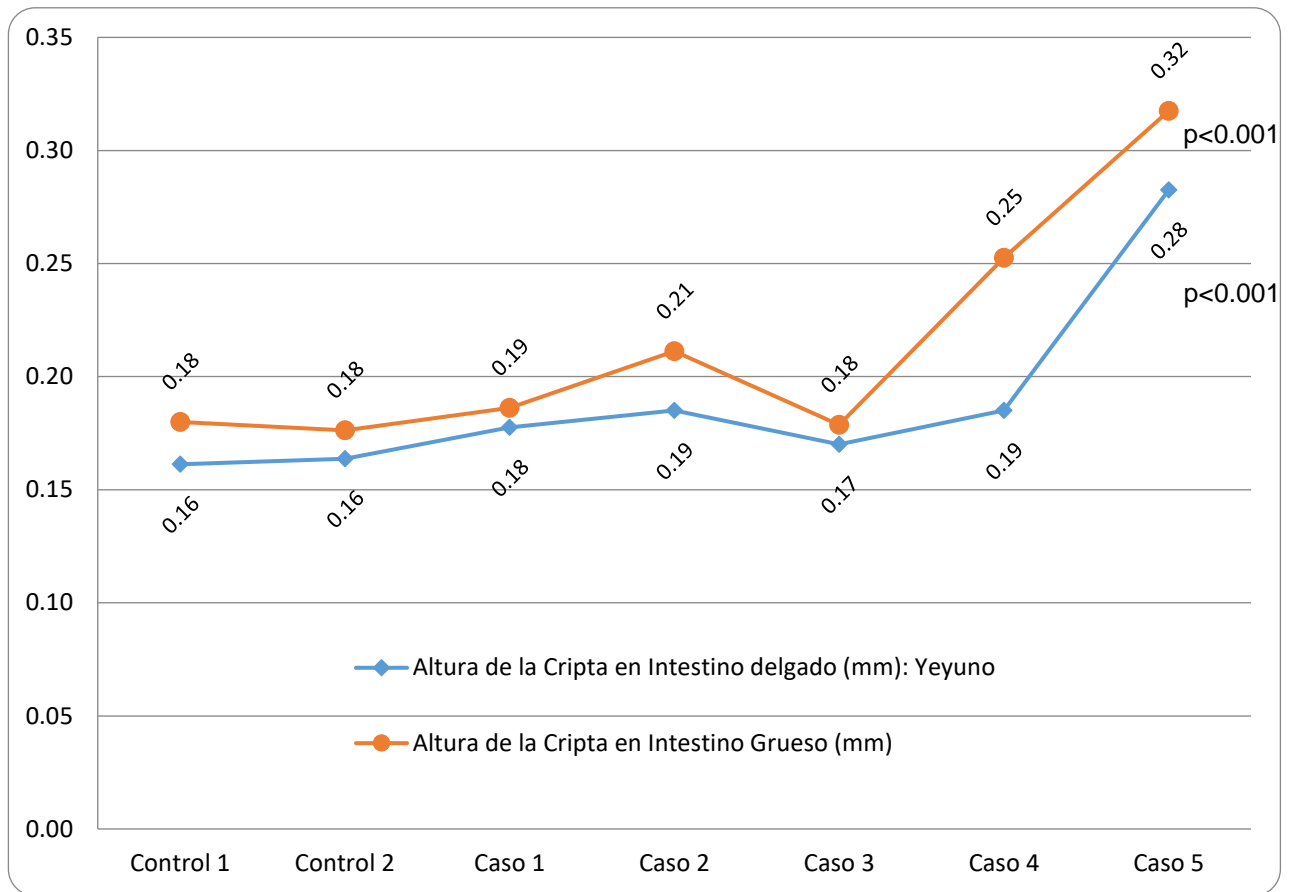


Figura 3: Promedio de altura de las criptas en el intestino, según grupo de investigación.

El espesor de la mucosa del intestino delgado y grueso fue mayor en el grupo que recibió 5 cepas probióticas y prebióticos en comparación a los demás. En relación al intestino delgado se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 4 y los controles y el caso 3. En el intestino grueso se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5, 4 y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 2 y los controles y el caso 3 (**Figura 4**).

