



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Bacillus subtilis* SOBRE LA CONCENTRACIÓN  
SANGUÍNEA DE UREA, AMONIACO Y LA GENERACIÓN DE ESPECIES  
REACTIVAS DE NITRÓGENO EN PERROS ADULTOS EN MANTENIMIENTO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**COSIO CARPINTERO KARINA ELIZABETH**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**MVZ MPA DrC. CARLOS GUTIÉRREZ OLVERA.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR:**

**MVZ MenC DrC. YAZMÍN ALCALÁ CANTO. FMVZ.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM  
MVZ MenC PhD MARÍA ESTHER ORTEGA CERRILLA.  
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

**ACADÉMICO INVITADO:**

**BVSc PhD DACVN DECVCN CECILIA VILLAVERDE HARO.  
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

**MÉXICO, D.F**

**AGOSTO; 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS**

A mi mamá Ernestina Carpintero, la persona a la que le debo el ser lo que soy ahora.

A mi tío Juan Carpintero, por su apoyo a lo largo de los años

A Gilberto Reza Hernández, por compartir y colaborar siempre en cada uno de mis éxitos profesionales y personales.

A Pali, que siempre ha sido y será parte importante de mi vida.

A mi tío Abel Carpintero, porque espero que desde donde te encuentres, sigas siempre sintiéndote orgulloso de mí, no habría amado tanto esta profesión de no ser por ti, tus consejos y tu motivación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Inicialmente a mi comité tutor: Dr. Carlos Gutiérrez Olvera, Dra. Yazmín Alcalá Canto y Dra. Ortega Cerrilla, por ser excelentes profesores y tutores, así como por sus valiosos consejos.

A mi académico invitado: Dra Cecilia Villaverde Haro, por recibirme en Barcelona y darme sus valiosos aportes y consejos para este trabajo.

A mi jurado: Dr. Antonio Díaz, Dr. Alberto Miranda, Dr. Isidro Castro y Dr. Jesús Gracia, por el invaluable tiempo dedicado a la revisión de este escrito.

De forma especial al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera, quien ha forjado gran parte de mi camino profesional, le agradezco la confianza otorgada a lo largo de estos años; por ser un gran investigador y docente, digno de admirar.

A la Dra. Guadalupe Sánchez por todo su apoyo en el quehacer estadístico (un trabajo nada fácil), por siempre mostrarse atenta y paciente.

A Alejandra Guerrero y Familia, por las facilidades prestadas durante la experimentación, y claro está, a Kenji!. A Marce! Por todo el apoyo con Ameka, los buenos momentos y risas compartidas.

A Rocío Torres y Familia, por volverme parte de su familia y sin duda por todo el apoyo que siempre nos brindan, creo que muchos de los trabajos no podrían salir adelante sin su paciencia, esmero, atención y cariño.

A Alan Contreras y Norma Castillo, por soportar mis mil y un humores a lo largo de estos dos años. Alan, gracias por ser más que mi amigo, mi hermano, y siempre apoyarme en todos los proyectos, dificultades, éxitos, tropiezos, etc., etc., etc.

A todas las personas que han participado en mi crecimiento personal y profesional, gracias.

**Trabajo realizado con el apoyo del programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE204811 y UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218212.**

**El presente trabajo también fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Así mismo se agradece la valiosa colaboración de la Dra. Krimilda Valle y al Dr. Francisco J. Gómez por el apoyo con el producto CALSPORIN®.**

## RESUMEN

La capacidad de la microbiota gastrointestinal para modificar el pH, la permeabilidad intestinal y utilizar fuentes de nitrógeno alternativas, ha sido aprovechada mediante el empleo de probióticos buscando disminuir la concentración sérica de compuestos nitrogenados. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la concentración de urea, amoníaco y óxido nítrico en perros adultos de raza pequeña en mantenimiento complementados con el probiótico *Bacillus subtilis*. Se utilizaron 10 perros clínicamente sanos de 4 años en promedio y el mismo grupo de individuos fungió como grupo control. Cada sujeto experimental consumió alimento comercial clasificado como popular de forma racionada, a la par se proporcionó una dosis equivalente a  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias del microorganismo *Bacillus subtilis* (esporas) en presentación de tabletas durante un periodo de 8 semanas. Se realizaron muestreos sanguíneos al día 0, 15, 30, 45 y 60. Se obtuvo suero mediante centrifugación y posteriormente se realizó la determinación de los analitos urea y amoníaco en el equipo Vet Test 8008. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa observando un aumento de amoníaco entre el día 30 y 45 ( $P < 0.05$ ). Para el caso de la urea no se encontró ninguna diferencia ( $P > 0.05$ ). Para la determinación de especies reactivas de nitrógeno, se utilizó óxido nítrico como indicador mediante la cuantificación de nitratos y nitritos. Se obtuvo sangre completa que se procesó mediante la técnica de Griess, obteniendo diferencias que indican la reducción de dichos compuestos del día cero al día 60. Como conclusión, el probiótico *B. subtilis* no redujo la concentración sérica de amoníaco, demostrando poca eficiencia para utilizar dicha molécula como sustrato, en cambio se observó un aumento en la concentración sanguínea como resultado del metabolismo del nitrógeno del bacilo. La concentración de óxido nítrico mostró una reducción significativa pudiendo asociarse a una alta eficiencia de *B. subtilis* para emplearlo como sustrato y fuente de nitrógeno. Al final la complementación del probiótico resultó inocua para perros adultos en mantenimiento a la dosis y tiempo establecidos.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, probiótico, urea, amoníaco, especies reactivas de nitrógeno, perros sanos.

## ABSTRACT

The capacity of the gastrointestinal microbiota to modify the pH, intestinal permeability and use alternative sources of nitrogen, have been exploited by the use of probiotics to modify the serum concentration of nitrogen compounds. The study objective was to determine the urea, ammonia and nitric oxide concentrations in adult small breed dogs in maintenance supplemented with the *Bacillus subtilis* probiotic. The sample considered 10 clinically healthy dogs that were 4 years old on average. This same group was used as the study control group. Each experimental subject consumed commercial food classified as “popular” in controlled rations, at the same time, a *Bacillus subtilis* tablet dose equivalent to  $1 \times 10^{12}$  colony forming units of the microorganism (spores), was provided for a period of 8 weeks. After this, some blood samples at days 0, 15, 30, 45 and 60 were performed. The serum was obtained by centrifugation and subsequently the analyze determination in urea and ammonia were realized in Vet Test equipment. A statistically significant difference in ammonia between the 30 and 45 day ( $P < 0.05$ ) was obtained. In the urea case there was no difference found ( $P > 0.05$ ). In other part, for the reactive nitrogen species determination; the nitric oxide was used as an indicator of nitrates and nitrites quantification. Besides, complete blood was gotten from the sample to process into Griess technique where statistically and significant differences indicate the reduction of such compounds of zero day at day 60. In conclusion, the probiotic *B. subtilis* don't reduce the ammonia concentration showing little efficiency to use this molecule as a substrate, whereas an increase was observed in ammonia blood concentration resulting nitrogen metabolism bacillus. Nitric oxide concentration was significantly reduced, can be associated with a high efficiency of *B. subtilis* for use as a substrate and nitrogen source At the end of the probiotic supplementation was safe for adult dogs at maintenance doses and time.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, probiotic, urea, ammonia, reactive nitrogen species, healthy dogs.

## INDICE

1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes .....	2
1.1.1. Importancia de la microbiota gastrointestinal .....	2
1.1.2. Nutraceuticos .....	7
1.1.3. Probioticos .....	9
1.1.3.1. Mecanismos de acción .....	13
1.1.4. Uso de probióticos en la salud animal .....	15
1.1.5. Características de <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
1.1.6. Metabolismo del nitrógeno en <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
1.1.7. Importancia de la regulación de la concentración de urea y amoníaco en mamíferos .....	28
1.1.8. Importancia del óxido nítrico y el estrés oxidativo .....	31
1.1.9. Justificación .....	34
1.1.10. Hipótesis .....	34
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo general .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	35
<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>36</b>
3.1. Animales .....	36
3.2. Alimentación y complementación .....	36
3.3. Toma de muestras .....	39
3.4. Análisis estadístico .....	41
<b>4. Resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>7. Referencias .....</b>	<b>50</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>58</b>
8.1. ANEXO 1. Resultados de la bioquímica inicial realizada a los sujetos experimentales .....	58
8.2. ANEXO 2. Determinación de la ración de alimento a ofrecer diariamente .....	59
8.3. ANEXO 3. Descripción de la técnica de Griess .....	59

## INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Clasificación de las principales bacterias que conforman la microbiota en perros. .....	6
CUADRO 2. Análisis garantizado del alimento proporcionado durante la fase experimental. ....	36
CUADRO 3. Estimación de la energía metabolizable del alimento por factores <i>Atwater</i> modificados. ....	37
CUADRO 4. Promedio de la concentración sérica(mg/dL) de urea en perros adultos en mantenimiento complementados con probiótico <i>Bacillus subtilis</i> . ....	42
CUADRO 5. Medias de rangos de la concentración sérica (umol/L) de amoníaco en perros adultos en mantenimiento complementados con probiótico <i>Bacillus subtilis</i> . ....	43
CUADRO 6. Diferencia de medias de la concentración sérica de nitrato en perros adultos en mantenimiento complementados con probiótico <i>Bacillus subtilis</i> . ....	43



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de microorganismos gastrointestinales de perros y gatos en comparación con algunas especies de producción .....	2
Figura 2. Microbiota predominante en intestino grueso de perro .....	5
Figura 3. Prebióticos empleados en perros .....	7
Figura 4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> bacilo Gram positivo presente en el yogurt.....	9
Figura 5. Especies animales en las que más se han empleado probióticos .....	11
Figura 6. Principales mecanismos de acción de los probióticos .....	14
Figura 7. <i>Bacillus subtilis</i> : microorganismo formador de esporas (Tinción de Gram).....	15
Figura 8. Primer probiótico del género <i>Bacillus</i> empleado en animales.....	20
Figura 9. <i>Bacillus subtilis</i> colonias .....	22
Figura 10. Transporte de amoníaco y amonio a través de la membrana plasmática.....	26
Figura 11. Efecto del amoníaco en el sistema nervioso central.....	29
Figura 12. Mecanismos de los probióticos para disminuir el amoníaco sérico.....	30
Figura 13. Especies reactivas de nitrógeno .....	32
Figura 14. Presentación de tabletas con <i>Bacillus subtilis</i> .....	38
Figura 15. Obtención de muestras sanguíneas por venopunción .....	39
Figura 16. Procesamiento de muestra para determinación de urea y amoníaco.....	40
Figura 17. Equipo empleado para la técnica de Griess .....	40