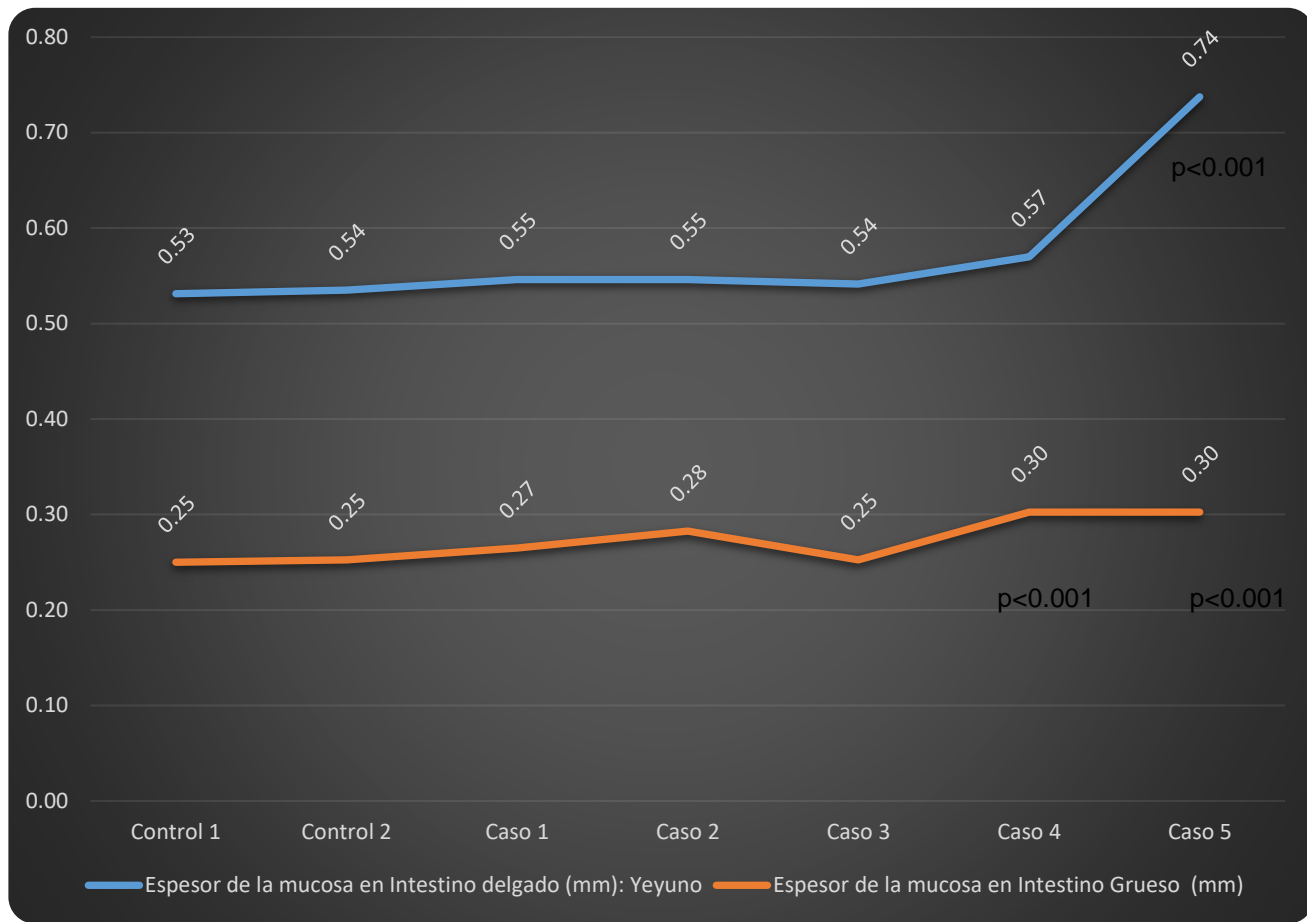


Figura 4: Promedio de espesor de la mucosa en intestino delgado y grueso según grupo de investigación.