## 1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos son susceptibles a desbalances de la microbiota gastrointestinal, la cual cumple con funciones diversas que permiten al organismo mantener la homeostasis. Cuando este equilibrio se rompe, puede presentarse signología que no es exclusivamente entérica, involucrando otros sistemas como el hepático, renal y nervioso. Debido a este riesgo potencial y con la finalidad de reducir el empleo de antibióticos, se ha optado por el uso de productos alternativos conocidos como nutraceúticos y probióticos (Suchodolski, 2011). Los probióticos son microorganismos vivos no patógenos con alta capacidad de colonización intestinal que se encuentran fácilmente en los fermentados como el yogurt y que actualmente se comercializan en numerosas presentaciones incluyendo la purificada. Han sido utilizados en humanos buscando beneficios positivos demostrables sobre todo cuando se presenta algún desbalance microbiano originado por un inadecuado manejo alimenticio o higiene excesiva (Musa *et al.*, 2009). Actualmente sus beneficios no solo se limitan a mejorar el tránsito gastrointestinal o la digestibilidad, sino también a reducir manifestaciones consecuentes a algunos otros trastornos (insuficiencia renal, insuficiencia hepática) como la hiperamonemia y el estrés oxidativo, asociándose a que el aparato digestivo tiene una conexión importante con otros sistemas gracias a su alta permeabilidad y capacidad de absorción (Cesaro *et al.*, 2011; Dhiman, 2013). Debido al éxito encontrado en varios estudios y en la búsqueda de los mecanismos que expliquen su función, se ha promovido su empleo en animales de compañía, sobre todo perros y gatos, tanto enfermos como sanos, con la idea de que confieren beneficios preventivos similares mejorando considerablemente la calidad de vida y disminuyendo el riesgo de enfermedad mediante la reducción de analitos tóxicos en sangre, así como de indicadores de estrés oxidativo (Fuller, 1989; Musa *et al.*, 2009). Por tanto, la finalidad de este estudio comprende la evaluación de un producto comercial (probiótico a base de esporas de *Bacillus subtilis*) sobre la concentración sérica de compuestos nitrogenados y su relación con la producción de especies reactivas en perros clínicamente sanos.

## 1.1 ANTECEDENTES

### 1.1.1. Importancia de la microbiota gastrointestinal.

Todos los animales placentarios en vida uterina se caracterizan por ser libres de microorganismos (Fuller, 1989). Una vez que pasan a través del canal de parto, adquieren microorganismos provenientes de la madre y del medio ambiente que se adhieren a la boca, piel, aparato urogenital y digestivo (Fuller, 1989; Kil *et al.*, 2011). En el caso de este último, se considera el principal sitio de colonización y conforma la microbiota gastrointestinal, específica para cada animal dependiendo de la dieta o de factores ambientales como la temperatura, humedad, tipo de suelo, etc. (Gill *et al.*, 2008; Suchodolski., 2011). De forma general en los mamíferos la microbiota se compone de microorganismos anaerobios y fermentadores (Fuller, 1989; Gill *et al.*, 2008; Innes *et al.*, 2007; Kil *et al.*, 2011).

Existen diferencias importantes en la concentración de microorganismos entre animales herbívoros, omnívoros y carnívoros (Figura 1), siendo menor en estos últimos (Ley *et al.*, 2008). En cachorros de perros y gatos la población bacteriana alcanza  $10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC) /g durante las primeras 24 horas de vida, con una proporción similar entre aerobias y anaerobias. La proporción de aerobias aumenta conforme avanza la edad. La diversidad microbiana es muy compleja, estimando que en la etapa adulta, la población llega a ser de  $10^{14}$  UFC (Suchodolski, 2011) con una variedad de 500 a 1000 especies (Kil *et al.*, 2011).



**Figura 1. Concentración de microorganismos gastro intestinales de perros y gatos en comparación con algunas especies de producción.**

De acuerdo con Suchodolski (2011), el tubo gastrointestinal es el órgano inmune más largo del organismo, continuamente está expuesto a microorganismos (bacterias, virus, hongos) endógenos y exógenos, algunos de los cuales son patógenos, es por ello que las funciones de microbiota a este nivel, están determinadas por un trabajo simbiótico (Kil *et al.*, 2011), y se basan en el mantenimiento de los procesos nutricionales, de desarrollo y de defensa, dando como resultado general, una mayor resistencia a infecciones. Hooda *et al.*, (2012), también mencionan que estos efectos han sido atribuido a mecanismos de acción que incluyen: el antagonismo bacteriano, efecto barrera, competencia por nutrientes u oxígeno, resistencia a la colonización y exclusión competitiva mediante la creación de un ambiente restrictivo. Además, los microorganismos son capaces de degradar compuestos no aprovechables por el huésped, formando así productos de la fermentación endógena y que son utilizados por las células epiteliales del tubo gastrointestinal. Dentro de estos compuestos se incluyen los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) en mayor proporción, seguidos de los ácidos grasos ramificados (isobutírico e isovalérico) (Kil *et al.*, 2011; Sauter *et al.*, 2005).

La importancia de la microbiota en animales sanos, se ha observado a través de estudios en animales libres de patógenos (Suchodolski, 2011). Estos animales tienen un sistema inmune menos desarrollado, con menor cantidad de IgA plasmática y de inmunoglobulinas a nivel gastrointestinal, además se observan alteraciones en la morfología intestinal, que en conjunto, incrementa la susceptibilidad a enfermedades (Gill *et al.*, 2008). La falta de microorganismos gastrointestinales, eleva los requerimientos de energía y vitaminas como la K y el complejo B en la dieta (Kil *et al.*, 2011). La lámina propia de roedores nacidos libres de patógenos demostró ser más delgada y con un número reducido tanto de placas de Peyer como de folículos linfoides, en comparación con animales nacidos bajo exposición ambiental (Suchodolski., 2011). O'Mahony *et al* (2009) y Suchodolski (2011) detectaron un menor desarrollo del sistema linfoide en perros nacidos libres de patógenos, esto se reflejó en una baja concentración de inmunoglobulinas, aunque esto no demostró comprometer la respuesta inmune.

Kil *et al* (2011) mencionan que las comunidades microbianas pueden clasificarse de forma general en tres categorías: los comensales o microbiota normal (que ayudan a digerir compuestos indigestibles para el huésped y a evitar la colonización de patógenos), los patógenos (capaces de producir una alteración negativa importante en el huésped) y los oportunistas (microorganismos que forman parte de la microbiota normal, pero bajo ciertas condiciones desfavorables para el huésped, actúan como patógenos). Debido a la constante interacción que existe entre todos los microorganismos, es importante mantener un ecosistema microbiano en equilibrio para la salud del hospedero (Borchers *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2008).

Las especies bacterianas del tubo gastrointestinal, varían dependiendo de la región que colonicen y en base a las condiciones prevalentes de cada una de ellas (Suchodolski., 2011; Kil *et al.*, 2011; Mentula *et al.*, 2005).

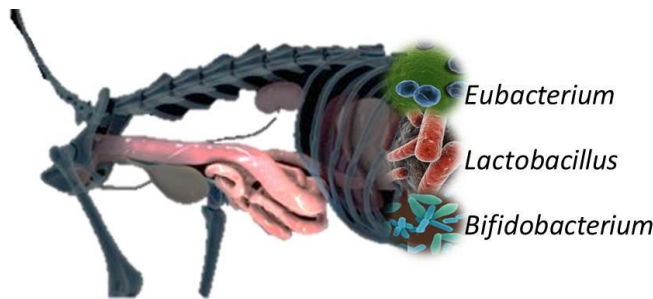
En la cavidad oral de perros y gatos coexisten especies aerobias y anaerobias que alcanzan hasta  $10^7$  UFC/ ml de fluido. Las enfermedades periodontales en estos animales de compañía, están relacionadas con desbalances de la microbiota, sobre todo ante el crecimiento de especies del género *Streptococcus*, *Fusobacterium* y de Espiroquetas (Kil *et al.*, 2011).

A nivel estomacal, la población bacteriana es menor ( $10^4$  a  $10^5$  UFC/g; Kil *et al.*, 2011). Esta reducción en el número de bacterias a comparación de la cavidad oral, debido al pH ácido del ambiente, desfavorable para muchos microorganismos (Kil *et al.*, 2011). La proporción entre bacterias aerobias y anaerobias es similar, predominando las bacterias gram-positivas. Es posible encontrar *Helicobacter* spp, *Lactobacillus* y *Streptococcus* adheridos a la mucosa gástrica (Suchodolski., 2011).

En el intestino delgado, el número de bacterias incrementa de  $10^5$  y hasta  $10^7$  UFC/g de contenido conforme se avanza del duodeno al yeyuno (Suchodolski., 2011). Las especies anaeróbicas más representativas son: *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Innes *et al.*, 2007). Por su parte, las

especies aerobias o anaerobias facultativas incluyen: *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Pasteurella*, *Escherichia* y *Enterobacter* (Kil *et al.*, 2011; O'Mahony *et al.*, 2009).

Por otra parte, el intestino grueso se caracteriza por poseer la mayor carga bacteriana ( $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/g). Se han diferenciado 84 especies bacterianas y 5 géneros fungales a partir de cultivos de contenido cecal de perros (Kil *et al.*, 2011). Las más representativas incluyen a las gram-negativas aeróbicas y anaeróbicas que pueden o no tener capacidad de esporular: *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Figura 2), especies que representan hasta el 90% de la población total (Kerr *et al.*, 2013; Kil *et al.*, 2011)



**Figura 2. Microbiota predominante en intestino grueso de perro.**

Se han cultivado a partir de heces especies como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium* (Beasley *et al.*, 2006).

Entre las bacterias con potencial patógeno, capaces de atacar la superficie intestinal mediante la invasión y producción de toxinas, se enlistan: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Klebsiela pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter spp*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* enteropatógena (Hooda *et al.*, 2012; Kil *et al.*, 2011).

Las especies bacterianas presentes en el tubo gastrointestinal varían dependiendo de la dieta que consume el animal (Biagi *et al.*, 2007; Kil *et al.*, 2011), aquellos animales que consumen mayor cantidad de fibras (fructooligosacáridos por ejemplo) tienen un mayor

crecimiento de especies que pertenecen al filo Firmicutes y Spirochetes, mientras que en aquellos animales carnívoros, que consumen mayores cantidades de grasas y proteínas con bajas proporciones de carbohidratos (Biagi *et al.*, 2007), la microbiota es sumamente diversa (Cuadro 1), sobre todo la perteneciente al phylum *Bacteroidetes* (Kerr *et al.*, 2013; Mentula *et al.*, 2005).