La altura de las vellosidades fue mayor en el grupo que recibió 5 cepas probióticas y prebióticos a comparación de los demás grupos. Se encontro diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el caso 5 y los otros grupos, muy significativa ($p < 0.01$) entre el caso 4 y los otros grupos, y significativa ($p < 0.05$) entre el caso 2 y el control 1.

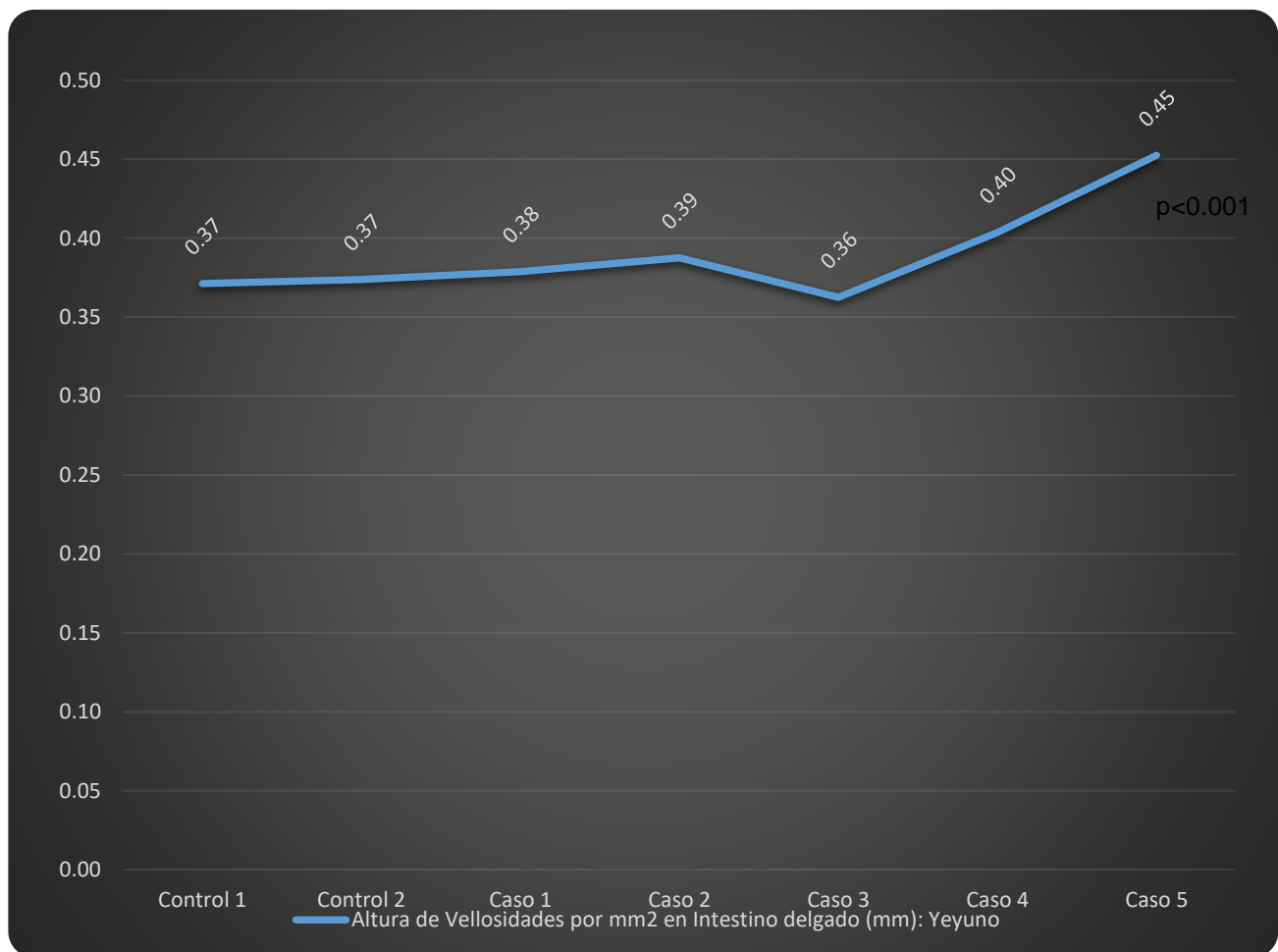


Figura 5: Promedio de Altura de Vellosidades por mm² en intestino delgado, según grupo de investigación

La relación vellosidad/cripta se mantuvo en 5:1 en el grupo que recibió 5 cepas probióticas y prebióticos a comparación de los demás grupos. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el caso 5 y los otros grupos (**Figura 6**).