**Cuadro 1. Clasificación de las principales bacterias que conforman la microbiota en perros.**

<b>Phylum</b>	<b>Orden</b>	<b>Género</b>
<b>Firmicutes</b>	Lactobacilales	<i>Lactobacillus</i>
	Clostridiales	<i>Ruminococcus, Blautia</i>
	Erysipelotrichales	<i>Catenibacterium</i>
<b>Bacteroidetes</b>	Bacteroidales	<i>Bacteroides, Prevotella</i>
<b>Actinobacteria</b>	Coriobacteriales	Varios
	Bifidobacteriales	<i>Bifidobacterium</i>
<b>Proteobacteria</b>	Varios	Varios
<b>Fusobacteria</b>	Fusobacteriales	<i>Fusobacterium</i>

Editado de Garcia-Mazcorro *et al.*, 2013

Biourge *et al* (1998); Gill *et al* (2008) y Kerr *et al* (2013), mencionan que la microbiota se estabiliza rápidamente por sí misma, pero existen factores endógenos (disponibilidad de nutrientes, dieta, diarreas, etc.) y exógenos (antibióticos, higiene extrema, estrés, etc.), que influyen en el equilibrio (Gill *et al.*, 2008; Suchodolski., 2011) de forma importante y pueden ocasionar disbiosis: cambio o sobrepoblación de la microbiota normal (Eamonn *et al.*, 2006; Hooda *et al.*, 2012), lo cual lleva a la presentación de diarreas crónicas y enfermedad inflamatoria intestinal (Innes *et al.*, 2007). Las enfermedades crónicas como el cáncer, la obesidad o la diabetes también pueden desencadenar desequilibrios (Hooda *et al.*, 2012).

### ***1.1.2. Nutraceuticos***

Las condiciones de vida actuales, tales como el continuo estrés, inadecuados hábitos alimenticios o de limpieza, así como la creciente incidencia de enfermedades crónicas, contribuyen a un desequilibrio de la microbiota, por lo que se buscan alternativas preferentemente naturales para restablecer el balance y la homeostasis de la microbiota gastrointestinal (Gill *et al.*, 2008). Los nutraceuticos son sustancias presentes en algunos alimentos que confieren efectos benéficos en los individuos que los consumen y dentro de los que se pueden encontrar entre otros, a los prebióticos (Fuller, 1989).

Los prebióticos se han definido como ingredientes alimenticios no digeribles pero fermentables a nivel colónico que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas del tubo gastrointestinal, sobre todo lactobacilos y bifidobacterias (Eamonn *et al.*, 2006). Son una estrategia muy utilizada para modular la microbiota gastrointestinal (Figura3), resaltando el empleo de fructanos como el extracto de chicoria, inulina, oligofruktosa y fructooligosacáridos (Hooda *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2010).

De acuerdo con Hooda *et al* (2012) y Kerr *et al* (2013), la efectividad de los prebióticos en perros incluye la evaluación de la puntuación fecal (en escala de 7 puntos, en donde 1 equivale a heces muy duras y 7 a heces líquidas), el pH, cultivo de microbiota y la producción de productos finales de la fermentación (ácidos grasos volátiles).



**Figura 3. Prebióticos empleados en perros.**



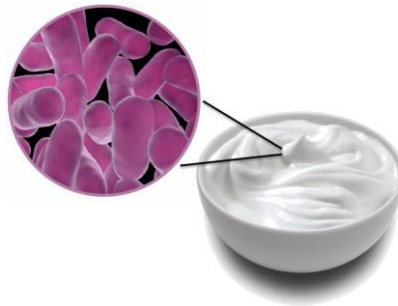
Así mismo se han empleado compuestos microbianos con capacidad de modificar la microbiota gastrointestinal y desencadenar un beneficio sobre la salud del individuo que los consume, ocasionalmente se han llegado a englobar dentro de los nutraceuticos (Fuller., 1989).

Los simbioticos, se consideran una combinación de prebioticos y probioticos que pueden proveer al animal efectos benéficos en su salud mediante un efecto sinérgico (Musa., *et al*; 2009).

El efecto de los probioticos también puede ser potencializado en diferentes formas mediante la adición de otros compuestos, ejemplos de ello incluyen la combinación con ácidos orgánicos, los cuales promueven el crecimiento de bacterias benéficas (Musa *et al.*, 2009; Bomba *et al.*, 2002). Al combinarse con antibioticos puede existir el riesgo de sobre crecimiento de bacterias resistentes, translocación bacteriana y posterior septicemia, aunque también se refiere que tras el empleo específico de *L. casei*, *L. acidophilus*, y *L. bulgáricus* adicional a la antibioterapia, se puede prevenir el incremento en el número de bacterias resistentes a la ampicilina, así como su translocación (Bomba *et al.*, 2002). Algunas especies bacterianas (*L. casei* y *L. plantarum*) también tienen la capacidad de unirse a elementos minerales, por lo que al combinarlas, por ejemplo, con magnesio, garantizan su viabilidad y crecimiento en el medio intestinal (Musa *et al.*, 2009), por otra parte, algunas levaduras y lactobacilos son capaces de utilizar el selenio para su crecimiento produciendo una forma orgánica a partir de la inorgánica, hecho que se ha aprovechado mediante la comercialización de levaduras y lactobacilos enriquecidos con selenio, permitiendo complementar el elemento mineral con una mayor biodisponibilidad (Bomba., *et al*; 2002).

### 1.1.3. Probióticos

Metchnikoff (microbiólogo), en 1907, propuso la hipótesis de que las bacterias colónicas eran capaces de afectar la salud mediante intoxicación en humanos. Así mismo, planteó que la longevidad de los campesinos búlgaros, se debía a que consumían en sus dietas una alta cantidad de productos fermentados de la leche, que se caracterizan por tener una alta cantidad de microorganismos con potencial benéfico (Gill *et al.*, 2008). La primera especie bacteriana detectada en estos fermentados fue *Lactobacillus acidophilus* LA2, (Figura 4) posteriormente se detectó la participación de *Lactobacillus casei*, *Bacillus animalis* y *Bifidobacterium bifidum* (Donohue., 2006). Para comprobar su efecto, un grupo de voluntarios consumió yogurt con las especies *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidus bifidum* por un periodo de 26 días totales, se encontró un aumento en el conteo bacteriano en heces y una disminución de coliformes, pasando de una proporción bifidum: coliforme 1:4 a una proporción 1:2 (Chen *et al.*, 1999; Gill *et al.*, 2008). El yogurt se considera una fuente importante de energía y de nutrientes debido a las especies bacterianas que contiene, incluyendo una adecuada cantidad de proteína, grasa, zinc, fósforo, calcio y vitaminas del complejo B (Reid *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2008).



**Figura 4. *Lactobacillus acidophilus* bacilo Gram positivo presente en el yogurt.**

Años más tarde (1920) los alimentos para consumo humano fueron adicionados con microorganismos que actúan como probióticos, sobre todo en Japón, siendo *Lactobacillus*

*acidophilus* y *Lactobacillus casei* las especies representativas para dicho fin. Con el paso del tiempo y los cambios en los estilos de vida, estos complementos han ido introduciéndose a más productos comerciales, como jugos, chocolates y algunos productos cárnicos (Musa *et al.*, 2009). En la industria de productos para consumo animal pueden encontrarse diferentes presentaciones, formando parte de peletizados, croquetas o granulados, así como encapsulados o tabletas con preparaciones de diversas especies bacterianas específicas (Fuller., 1989; Musa *et al.*, 2009).

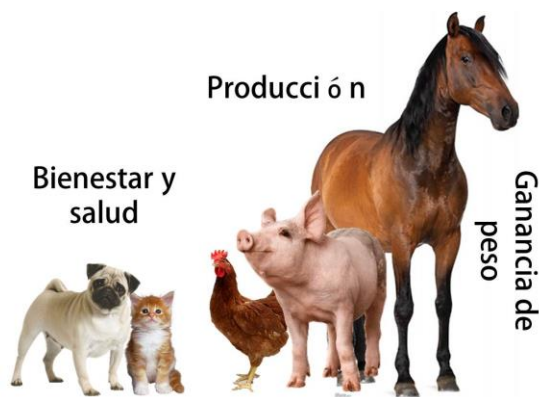
La palabra probiótico tiene origen griego y significa “a favor de la vida” (Eamonn *et al.*, 2006). Estos complementos, también llamados alimentos funcionales cuando se presentan formando parte de un alimento como el yogurt (Cartman *et al.*, 2008) , pueden definirse como microorganismos vivos, muertos o sus derivados (Adams., 2010) que son utilizados como un complemento nutricional para proveer efectos benéficos (Biagi *et al.*, 2007) por interacción o directos en el organismo que los consume, siempre y cuando se proporcionen en dosis adecuadas (Anadón *et al.*, 2006; Borchers *et al.*, 2009), interviniendo en el balance microbiano gastrointestinal (Adams., 2010; Fuller., 1989; Reid *et al.*, 2003).

Una de las principales dudas que han surgido a lo largo del estudio de los probióticos, es si requieren estar vivos para ejercer su efecto (Adams., 2010). Actualmente se sabe que pueden emplearse muertas o mediante sus derivados, tales como: ácido teicóico (componente de la membrana celular), peptidoglicanos, lipopolisacáridos o ADN, teniendo efectos favorables similares (Adams., 2010). Esto tiene como ventaja evitar el desarrollo de enfermedades en pacientes inmunocomprometidos, debido a que existen reportes en los que se ha demostrado el riesgo de bacteriemias ante el excesivo empleo de microorganismos vivos (0.29 casos por 100,000 personas al año) o debido a la producción de enterotoxinas (Donohue., 2006), sobre todo en el caso de *Bacillus cereus* (Hong *et al.*, 2008). Actualmente también se sabe, que estos productos debidamente administrados, pueden proveer efectos favorables en pacientes con SIDA, mejorando el sistema inmune y aliviando episodios de diarrea (Reid., 2010).

Para que un microorganismo pueda clasificarse como un probiótico es indispensable que no tenga potencial patógeno (Beasley *et al.*, 2006), no degrade la mucosa intestinal (Perelmuter *et al.*, 2008), no transfiera genes de resistencia a antibióticos, no se conjugue con ácidos biliares, sea susceptible a antibióticos, sobreviva al medio (Musa *et al.*, 2009) gastrointestinal (cambios de pH y osmolaridad), pueda multiplicarse y colonizar el epitelio intestinal (Borchers *et al.*, 2009), se adhiera fácilmente a las células epiteliales y al moco intestinal (Perelmuter *et al.*, 2008), logre crecer en medios aerobios y anaerobios para soportar los métodos de manejo- manufactura y adicionalmente tenga alguna propiedad benéfica como la producción de sustancias antimicrobianas (Anadón *et al.*, 2006; Perelmuter *et al.*, 2008).

Si la dosificación no es la adecuada se pueden causar efectos secundarios negativos como infecciones sistémicas, interferencia en el metabolismo, estimulación excesiva del sistema inmune y transferencia de genes (Musa *et al.*, 2009).