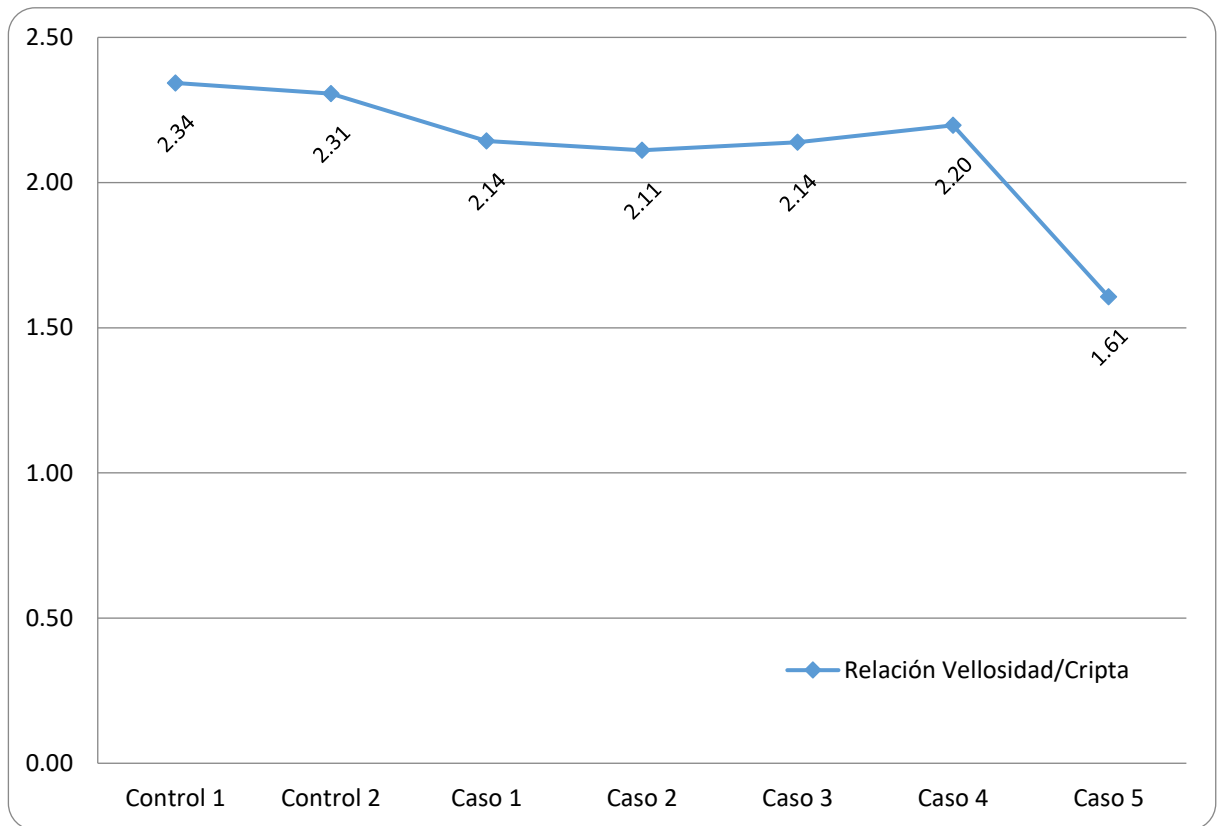


Figura 6: Relación Vellosidad/Cripta en el intestino delgado según grupo de investigación.