Los probióticos se han empleado en animales (sobre todo mascotas, caballos, pollos y cerdos) a partir de tiempos recientes como tratamientos “naturales” o alternativos (Strompfová *et al.*, 2006) y principalmente con un enfoque productivo (Figura 5), actuando de forma variable como promotores de crecimiento, reemplazando en ocasiones el uso de antibióticos con la finalidad de disminuir la resistencia creada a partir de su empleo excesivo y sustituyendo algunos productos químicos (Musa *et al.*, 2009; Perelmuter *et al.*, 2008).



**Figura 5. Especies animales en las que se han empleado probióticos.**

A lo largo de los años se ha estudiado el efecto positivo de los probióticos como lactobacilos, en la ganancia de peso diaria y la conversión alimenticia en cerdos y pollos (Fuller, 1989). En rumiantes los probióticos mejoran la degradación de la celulosa y garantizan una síntesis proteica de excelente calidad, por lo que se aumenta la absorción de algunos nutrientes y se refleja en una mejor ganancia de peso (Fuller., 1989; Musa *et al.*, 2009). Así mismo, se han empleado para mejorar la producción de leche, el contenido de grasa y proteína. Además, en conejos se ha observado una disminución en la mortalidad y morbilidad durante la etapa de crecimiento y engorda tras su empleo.

La industria cárnica también se beneficia tras el uso de probióticos, evitando el uso de productos químicos y aumentando la calidad del producto (Perelmuter *et al.*, 2008). En la fermentación de embutidos se ha utilizado *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*; para controlar la acidificación y consistencia del producto, evitando el crecimiento de microorganismos no deseados (Musa *et al.*, 2009). La producción y calidad de huevo también ha sido beneficiada a causa del empleo de este complemento, aumentando el grosor del cascarón (Perelmuter *et al.*, 2008).

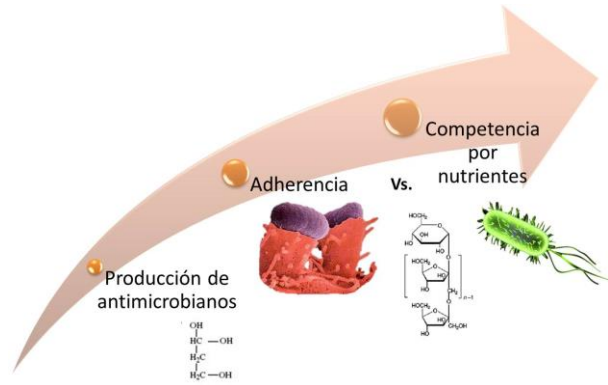
A pesar de los múltiples beneficios que se han encontrado tras su complementación, es importante considerar que existen diversos factores que pueden estar involucrados en su efectividad, tales como la dieta base que se proporciona a los animales, el estrés al que estén sometidos y la dosis que se emplea para garantizar la viabilidad de la especie microbiana (Adanón *et al.*, 2006; Fuller., 1989). Así mismo, no pueden pasarse por alto las desventajas que aún existen ante su empleo y que derivan del desconocimiento de su farmacocinética, farmacodinamia, dosis óptimas, seguridad de uso y riesgo de adquirir resistencia microbiana. En Estados Unidos actualmente existe una lista de especificaciones que deben incluirse en los productos comerciales que utilizan probióticos en su fórmula, debiendo contener: la cepa empleada, fórmula química, especie o categoría animal, edad máxima de uso, contenido mínimo de UFC/g y periodo de autorización, entre otros (Donohue., 2006).

### ***1.1.3.1. Mecanismos de acción***

Los efectos benéficos de estos nutraceuticos se clasifican en categorías, las cuales se resumen en (Figura 6):

1. **Supresión de microorganismos patógenos.** Este mecanismo se ha demostrado en humanos, pollos y cerdos. Se subdivide de acuerdo al mecanismo que se utilice en la eliminación de bacterias no deseadas:
  - a) *Producción de sustancias antimicrobianas:* Las sustancias antimicrobianas (Beasley *et al.*, 2006) o bacteriocinas, por lo regular se asocian a metabolitos primarios capaces de alterar el pH citoplasmático modificando así la capacidad de sobrevivencia de ciertos microorganismos (Anadón *et al.*, 2006). Los lactobacilos por ejemplo, producen péptidos antimicrobianos como la reuterina (Perelmuter *et al.*, 2008). Los bacilos producen péptidos como la gramicidina S, tirocidina y bacilomicina (Ghai *et al.*, 2007).
  - b) *Competencia por sitios de adherencia:* Es un método preventivo que evita la proliferación de bacterias patógenas, se basa en la capacidad de las bacterias probióticas de adherirse con mayor efectividad que las bacterias patógenas a sitios específicos de la superficie intestinal (Reid *et al.*, 2003; Rinkinen *et al.*, 2003). El principal problema relacionado con este mecanismo, es el probable riesgo de que dicha capacidad de adherencia promueva el sobre crecimiento y desencadene un efecto patógeno (Rinkinen *et al.*, 2003).
  - c) *Competencia por nutrientes* (Herstad *et al.*, 2010): Aunque no ha sido demostrado completamente, se ha podido observar *in vitro* que ciertas especies microbianas son más eficientes que otras en la utilización de determinadas fuentes de carbono, aunque todo depende de las alteraciones

del medio intestinal. (Adams., 2010; Fuller., 1989; Strompfova *et al.*, 2006)



**Figura 6. Principales mecanismos de acción de los probióticos.**

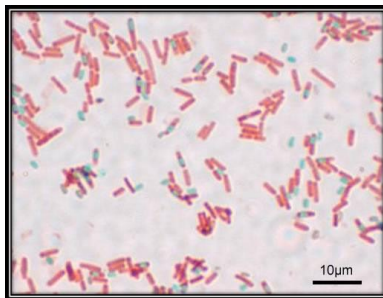
Cualquiera de los mecanismos antes mencionados promueve una reducción en la inflamación intestinal (Eamonn *et al.*, 2006) ante episodios de disbiosis, debido a que al evitar el crecimiento de bacterias o virus patógenos se reduce el riesgo de daño epitelial (Reid *et al.*, 2003).

2. **Alteración del metabolismo.** Se fundamenta en la regulación positiva o negativa de la actividad enzimática. De acuerdo a un estudio realizado por Goldin *et al* (1984), en humanos que consumieron *Lactobacillus acidophilus* existió supresión en la actividad de las enzimas  $\beta$ - glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa, relacionadas con la conversión de carcinógenos. Un efecto similar se observó en la respuesta enzimática de ratas complementadas con la misma especie de probiótico (Fuller, 1989). También hay reportes que mencionan la capacidad de reducir las actividades metabólicas que producen sustancias tóxicas y las citocinas pro inflamatorias. (Anadón *et al.*, 2006; Casula *et al.*, 2002; Fuller., 1989).
3. **Estimulación del sistema inmune** (Herstad *et al.*, 2010). El incremento de los niveles de anticuerpos o de la actividad de los macrófagos se ha demostrado en animales expuestos naturalmente al medio ambiente contra animales libres

de patógenos (Strompfová *et al.*, 2006). Se ha comprobado un aumento en los niveles de anticuerpos de ratones libres de patógenos alimentados con yogurt, relacionando a los lactobacilos en la estimulación de la actividad fagocitaria (Borchers *et al.*, 2009), considerando por tanto a este producto como una excelente fuente de microorganismos probióticos. Así mismo ha sido posible demostrar el efecto inmunoestimulante del empleo de levaduras como probióticos. (Casula *et al.*, 2002; Fuller., 1989; Strompfová *et al.*, 2006).

#### ***1.1.4. Uso de probióticos en la salud animal***

En la actualidad se ha modificado la perspectiva acerca de las bacterias, dejando de considerarse como organismos unicelulares poco útiles y demostrando que son capaces de producir señales moleculares que alteran la expresión de genes mediante una comunicación inter-celular (Williams *et al.*, 2007). Las bacterias Gram negativas se comunican mediante moléculas pequeñas como lactonas y quinolonas, mientras que las Gram positivas se valen de moléculas más complejas (Williams., 2007) como los péptidos (péptido isoprenilado ComX y el factor estimulante de esporulación de *Bacillus subtilis*). En la Figura 7 se muestra una microfotografía de la especie *Bacillus subtilis*.



**Figura 7. *Bacillus subtilis*: microorganismo formador de esporas (Tinción de Gram).**

Son numerosas las especies bacterianas que se han utilizado como probióticos, pero las más representativas incluyen a especies Gram positivas de los géneros *Lactobacillus* y



*Bifidobacterium*. Los lactobacilos son bacterias no esporuladas, sin motilidad y no reductoras del nitrato. Las especies más utilizadas en humanos son: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus* y *L. plantarum* (Gill *et al.*, 2008). Por su parte, las bifidobacterias son Gram positivas, no formadoras de esporas y que se agrupan en mazos. Las especies más comúnmente utilizadas en humanos incluyen: *B. animalis*, *B. longum*, *B. bifidus* y *B. infantis*. Otras especies bacterianas que se estudian actualmente son: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* (Fuller., 1989; Musa *et al.*, 2009).

En humanos, los estudios realizados sobre su efectividad son diversos e incluyen el abordaje de múltiples áreas. En niños por ejemplo, se han utilizado para el control de problemas gastrointestinales como la enterocolitis necrosante, que es una enfermedad de alta mortalidad causada por bacterianas patógenas como *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, entre otros; comprobando que la presencia de bacterias no patógenas como lactobacilos o bifidobacterias, disminuyen la incidencia de necrosis. (Reid *et al.*, 2003)

El síndrome de colon irritable es un padecimiento común, el cual se caracteriza por la presencia de dolor, distensión abdominal y alteración de la microbiota, causada por el uso de antibióticos o una inadecuada inmunomodulación. El microorganismo mayormente asociado a este síndrome es *E. coli*, quien promueve una inflamación como consecuencia en el incremento de células enterocromafines y linfocitos T, aumento en la permeabilidad intestinal, aumento del tiempo de tránsito colónico y anormalidades inmunológicas diversas. Debido a que especies como lactobacilos y bifidobacterias modifican las anteriores alteraciones, se ha implementado su uso como probiótico para el control y manejo de este trastorno gastrointestinal. (Reid *et al.*, 2008)

Otro de los problemas gastrointestinales, se relaciona con la presencia de *Helicobacter pylori*. Esta bacteria Gram negativa produce úlceras gástricas y es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (Reid *et al.*, 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que su crecimiento y actividad ureásica (siendo la urea producida para propiciar en medio apto para el crecimiento) se inhiben ante la presencia de bacterias ácido lácticas; se plantea la

posibilidad de que compiten con *Helicobacter pylori* por receptores glicolipídicos (Reid *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2008).

*Bifidobacterium animalis*, sobrevive a las condiciones gastrointestinales, reduciendo el tiempo del tránsito colónico en mujeres adultas sanas. *Lactobacillus* Rosell 52 y Rosell 11 administrado en niños, reduce la diarrea y producción de toxinas originadas por clostridios. Un yogurt que contiene *L. rhamnosus* y *L. reuteri*, promovió beneficios antiinflamatorios en pacientes con colon irritable, correlacionándose con un decremento en la concentración de factor de necrosis tumoral (FNT) e interleucina 12 (Reid *et al.*, 2008).

Algunos otros beneficios generales reportados en humanos, incluyen una mejor tolerancia a la lactosa en personas con intolerancia a dicho carbohidrato cuando consumen yogurt, debido a la presencia de la enzima bacteriana  $\beta$ -galactosidasa (Reid *et al.*, 2003). Así mismo se ha observado una mejora en problemas de constipación debido al estímulo intestinal y para el tratamiento de infecciones a nivel del aparato urinario (Perelmuter *et al.*, 2008).

Gill *et al.*, 2008 demostraron que *Lactobacillus bulgaricus* produce sustancias con efecto antitumoral. Estas propiedades anticancerígenas se resumen en tres categorías: a) inhibición de células tumorales, b) supresión de enzimas bacterianas ( $\beta$ - glucosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa y azoreductasa), responsables de la liberación de carcinógenos y c) destrucción de carcinógenos como las nitrosaminas, así como la supresión de la nitroreductasa, involucrada en la síntesis de nitrosaminas. También se ha observado una menor incidencia de cáncer intestinal y de vejiga en personas que consumen frecuentemente yogurt, debido a la presencia de *Lactobacillus casei* y *L. rhamnosus* (Fuller., 1989; Reid *et al.*, 2003).

*L. casei*, incrementa la actividad de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) a nivel mesentérico, aumenta la actividad fagocitaria a nivel peritoneal, así como el número de leucocitos sanguíneos en ratones. Una sobre estimulación desencadena la liberación exagerada de neutrófilos y citocinas inflamatorias, por lo que los efectos a nivel de sistema inmune no siempre son benéficos, siendo entonces de suma importancia considerar la dosis del probiótico a utilizar y el tiempo de consumo (Reid *et al.*, 2003).

También se ha mencionado que los probióticos en general tiene la capacidad de reducir los niveles séricos de colesterol, sobre todo tras consumir yogurt. La teoría que se maneja, es que aquellos productos fermentados que presentan especies bacterianas consideradas benéficas, contiene metabolitos bacterianos que inhiben la síntesis de colesterol corporal, sin embargo, los resultados han sido variables, por lo que no se puede concluir ni a favor ni en contra hasta el momento (Gill *et al.*, 2008).

En animales, las especies bacterianas más empleadas incluyen: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici* (Strompfová *et al.*, 2004). No solo las bacterias pueden actuar como probióticos, algunas levaduras y hongos han sido utilizadas con éxito en pollos, cerdos y rumiantes, tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* (Anadón *et al.*, 2006; Musa *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2008).

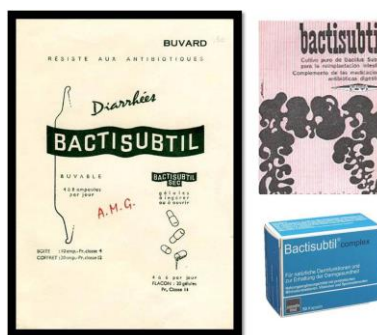
En perros y gatos, el empleo de probióticos está enfocado a mejorar la salud y calidad de vida debido a la función social que tienen actualmente dichas especies animales. Hoy por hoy se encuentran en el mercado una amplia variedad de productos comerciales con actividad probiótica (Strompfová *et al.*, 2006), siendo principalmente para consumo humano y que son administrados de forma indiscriminada a estas especies de compañía, por lo que uno de los aspectos que aún debe ser investigado a mayor profundidad es la dosis adecuada para administrar en función al tamaño y peso corporal e intestinal de dichos animales (Borchers *et al.*, 2009; Perelmutter *et al.*, 2008).

También se ha reportado el uso de especies microbianas específicas, generalmente aisladas de heces de animales y que incluyen lactobacilos, bacilos, enterococos y bifidobacterias, especies con alta capacidad de adherencia y nulo riesgo patógeno. *Enterococcus faecium* en cachorros, incrementó la concentración plasmática de IgA (Suchodolski., 2011). En perros adultos, la mezcla de tres especies de *Lactobacilos*, mostró un efecto regulador en la expresión de citocinas a través de la regulación de células T como tratamiento para enteropatías crónicas (Sauter *et al.*, 2005).

*Lactobacillus murinus*, una de las especies dominantes de la microbiota intestinal del perro, también ha sido empleado como probiótico. Este microorganismo se caracteriza por ser resistente a pH de 2.5-3 y a las sales biliares, tiene actividad microbiana *in vitro* en contra *E.coli* y *C. Prefringens*, siendo necesario realizar estudios *in vivo* para conocer si sería posible emplearlo para disminuir la utilización de antibióticos en el tratamiento y prevención de infecciones gastrointestinales (Perelmutter *et al.*, 2008). *Lactobacillus murinus* ha sido probado en cerdos, donde mostró una excelente capacidad de adherencia al epitelio intestinal. En ratones, previno la infección de *Proteus mirabilis* en vías urinarias (Perelmutter *et al.*, 2008).

A pesar de sus beneficios, los probióticos pueden tener efectos adversos. En Finlandia, *Enterococcus faecium*, empleado como producto farmacéutico en perros, aumentó la adhesión y colonización de *Campilobacter jejuni*, microorganismo involucrado en procesos entéricos (Beasley *et al.*, 2006; Rinkinen *et al.*, 2003; Strompfová *et al.*, 2004). Además *Enterococcus* se relaciona con enfermedades nosocomiales, lo cual puede volverlo patógeno si no se emplea adecuadamente (Strompfová *et al.*, 2004).

El género *Bacillus* ha sido empleado en la alimentación animal. Se comercializa principalmente en su forma esporulada que le confieren mayor resistencia a condiciones adversas y mejor viabilidad. El primer producto comercial que contuvo a este microorganismo fue el Bactisubtil® (Figura 8), de origen francés y aprobado en los años 50's (Biourge *et al.*, 1998). Otro producto comercial más reciente (Paciflor, Prodeta, Vannes, France) fue probado en perros a la dosis recomendada de 10<sup>6</sup> UFC/g durante un periodo de complementación de 3 semanas, dicho estudio confirmó la resistencia de la bacteria al proceso de extrusión así como su capacidad de sobrevivencia al tubo gastrointestinal al ser posible aislarla en las heces de los sujetos experimentales. Su capacidad de colonización y efecto sobre parámetros como la ganancia de peso entre otros, ha sido probada en ratones, conejos, cerdos, pollos, pavos, patos y caballos. También ha presentado beneficios en el control de diarreas (Biourge *et al.*, 1998; Casula *et al.*, 2002).



**Figura 8. Primer probiótico del género *Bacillus* empleado en animales. Editado de:**

*<http://www.delcampe.net/boutiques/kikila>*

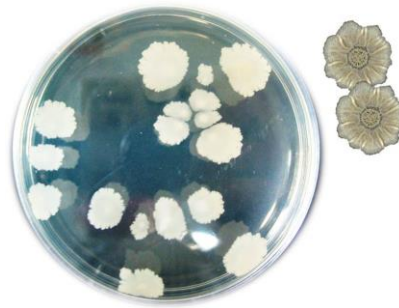
Es importante mencionar que a pesar de los beneficios conferidos al empleo de los probióticos, su efectividad depende de factores diversos entre los que se encuentran las características individuales del paciente, el sexo, la duración del tratamiento, así como la dosis y forma de administración (Reid *et al.*, 2008).

### ***1.1.5. Características de *Bacillus subtilis****

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, no patógena, catalasa positivo, habitante natural del suelo y medios acuáticos (Earl *et al.*, 2008), de distribución amplia (Espinosa de los Monteros., 2005; Green *et al.*, 1999; Schyns *et al.*, 2013), pero sobre todo en aceites y materia orgánica, razón por la que es común encontrarla entre la microbiota entérica de aves, mamíferos y humano (Fujiya *et al.*, 2007).

Dentro de las principales características de *B. subtilis* (Figura 9) se encuentra su capacidad de esporular ante condiciones de estrés, siempre y cuando encuentre nitrato, fósforo y glucosa (Espinosa de los Monteros., 2005; Fisher., 1999; Moore *et al.*, 2004; Sonenshein., 2000), crecer en intervalos amplios de temperaturas (15 y hasta 55 °C), ser móvil, tener alta velocidad de crecimiento, sobrevivir a condiciones salinas de 7% de NaCl (Espinosa de los Monteros., 2005) , producir antibióticos como subtilina, subtilosina y sublacina (Ouoba *et al.*, 2006), y enzimas hidrolíticas extracelulares que le permiten utilizar otros sustratos disponibles en el medio ambiente (incluso en condiciones anaerobias), dentro de las que se

encuentran la subtilisina que es una proteasa alcalina (aprE) y una proteasa neutra (NprE), que también produce óxido nítrico sintetasa. Así mismo puede hidrolizar el almidón y la caseína (Green *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1998).



**Figura 9. *Bacillus subtilis* colonias.** Editado de:  
[http://www.horticulturablog.com/2013/01/estrategias-ecologicas-de-produccion\\_15.html](http://www.horticulturablog.com/2013/01/estrategias-ecologicas-de-produccion_15.html)

Su membrana está formada en su mayoría por fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol (Aguilar *et al.*, 2007). Los residuos son principalmente de ésteres de lisina y cardiolipina. Esta última se sintetiza a partir del fosfatidilglicerol y se ha demostrado que se acumula bajo condiciones de anaerobiosis debido a que su degradación se ve inhibida. La razón de dicho efecto es desconocida. (Aguilar *et al.*, 2007; Carballido *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 1998). También se ha descubierto que produce un homólogo de actina, molécula esencial para la coordinación de la división celular (Carballido *et al.*, 2007).

Aunque el oxígeno es el mejor aceptor de electrones para el crecimiento aeróbico, *Bacillus subtilis* (Espinosa de los Monteros., 2005; Hoffmann *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 1998), ha desarrollado adaptaciones que le permiten utilizar aceptores finales de electrones a los nitratos y nitritos, de forma alterna también es capaz de fermentar la glucosa, piruvato y mezcla de aminoácidos (Arp *et al.*, 2003; Earl *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 1998). Este metabolismo de fermentación ácido mixto tiene como resultado la formación de ácido

acético, ácido láctico, acetoína y butanodiol (Espinosa de los Monteros., 2005; Nakano *et al.*, 1998).