Por último, en la tabla 2 podemos evidenciar que se observaron diferencias significativas entre los linfocitos, la vascularización, inflamación y goblet cells del intestino y del bazo de los *Mus musculus* estudiados del grupo IV a comparación de los demás grupos.

Tabla N° 02: Comparación de parámetros Inmunohistoquímicos del intestino delgado, grueso y el Bazo; de los diferentes grupos de investigación

	P	Sig
Linfocitos de la lámina propia		
Control 2 VS Caso 4	0.0385	Sig
Control 2 VS Caso 5	0.0385	Sig
Caso 3 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 3 VS Caso 5	0.0385	Sig
Vascularización		
Control 2 VS Caso 4	0.0385	Sig
Control 2 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 1 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 1 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 2 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 3 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 3 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 4 VS Caso 5	0.0385	Sig
Inflamación Intestino Delgado		
Control 2 VS Caso 4	0.0385	Sig
Control 2 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 1 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 1 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 2 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 2 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 3 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 3 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 4 VS Caso 5	0.0385	Sig
Inflamación Intestino Grueso		
Control 2 VS Caso 5	0.0002	Sig

Caso 1 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 2 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 3 VS Caso 5	0.0002	Sig
Caso 4 VS Caso 5	0.007	Sig

Globet Cells Intestino Delgado

Control 2 VS Caso 4	0.0385	Sig
Control 2 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 1 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 1 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 2 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 2 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 3 VS Caso 4	0.0385	Sig
Caso 3 VS Caso 5	0.007	Sig

Globet Cells Intestino Grueso

Control 2 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 1 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 2 VS Caso 5	0.007	Sig
Caso 3 VS Caso 5	0.007	Sig

Bazo

Control 2 VS Caso 1	0.0002	Sig
Control 2 VS Caso 2	0.0002	Sig
Control 2 VS Caso 3	0.0002	Sig
Control 2 VS Caso 4	0.0002	Sig
Control 2 VS Caso 5	0.0002	Sig

V. DISCUSIÓN:

Actualmente existen múltiples artículos publicados que han investigado acerca de la asociación entre los probióticos (levaduras y bacterias acidolácticas) y la generación de patologías crónicas (alergias, cáncer, etc.) demostrando que existe un efecto benéfico para prevenir las mismas(35,36).

En el presente estudio se evidenció que, el crecimiento esperado de las ratas y su desarrollo metabólico parece no verse afectado con el consumo de cepas probióticas lo que podría ayudar a incluirlas con las dosis estudiadas en la dieta como suplemento(37).

No obstante, la Inmuno – Histo - Morfometria intestinal y la motilidad del intestino delgado, es modificada por el consumo de ambas cepas. Aparentemente activan el sistema inmunológico intestinal, debido a que se observa un incremento en el número de placas de Peyer del yeyuno de las ratas y un incremento en el recuento linfocitario en su colon. Esto concuerda con un probable efecto inmunomodulador de los probióticos referido en diversas investigaciones(35,36).

Las modificaciones histológicas que se evidenciaron en el estudio fueron aumento de número de placas de peyer, proteínas totales y fraccionadas así como número de vellosidades y espesor de la mucosa del intestino fueron similares a las halladas por Sánchez-Morales A y colaboradores (38) en su artículo “Efectividad de probióticos sobre síntomas, histología y tolerancia alimentaria en colitis ulcerativa” en donde se evidenció que los pacientes que presentaron una dieta enriquecida con

probióticos y prebióticos presentó una remisión de alteraciones histológicas intestinales con mejoría en tres meses a comparación de los que no habían seguido la misma dieta. Otro estudio que refuerza lo hallado por el nuestro es el de Bermúdez-Medranda A.E. y colaboradores (39), quienes demostraron que al administrarle probióticos al pez *Dormitator latifrons* (chame), desarrollo un aumento de la longitud y ramificaciones de las vellosidades del intestino. Al igual que, Ramos-Rico B (40) en su tesis “Relación Entre Parámetros Productivos y Hallazgos Histomorfológicos Intestinales en Pollos de Engorde Suplementados con Probióticos” se puede evidenciar que los intestinos de los pollos que fueron suplementados con probióticos por 20 días presentaron una mayor altura de la vellosidad, ancho apical, ancho basal, área de la vellosidad, diámetro longitudinal, diámetro transversal y área de la cripta.