Debido a que las esporas de *B. subtilis* se asocian a la materia vegetal (Fujiya *et al.*, 2007), pueden ser ingeridas fácilmente atravesando sin dificultad la barrera estomacal alcanzando el intestino delgado (yeyuno e íleon específicamente) en donde el pH y la presencia de carbohidratos y péptidos entre otros nutrientes, inducen la germinación (Earl *et al.*, 2008; Schyns *et al.*, 2013; Tam *et al.*, 2006). También ha sido posible aislar esporas 14 y hasta 17 días después de la ingestión (Hong *et al.*, 2008).

Esta bacteria se ha utilizado a nivel culinario para fermentar leguminosas como la soya con la finalidad de hidrolizar las proteínas hasta aminoácidos (Ouoba *et al.*, 2006). Tras este proceso se acumula amoníaco e incrementa el pH (7-8), lo que confiere a los fermentados su olor característico. Estos factores a su vez permiten el crecimiento de este microorganismo, alcanzando una concentración de hasta  $10^8$  bacterias viables/gramo (Leejeerajumnean *et al.*, 2000). Así mismo se ha reportado que la presencia de *B. subtilis* en la algarroba en África ocasiona la fermentación de carbohidratos, degradación de proteínas y lípidos, permitiendo un mejor aprovechamiento para quien lo consume (Ouoba *et al.*, 2006).

Recientemente se ha empleado como bioterapéutico y bacterioprofiláctico en desórdenes gastrointestinales sobre todo en países europeos en donde se comercializa en diferentes presentaciones a concentraciones de  $2.9 \times 10^8$  esporas/ml y  $2 \times 10^7$  esporas/gramo (Green *et al.*, 1999). Se ha probado en perros mediante un probiótico comercial que contiene además, otras especies bacterianas (*Lactobacillus farciminis*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus licheniformis* y *Lactobacillus acidophilus*), teniendo efectos positivos y mejorando la presentación de los signos clínicos (Herstad *et al.*, 2010).

En aves se han utilizado las esporas de *B. subtilis* con la finalidad de promover el crecimiento (Cartman *et al.*, 2008). La presentación esporulada se considera un producto viable debido a su capacidad metabólica y alta resistencia al estrés ambiental (Cartman *et al.*, 2008; Casula *et al.*, 2002). Su mecanismo de acción se estudia basándose en la

germinación que idealmente sucede en el tubo gastrointestinal. Existe evidencia de que esto ocurre en perros, conejos y ratones (Tam *et al.*, 2006). Este microorganismo está fuertemente relacionado con el desarrollo del tejido linfoide y de los anticuerpos en conejos (Casula *et al.*, 2002).

A pesar de no considerarse parte de la microbiota normal y que, por lo tanto, la capacidad de adherencia es menor, la dosificación y el periodo que comprende el tratamiento, determina que los microorganismos utilizados permanezcan en el tubo gastrointestinal el tiempo suficiente para ejercer su efecto. (Herstad *et al.*, 2010)

### ***1.1.6. Metabolismo del nitrógeno en *Bacillus subtilis****

Al igual que la mayoría de las bacterias entéricas, *Bacillus subtilis* utiliza la glucosa y la glutamina como fuentes principales de carbono y nitrógeno; cuando estas moléculas no están disponibles en el medio, requiere codificar enzimas que les permitan aprovechar fuentes secundarias; a este proceso se le conoce como represión catabólica (Merrick *et al.*, 1995; Wacker *et al.*, 2003).

El nitrógeno es un componente fundamental del organismo derivado del catabolismo de proteínas y ácidos nucleicos (González *et al.*, 2006), así mismo puede ser un nutriente importante para todas las formas de vida; sin embargo, en la mayoría de los ecosistemas su biodisponibilidad es limitada. Es por esta razón, que muchos organismos han desarrollado sistemas altamente eficientes en la adquisición y utilización de este compuesto, sobre todo a partir de nitratos y nitritos, elementos que pueden cumplir con dos funciones: ser aceptores de electrones en respiración anaeróbica y fuente de nitrógeno para biosíntesis de proteína microbiana (Detsch *et al.*, 2003; Merrick *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1999).

La regulación del metabolismo del nitrógeno en *B. subtilis* está relacionado a dos proteínas, la GInR y la TnrA (Fisher., 1999; Nakano *et al.*, 1998). La primera (GInR) se expresa ante excesos de nitrógeno y TnrA se expresa en medios limitados de nitrógeno, además de estar involucrada en la utilización de fuentes secundarias de nitrógeno (Destch *et al.*, 2003;



Wacker *et al.*, 2003). Por otro lado, el gen *outB* está relacionado con el control del crecimiento de las esporas a temperaturas altas, resultando en una disminuida habilidad para crecer con glutamina como única fuente de nitrógeno, desencadenando el aprovechamiento de amoníaco dependiente de NAD sintetasa. (Hoffman *et al.*, 1998; Merrick *et al.*, 1995)

Para que el aprovechamiento del nitrógeno sea posible, se desarrolla un proceso llamado desnitrificación, mediante el cual el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) se oxida a compuestos nitrogenados como  $NO_3$ ,  $NO_2$  y  $NO$ , a través de reacciones complejas de óxido-reducción (González *et al.*, 2006, Moore *et al.*, 2004). La finalidad de esta conversión es permitir a los microorganismos utilizar aceptores alternos de electrones para ganar energía bajo condiciones limitadas de oxígeno (Arp *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 1998). Inicialmente se requiere la transformación de nitrato a nitrito y posteriormente de nitrito a amonio. La primera reacción es regulada por la enzima nitrato reductasa que a su vez requiere del molibdeno (molibdopterina) como cofactor (Ye *et al.*, 2001) y que en bacterias puede clasificarse en tres tipos, dos peri plasmáticas y una citoplasmática (Glaser *et al.*, 1995; González *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1996).

1. *Nitrato reductasa*. Se emplea como biosintético cuando existen condiciones aerobias y se regula con la concentración de amonio.
2. *Nitrato reductasa respiratoria*: Se expresa completamente en condiciones anaerobias y ante la presencia de nitrato. No se regula por la cantidad de amonio, sino de oxígeno.
3. *Nitrato reductasa Nap*: Su función es débil y su papel aún no está bien definido. Se postula que probablemente recicla un exceso de poder reductor o que ante bajas concentraciones de nitrato, genera gradiente de protones (González *et al.*, 2006).

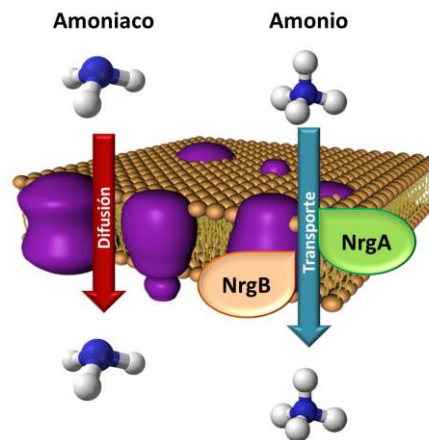
Una vez que se producen los nitritos, *Bacillus subtilis* los transforma en amonio por acción de la nitrito reductasa a nivel de citoplasma. (Nakano *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2000)

Cuando las condiciones de nitrógeno son limitadas, las enzimas bacterianas catalizan la reducción a amonio para la incorporación anabólica dentro de las biomoléculas (González *et al.*, 2006). Así mismo, cuando existe esta limitante, *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de aumentar la expresión de otras enzimas como la asparaginasa, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, permeasa de amonio y enzima nitrato asimilatoria (Fisher., 1999; Nakano *et al.*, 1998 Wray *et al.*, 1994).

Una vez que se generan las moléculas de amoniaco, este sufre un proceso o ciclo de reacciones conocido como ANAMOX (por sus siglas en inglés: anaerobic ammonia oxidation) que se refiere a la oxidación anaeróbica de dicho compuesto (Richardson *et al.*, 1999). Aquellas bacterias que son capaces de desarrollar este mecanismo pueden crecer en condiciones quimolitoautótrofas usando al amoniaco como un donador de electrones y al nitrito como un aceptor. Para que esto suceda, deben seguirse dos vías: la primera incluye la oxidación de amoniaco a hidroxilamina que posteriormente se transforma a nitrito por efecto de la hidroxilamina oxidoreductasa. Para la segunda vía el amoniaco y el nitrito son convertidos anaeróbicamente a gas di nitrógeno. Es importante recalcar, que este mecanismo requiere un medio anaerobio, y que la presencia de oxígeno es capaz de inhibirlo irreversiblemente, al igual que otros compuestos como el acetileno y fosfato (Richardson *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000).

El amonio (en gas o como ion) se considera la fuente de nitrógeno preferida por las bacterias entéricas y algunas otras bacterias como *Bacillus subtilis* (Fisher., 1999; Hu *et al.*, 1999) (este último microorganismo también tiene predilección por la glutamina (Detsch *et al.*, 2003)), empleándolo como soporte en el rápido crecimiento celular mediante una oxidación anaeróbica (Merrick *et al.*, 1995). En *Bacillus pasteurii*, se ha observado que el amonio (20mM) y la urea, promueven un medio alcalino (7.5 a 10.5) que permite la formación de amoniaco, compuesto necesario para el transporte de sustratos a bajas

concentraciones a través de la membrana, además de estimular a la ATPasa (que es inactiva en  $\text{pH} < 6.8$ ) (Jahns., 1996). En este punto es importante aclarar, que la mayor concentración de amonio se presenta en forma de amoniaco, molécula capaz de difundir fácilmente a las células (Wray *et al.*, 1994), en contraste (Figura 10), el amonio como tal, requiere de transportadores (NrgA y NrgB) para poder atravesar la membrana cuando el pH es bajo (Detsch *et al.*, 2003)



**Figura 10. Transporte de amoniaco y amonio a través de la membrana plasmática.**

Cuando el amonio escasea en el medio, se requieren rutas alternativas que permitan su aprovechamiento óptimo. Cuando el nivel de amonio es bajo, la expresión de ureasa, asparaginasa y enzimas degradadoras de aminoácidos aumenta, mientras que en exceso de amonio, estas enzimas se inhiben. La producción de ureasa es dependiente de la cantidad de arginina, ya que la degradación de este aminoácido deriva en la formación de urea. (Atkinson *et al.*, 1991)

Fisher (1999), Hu *et al.* (1999) y Detsch *et al.* (2003) mencionan que en las bacterias, incluyendo *B. subtilis*, existe una vía para la fijación del amonio en la que se produce glutamina a través del ciclo de la glutamina sintetasa (Merrick *et al.*, 1995; Wacker *et al.*, 2003). Esta enzima se expresa en base a la disponibilidad de nitrógeno (amoniaco) y la regulación del gen GInR. (Fisher., 1999; Detsch *et al.*, 2003). Su función consiste en

modular la formación glutamina a partir de amoníaco y glutamato. La glutamina funciona como aminoácido y donador de nitrógeno para la síntesis del 15% de las moléculas que lo contienen en su estructura (Fisher., 1999; Glaser *et al.*, 1994). Se considera que esta vía representa un gasto energético muy bajo (Detsch *et al.*, 2003).

Una segunda vía también presente en *Bacillus subtilis*, requiere la participación de la glutamato sintetasa (glutamina:2-oxoglutarato amidotransferasa), enzima regulada por el operón *gltAB* (Fisher., 1999; Wacker *et al.*, 2003). La expresión de dicho operón se ve limitada por la presencia de su sustrato (glutamato) e inducida ante la presencia de carbohidratos (glucosa, glicerol y glucitol) y amoníaco (Detsch *et al.*, 2003). Esta enzima participa en la asimilación del amoníaco mediante la formación de 2 moléculas de glutamato y un NADP a partir de glutamina, 2- cetoglutarato y NADPH (Merrick *et al.*, 1995; Belitsky *et al.*, 2004). Si no existe glutamina en el medio, pueden emplearse aminoácidos como la prolina y arginina (Belitsky *et al.*, 2004; Moses *et al.*, 2011).

La vía de la glutamato deshidrogenasa, es una tercera alternativa para la asimilación del amoníaco que ha sido descrita en bacterias entéricas como *E.coli*. La glutamato deshidrogenasa regula la transformación de amoníaco en glutamato mediante una reacción NADPH- dependiente, funcionando mejor sobre todo en medios con exceso de sustrato (Hu *et al.*, 1999). Se desconoce si esta vía también existe en *Bacillus subtilis* (Merrick *et al.*, 1995).

El óxido nítrico, además de causar daño celular, inhibe *in vitro* la respiración aeróbica por interferencia del sistema de citocromo. Es importante considerar que en condiciones fisiológicas existe un flujo de oxigenación que puede modificar este efecto. Otro efecto asociado al óxido nítrico es la regulación homeostásica del hierro, que está determinada por un regulador de la ingesta de este mineral y cuya producción es inducida por el ON en condiciones anaeróbicas y en menor medida en condiciones de aerobiosis. (Moore *et al.*, 2004)

*Bacillus subtilis* tiene la capacidad de producir una proteína (Hsp27) inducible de shock calórico 27 (Fujiya *et al.*, 2007) que le confiere protección ante el estrés y que su

sobreproducción puede proteger a las células intestinales del daño oxidativo, contribuyendo directamente con el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Williams., 2007).

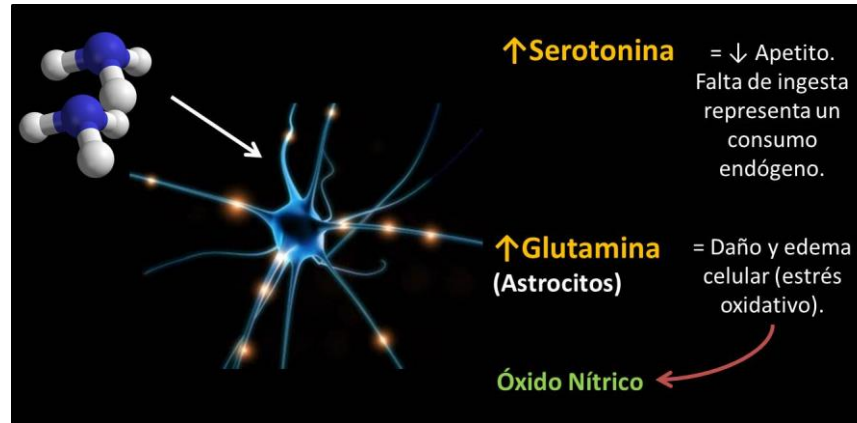
### ***1.1.7. Importancia de la regulación de la concentración de urea y amoníaco en mamíferos***

La microbiota gastrointestinal es capaz de producir amoníaco a partir de bacterias ureasa positivas y de la desaminación de los aminoácidos presentes en el alimento ingerido (Braissant., 2010; Bongaerts *et al.*, 2005; Monfort *et al.*, 2002). La ingestión de una baja cantidad de aminoácidos esenciales en la dieta, induce una mayor concentración de amoníaco en plasma derivado de la degradación de tejido corporal y consecuentemente de proteína, que se produce como reacción compensatoria ante la deficiencia. (Bongaerts *et al.*, 2005; Scaglia., 2010; Singh *et al.*, 2005).

El amoníaco tiene la característica de modificarse dependiendo del pH en el que se encuentre, comportándose como un ion ( $\text{NH}_4^+$ ) cuando el pH es bajo o como un gas ( $\text{NH}_3$ ) de fácil difusión. En condiciones fisiológicas las condiciones permiten que el amoníaco se presente como  $\text{NH}_4^+$  en al menos un 98% (Felipo *et al.*, 2002). Esta relación puede modificarse por el tipo y cantidad de bacterias presentes en el intestino (Quigley *et al.*, 2013).

En exceso, el amoníaco tiene un efecto tóxico importante en las células nerviosas. (Braissant., 2010; Dhiman., 2013). De forma general, la hiperamonemia estimula la formación de serotonina cerebral que inhibe el apetito (anorexia), lo cual obliga al organismo a catabolizar las reservas endógenas causando una malnutrición y una mayor concentración de amoníaco, formando un círculo vicioso (Bachmann *et al.*, 2004). Eventualmente y de forma adicional se produce una mayor concentración de glutamina debido a la transformación a partir de glutamato y amoníaco en los astrocitos (Cagnon *et al.*, 2007; Monfort *et al.*, 2002), con lo que se ocasiona daño celular y edema cerebral. Existe una fuerte relación con el estrés oxidativo y la producción de citocinas inflamatorias

(Figura 11), en el que el óxido nítrico es una molécula estrechamente relacionada con este proceso (Bachmann *et al.*, 2004; Dhiman., 2013; Monfort *et al.*, 2002).



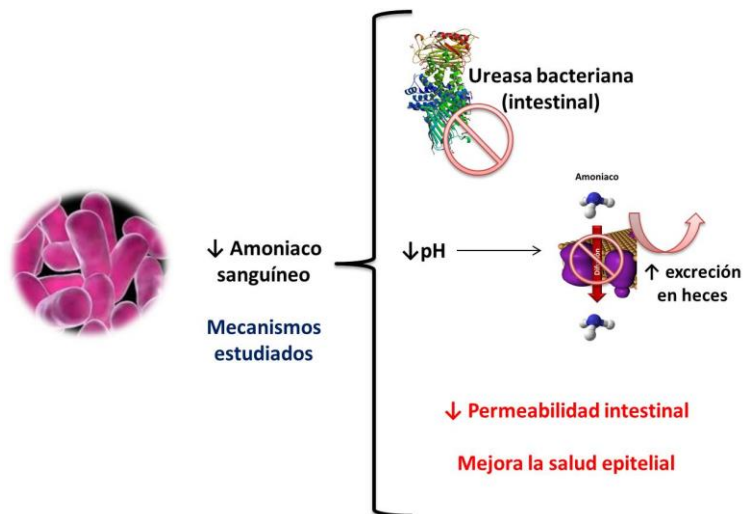
**Figura 11. Efecto del amoníaco en el sistema nervioso central.**

Debido a este efecto tóxico potencial, el organismo produce urea para la eliminar el exceso de amoníaco en forma de mecanismo de defensa (Cagnon *et al.*, 2007; Solga., 2003). Este proceso se realiza en el hígado mediante un ciclo que lleva su nombre, y cuya finalidad es eliminar el exceso de nitrógeno proveniente de la dieta mediante la excreción renal (Bongaerts *et al.*, 2005; Monfort *et al.*, 2002). La inactividad enzimática, defectos en el transporte, errores metabólicos, daño hepático, movilización rápida de reservas proteicas por un alimento de baja digestibilidad o falta prolongada en el aporte, son causas que se pueden provocar que este ciclo no se lleve correctamente o que se sature (Cagnon *et al.*, 2007).

Existe una relación estrecha entre el hígado y el intestino regulada por el flujo sanguíneo (Cesaro *et al.*, 2011), es por ello que uno de los principales problemas que se asocia a la producción excesiva de amoníaco y otros compuestos nitrogenados tóxicos, es la encefalopatía hepática, trastorno cuyo tratamiento en casos particulares de medicina humana, se ha basado de forma experimental en el uso de prebióticos, probióticos y simbióticos. Este efecto se basa en la regulación o modificación conjunta que se ejerce

sobre la microbiota intestinal, reduciendo significativamente los niveles sanguíneos de moléculas de amoníaco (Dhiman., 2013).

El papel de los probióticos en la regulación de la concentración sanguínea del amoníaco (Dhiman., 2013), se basa en la disminución de la actividad de ureasa bacteriana gastrointestinal, el decremento de la absorción de amoníaco por disminución del pH, que evita la ionización y por ende la difusión de dicha molécula y el aumento de su excreción en heces (Solga., 2003). También se menciona la reducción en la permeabilidad intestinal, mejora del estado fisiológico del epitelio (Dhiman., 2013) y control del estrés oxidativo (Figura 12) (Bongaerts *et al.*, 2005; Cesaro *et al.*, 2011).



**Figura 12. Mecanismos de los probióticos para disminuir el amoníaco sérico.**

Se ha propuesto que la reducción de amoníaco sanguíneo es consecuencia de la combinación de nutraceúticos (prebióticos y probióticos) que permite el desarrollo de un mecanismo más eficiente (Solga., 2003).

### ***1.1.8. Importancia del óxido nítrico y el estrés oxidativo***

El óxido nítrico (NO) es un intermediario de la oxidación del nitrógeno, se origina a partir de la conversión de arginina y oxígeno por acción de la óxido nítrico sintetasa (NOS) (Gusarov *et al.*, 2005). El óxido nítrico no solo es secretado por células endoteliales, sino también por plaquetas, macrófagos y células cerebrales (Ruíz *et al.*, 2010). Debido a que presenta un electrón no apareado, se considera un radical libre de fácil difusión (soluble en agua y lípidos) capaz de inhibir enzimas, dañar el ADN, iniciar la per oxidación de lípidos, estimular la apoptosis y exacerbar el daño inducido por peróxidos, ejerciendo sus efectos con un alcance de hasta 4 a 5 células aledañas (Chokshi *et al.*, 2008; D'Souza *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2000).

Inicialmente, el óxido nítrico se describió con el nombre de factor relajante derivado del endotelio, un potente vasodilatador de vida media muy corta, aproximadamente de 5 a 10 segundos (Chokshi *et al.*, 2008; Ruíz *et al.*, 2010). Además de su papel regulador del tono en vasos sanguíneos, se le ha adjudicado un papel fisiológico en la homeostasis de los tejidos, como neurotransmisor y mediador de la inflamación. Debido a su alta capacidad de oxidación y una vez que cumple su función (Ruíz *et al.*, 2010), el organismo requiere transformarlo en una molécula más estable, lográndolo mediante una reacción que requiere la participación de la oxihemoglobina presente en la sangre, originando metahemoglobina y nitrato (Beckman *et al.*, 1998; Chokshi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2000). Todos estos productos finales, se consideran indicadores del estrés oxidativo en el organismo (Beckman *et al.*, 1998; Da Silva., 2013).