A su vez, se logra evidenciar alteraciones inmunológicas positivas en el intestino y bazo de los *Mus musculus* evaluados donde se encuentra mayor desarrollo de los mismos en aquellos que recibieron la mayor cantidad de cepas probióticas y prebióticos. Existe una buena cantidad de Goblet Cells en intestino grueso, lo cual sería muy beneficioso en la producción de moco, muy necesaria en este órgano. Hay diferencia significativa entre los especímenes que tuvieron dieta a base de cepas probióticas y los que no recibieron, lo cual redundaría en una mejor respuesta inmunitaria.

Similar a lo hallado en una revisión sistemática realizada por Sebastián-Domingo JJ (41), quien determinó que los probióticos han demostrado su eficacia y beneficios en los casos de gastroenteritis al modificar la estructura del intestino delgado y grueso. Incluso en el 2019, la Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y

Colitis Ulcerosa (42) recomendó el uso de probióticos, ya que luego de las enfermedades como Crohn ayudan a reconstruir el tránsito intestinal. Castañeda-Guillot CD (43) también demostró que los probióticos tenían un potencial de modificar la microbiota colónica luego de fermentarla con una o más bacterias.

VI. CONCLUSIONES

- Se concluye que las cepas probióticas modifican la actividad del intestino delgado, grueso y Bazo del *Mus musculus*, aumentando su actividad inmune, produciendo cambios histo Morfometricos.
- La administración de una dieta con probióticos y prebióticos de manera oral es favorable para el tejido intestinal y esplénico del *Mus musculus*.
- Se evidenciaron modificaciones no significativas de los tejidos intestinales y esplénicos del *Mus musculus* que formó parte del grupo que recibió dos cepas probióticas.
- Se evidenciaron modificaciones no significativas del tejido intestinal pero modificaciones significativas a nivel del tejido esplénico del *Mus musculus* que formó parte del grupo que recibió dos cepas probióticas.
- Se evidenciaron modificaciones significativas de los tejidos intestinales y esplénicos del *Mus musculus* que formó parte del grupo que recibió cinco cepas probióticas.
- Se evidenciaron modificaciones no significativas del tejido intestinal pero modificaciones significativas a nivel del tejido esplénico del *Mus musculus* que formó parte del grupo que recibió dos cepas probióticas y prebióticos.
- Se evidenciaron modificaciones significativas de los tejidos intestinales y esplénicos del *Mus musculus* que formó parte del grupo que recibió cinco cepas probióticas y prebióticos.

- Se evidenciaron modificaciones no significativas del tejido intestinal pero modificaciones significativas a nivel del tejido esplénico del *Mus musculus* que formó parte del grupo que recibió dos cepas probióticas en concentración \geq $\times 10^7$ ufc/100 ml.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayos clínicos para evidenciar la concentración necesaria para su efecto benéfico en el ser humano.

VIII. REFERENCIAS:

1. Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Feb 26;12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33717063/>
2. Wang H, Anvari S, Anagnostou K. The Role of Probiotics in Preventing Allergic Disease. *Children* [Internet]. 2019 Feb 5;6(2):24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30764558/>
3. Liu HX, Keane R, Sheng L, Wan YJY. Implications of microbiota and bile acid in liver injury and regeneration. *J Hepatol* [Internet]. 2015 Dec 1;63(6):1502–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26256437/>
4. Akinkunmi EO, Lamikanra A. A study of the intestinal carriage of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* by Nigerian children. *Afr Health Sci* [Internet]. 2012;12(3):381–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23382756/>
5. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. In: *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014. p. 506–14. Available from: www.nature.com/nrgastro

6. Guarner F, Sanders ME, Eliakim R, Fedorak R, Gangl A, Garisch J, et al. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología [Internet]. Merenstein D, Salminen S, editors. Probióticos y prebióticos. 2017 Feb. Available from: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>
7. Suárez J. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp*. 2013;28(1):38–41.
8. Carbone EA, D’Amato P, Vicchio G, De Fazio P, Segura-García C. A systematic review on the role of microbiota in the pathogenesis and treatment of eating disorders. *Eur Psychiatry* [Internet]. 2020;64(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33416044/>
9. Horst NL, Marques RG, Diestel CF, Matzke BD, Caetano CER, Simões FC, et al. Effects of probiotic supplementation on markers of acute pancreatitis in rats. *Curr Ther Res - Clin Exp* [Internet]. 2009 Apr;70(2):136–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24683225/>
10. Pei L yan, Ke Y shi, Zhao H hu, Wang L, Jia C, Liu W zhi, et al. Role of colonic microbiota in the pathogenesis of ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2019 Jan 14;19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30642266/>
11. Shu XL, Kang K, Gu LJ, Zhang YS. Effect of early enteral nutrition on patients

- with digestive tract surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp Ther Med* [Internet]. 2016 Oct 1;12(4):2136–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27698702/>
12. Mangalat N, Teckman J. Pediatric Intestinal Failure Review. *Children* [Internet]. 2018 Jul 20;5(7):100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037012/>
 13. Li N, Li B, Guan J, Shi J, Evivie SE, Zhao L, et al. Distinct Effects of Milks From Various Animal Types on Infant Fecal Microbiota Through in vitro Fermentations. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Sep 10;11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33072051/>
 14. Xie HY, Feng D, Wei DM, Mei L, Chen H, Wang X, et al. Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women [Internet]. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2017. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29168557/>
 15. Tsilia V, Van den Abbeele P, Van de Wiele T. Improved in vitro assay for determining the mucin adherence of bacteria sensitive to Triton X-100 treatment. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. 2015 Sep 11;60(5):435–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25702162/>
 16. Meng F, Chen T, Ma D, Wang X, Zhao X, Tian P, et al. Reclamation of Herb Residues Using Probiotics and Their Therapeutic Effect on Diarrhea. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017;2017. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29317795/>

17. Zawistowska-Rojek A, Tyski S. Are probiotic really safe for humans? Polish Journal of Microbiology [Internet]. 2018;67(3):251–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30451441/>
18. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. Pharmacognosy Reviews [Internet]. 2014;8(16):122–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25125885/>
19. Shah M, Zaneb H, Masood S, Khan RU, Ashraf S, Sikandar A, et al. Effect of Dietary Supplementation of Zinc and Multi-Microbe Probiotic on Growth Traits and Alteration of Intestinal Architecture in Broiler. Probiotics Antimicrob Proteins [Internet]. 2019 Sep 15;11(3):931–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29680883/>
20. Khan MS, Ikram M, Park JS, Park TJ, Kim MO. Gut Microbiota, Its Role in Induction of Alzheimer’s Disease Pathology, and Possible Therapeutic Interventions: Special Focus on Anthocyanins [Internet]. Vol. 9, Cells. NLM (Medline); 2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32244729/>
21. Carr JS, King S, Dekaney CM. Depletion of enteric bacteria diminishes leukocyte infiltration following doxorubicin-induced small intestinal damage in mice. PLoS One [Internet]. 2017 Mar 1;12(3). Available from: [/pmc/articles/PMC5336284/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5336284/)

22. Karkhaneh M, Fraser L, Jou H, Vohra S. Effectiveness of probiotics in infantile colic: A rapid review. *Paediatrics and Child Health (Canada)* [Internet]. 2020 Apr 10;25(3):149–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296276/>
23. Sicard JF, Bihan G Le, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2017 Sep 5;7(SEP). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28929087/>
24. Lisko D, Johnston G, Johnston C. Effects of Dietary Yogurt on the Healthy Human Gastrointestinal (GI) Microbiome. *Microorganisms* [Internet]. 2017 Feb 15;5(1):6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28212267/>
25. Kukhtyn M, Vichko O, Horyuk Y, Shved O, Novikov V. Some probiotic characteristics of a fermented milk product based on microbiota of “Tibetan kefir grains” cultivated in Ukrainian household. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2018 Jan 1;55(1):252–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29358817/>
26. Okoshi K, Kubo H, Nagayama S, Tabata C, Kadokawa Y, Hisamori S, et al. All-trans-Retinoic Acid Attenuates Radiation-Induced Intestinal Fibrosis in Mice. *J Surg Res* [Internet]. 2008 Nov;150(1):53–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243243/>
27. Hamilton-Miller JMT. The role of probiotics in the treatment and prevention of

- Helicobacter pylori* infection. Vol. 22, International Journal of Antimicrobial Agents. Elsevier; 2003. p. 360–6.
28. Kapkac M, Erikoglu M, Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, Alkanat M, et al. Fiber enriched diets and radiation induced injury of the gut. *Nutr Res.* 2003 Jan;23(1):77–83.
 29. Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. Vol. 366, *Clinica Chimica Acta.* 2006.
 30. Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc.* 2003 May;103(5):582–7.
 31. O’Prey J, Brown J, Fleming J, Harrison PR. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2003 Dec;66(11):2075–88.
 32. Donskey CJ, Hujer AM, Das SM, Pultz NJ, Bonomo RA, Rice LB. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J Microbiol Methods.* 2003 Aug;54(2):249–56.
 33. Russell W, Bursh R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* 1st ed. Methuen; 1959.
 34. Gimeno Forner L, Cejalvo Lapeña D, Bolant Hernández B, Calvo Bermúdez M, Todolí Faubell J, Lloris Carsi J. Ética y legislación en los animales de laboratorio. *Res Surg.* 1989;5(3):18–28.

35. Keen C, Uriu-Adams J, Ensunsa J, Gershwin M. Trace Elements/Minerals and Immunity. In: Gershwin M, Nestel P, Keen C, editors. Handbook of Nutrition and Immunity. 1°. Totowa: Humana Press; 2004.
36. Ramakrishnan U, Webb A, Ologoudou K. Infection, Immunity, and Vitamins. In: Gershwin M, Nestel P, Keen C, editors. Handbook of Nutrition and Immunity. 1°. Totowa: Humana Press; 2004.
37. Cadaval A, Escauriaza B, Barrutia U, Rodrigo C, Aranceta J. Alimentos funcionales Para una alimentación más saludable. 1°. España: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria; 2005.
38. Sánchez-Morales A, Pérez-Ayala MF, Cruz-Martínez M, Arenas-Osuna J, Ramírez-Mendoza P, Cenicerós RA, et al. Efectividad de probióticos en colitis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2019 May 30;57(1):9–14.
39. Bermúdez-Medrandá AE, Lucas G, Vilela Marcillo E, Carlos Vélez-Chica J, Cruz-Quintana Y, Mesías A, et al. Efecto de dos probióticos comerciales en la ganancia de peso, parámetros hematológicos e histología intestinal del chame *Dormitator latifrons*. *Aquatechnica* [Internet]. 2020 May 13;2(1):23–30. Available from: <https://doi.org/10.33936/at.v2i1.2408>
40. Ramos-Rico B. Relación Entre Parámetros Productivos y Hallazgos Histomorfológicos Intestinales en Pollos de Engorde Suplementados con Probióticos [Internet]. [Colombia]: Universidad de Los Llanos; 2020. Available from: <https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/1634>

41. Sebastián Domingo JJ. Revisión del papel de los probióticos en la patología gastrointestinal del adulto. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017 Jun 1;40(6):417–29. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-revision-del-papel-probioticos-patologia-S0210570517300031>
42. Barreiro-de Acosta M, Gutierrez A, Rodríguez-Lago I, Espín E, Ferrer Bradley I, Marín-Jimenez I, et al. Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU) on pouchitis in ulcerative colitis. Part 1: Epidemiology, diagnosis and prognosis. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Nov 1;42(9):568–78. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-recomendaciones-del-grupo-espanol-trabajo-S0210570519301955>
43. Castañeda-Guillot CD. Microbiota intestinal, probióticos y prebióticos. *Dialnet* [Internet]. 2017 [cited 2021 May 22];2(4):156–60. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6233760>