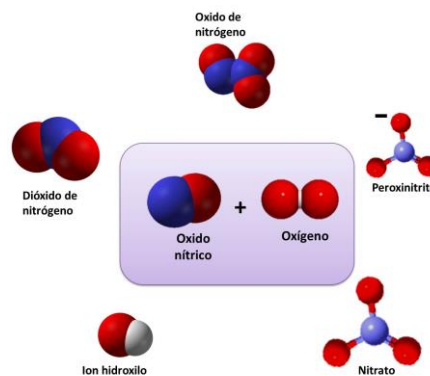
La óxido nítrico sintetasa, puede presentar tres isoformas diferentes: la neuronal constitucional (NOS I o nNOS), la inducible (NOS II o iNOS) y la endotelial (NOS III o eNOS). Todas ellas pueden encontrarse a nivel de intestino delgado, pero nNOS es la más abundante con un 90%. iNOS es la única que se produce bajo condiciones patológicas por la inducción de la inflamación (sepsis y endotoxemia) cumpliendo un papel importante en la patogénesis de la falla de la barrera intestinal y de otros procesos inmunológicos



(D'Souza *et al.*, 2010; Da Silva., 2013). Chokshi *et al.* (2008) y Rao (2002) mencionan que una hiperamonemia, es capaz de inducir una mayor producción de óxido nítrico neuronal.

A pesar de que el óxido nítrico se produce de manera fisiológica cumpliendo las funciones importantes ya mencionadas, puede llegar a considerarse tóxico porque el iNOS (que se produce como respuesta a una patología), origina cantidades de óxido nítrico medidas en micromoles, a diferencia del eNOS que únicamente genera concentraciones medibles en nanomoles. Esto induce una incapacidad a nivel sanguíneo, para eliminar el óxido nítrico adecuadamente, permitiendo que dicha molécula tenga oportunidad de reaccionar con el anión superóxido (Chokshi *et al.*, 2008).

De acuerdo con Beckman *et al.* (1998) una vez que el NO reacciona con el oxígeno, forma especies reactivas de nitrógeno (RNOS por sus siglas en inglés), dentro de las que se encuentran el óxido de nitrógeno ( $N_2O_3$ ) o superóxido que genera a su vez el peroxinitrito ( $OONO^-$ ) que aunque no se considera como un radical libre como tal, es caracterizado por ser altamente reactivo y causante de daño citopático, con una vida media de un milisegundo, suficiente para difundir la membrana celular y alterar su funcionamiento (Figura 13). El peroxinitrito rápidamente se descompone en nitrato ( $NO_3^-$ ), radical hidroxilo (OH) y el radical altamente tóxico, dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ). Algunas ERN (especies reactivas de nitrógeno) pueden reaccionar con grupo tiol y aminas para formar S-nitrosotiol y nitrosaminas con vidas medias más largas. Todos ellos actúan de forma indirecta (Chokshi *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2004).



**Figura 13. Especies reactivas de nitrógeno.**

Las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, actúan como antioxidantes removiendo el anión superóxido que puede provenir del óxido nítrico (Beckman *et al.*, 1998; D'Souza *et al.*, 2010). De forma directa los efectos incluyen la formación de complejos metal-nitrosil y reacciones con derivados lipídicos. (Moore *et al.*, 2004)

El estrés oxidativo es un evento relacionado con disfunción celular que puede ser reversible y controlable. Su detección se realiza mediante métodos bioquímicos sencillos que requieren de una muestra sanguínea (Masnatta *et al.*, 2003) detectando en suero metabolitos estables de óxido nítrico (nitritos y nitratos) mediante la reacción de Griess.

Estudios en ratas, han demostrado que el uso de probióticos puede conferir protección ante los mecanismos asociados con estrés oxidativo en los que el óxido nítrico participa. (D'Souza *et al.*, 2010)

De acuerdo con lo observado con Gusarov *et al.*, 2005, *in vitro*, *Bacillus subtilis* ha demostrado poseer una enzima homóloga a la NOS que cumple la misma función de transformar a la arginina en óxido nítrico con la finalidad de proteger a la bacteria del estrés oxidativo, esto le permite regular su desarrollo en el medio.

Una bacteria puede encontrar óxido nítrico mediante diversas fuentes. Los macrófagos de los mamíferos son capaces de generarlo a partir de la acción de la óxido nítrico sintetasa con la finalidad de proteger al organismo de patógenos. *Bacillus subtilis* también produce dicha enzima (D'Souza *et al.*, 2010).

### ***1.1.9. Justificación***

En la actualidad el empleo de probióticos como una medida preventiva natural en las dietas de perros y gatos se ha incrementado considerablemente, existiendo incluso la producción comercial de especies bacterianas particulares sin que se conozcan los efectos benéficos que ejercen. Algunos de los efectos positivos se relacionan con la disminución de la concentración sanguínea de compuestos nitrogenados (urea y amoníaco) con potencial tóxico cuando se encuentran en exceso; así como la influencia que pueden ejercer sobre la respuesta de estrés oxidativo mediante la reducción de especies reactivas de nitrógeno (medido a través de indicadores). Es por ello que se requieren estudios actuales en perros sanos, de forma inicial y como referencia, que demuestren o descarten la existencia de modificaciones reales sobre dichas variables sanguíneas.

### ***1.1.10. Hipótesis***

La complementación de probiótico de *Bacillus subtilis* en la dieta de perros adultos clínicamente sanos, disminuirá significativamente las concentraciones sanguíneas de urea, amoníaco y óxido nítrico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. *Objetivo general***

Determinar el efecto del probiótico *Bacillus subtilis* a una dosis fija, en la concentración sanguínea de urea, amoníaco y nitratos-nitritos (indicadores de óxido nítrico) en perros adultos clínicamente sanos en mantenimiento.

### **2.2. *Objetivos específicos***

Cuantificar la concentración de urea en suero de perros adultos en mantenimiento antes, durante y después de la complementación con *Bacillus subtilis*.

Cuantificar la concentración de amoníaco en suero de perros adultos en mantenimiento antes, durante y después de la complementación con *Bacillus subtilis*.

Cuantificar la concentración de óxido nítrico a partir de nitratos y nitritos como indicador de especies reactivas de nitrógeno en sangre de perros adultos en mantenimiento antes, durante y después de la complementación con *Bacillus subtilis*.

Comparar el comportamiento de los analitos a través de tiempo.

Determinar si estadísticamente existe un efecto sobre las variables estudiadas tras la complementación del probiótico.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. *Animales*

Se emplearon 10 perros adultos de 4 años en promedio, de razas consideradas pequeñas (hasta 10 Kg), de 6.8 kilogramos de peso en promedio. Todos ellos contaban con un tutor y fueron alojados en sus respectivos hogares, manteniendo condiciones óptimas de higiene y bienestar animal.

Todos los sujetos experimentales fueron sometidos a un examen físico completo y a una prueba sanguínea (bioquímica completa) previa para corroborar su estado de salud, considerándose clínicamente sanos y aptos para participar en la fase experimental.

(Anexo 1)

#### 3.2. *Alimentación y complementación*

Se utilizó como único alimento un extrudizado comercial clasificado como popular de acuerdo a la calidad de sus ingredientes. El análisis garantizado de dicho producto manifiesta la siguiente información:

**Cuadro 2. Análisis Garantizado del alimento proporcionado durante la fase experimental.**

Nutriente	% de Inclusión
Proteína Cruda (PC)	22%
Grasa Cruda (GC)	9%
Fibra Cruda (FC)	4%
Humedad	12%
Cenizas	10%

Mediante esta información y basándose en el método de cálculo de energía a partir del empleo de factores *Atwater* modificados, se realizó la estimación de la energía metabolizable del alimento (Case., 2011).

**Cuadro 3. Estimación de la energía metabolizable del alimento por factores *Atwater* modificados.**

<b>Nutriente</b>	<b>Factor de ajuste (<i>Atwater</i>)</b>	<b>Kcal/gramo</b>
<b>Proteína Cruda: 22%</b>	3.5	77
<b>Grasa Cruda: 9%</b>	8.5	76.5
<b>Carbohidratos: (100-(22+9+4+10+12))= 43%</b>	3.5	150.5
<b>TOTAL</b>		<b>304 kcal/100gr</b>

Con la finalidad de que todos los animales se acostumbraran al nuevo alimento y para evitar trastornos gastrointestinales, se realizó una transición alimenticia con un periodo de adaptación correspondiente a 15 días. Durante el primer día se ofreció 75% del alimento que consumían previamente y 25% del alimento nuevo, al segundo día se ofreció con una proporción 50:50, el día 3 25:75 y al cuarto día se ofreció el 100% de la dieta nueva, el resto de los días hasta completar los 15, se mantuvo dicho alimento como base y única fuente de alimentación.

La determinación de la necesidad energética diaria se calculó individualmente considerando el peso corporal y el nivel de actividad (poco activos o inactivos), mediante la siguiente fórmula (Case; 2011):

$$\text{kcalEM/día} = 95 * (\text{PV})^{0.75}$$

En donde:

kcalEM/día= kilocalorías de energía metabolizable por día

PV= Peso en Kilogramos

95= constante

Una vez determinada la necesidad energética del animal y el aporte energético del alimento, se realizó el cálculo del gramaje diario a consumir para cada sujeto experimental. (Anexo 2) El total de la ración se dividió en 2 porciones a ofrecer, una por la mañana y otra por la noche.

El complemento utilizado fue el probiótico *Bacillus subtilis*, en presentación de tabletas (producto comercial CALSPORIN® a base de esporas viables de *Bacillus subtilis* C- 3102, con capacidad de germinación) a una concentración de  $2.5 \times 10^8$  UFC por tableta. Se administraron 4 tabletas por día, equivalentes a  $1 \times 10^{12}$  de UFC por día (siempre por la noche) por perro, basándose en la dosis mínima establecida por Waller *et al*; 2011 quien empleó una especie bacteriana diferente con potencial probiótico, esto junto con la ración de alimento estimada. (Figura 14)



**Figura 14. Presentación de tabletas con *Bacillus subtilis*.**

La complementación tuvo una duración de 60 días.

### **3.3. Toma de muestras**

El primer muestreo sanguíneo tuvo lugar 12 horas antes de comenzar a administrar el probiótico y se consideró como el valor testigo.

Posteriormente se realizaron cuatro muestreos más con 15 días de diferencia entre cada uno de ellos.

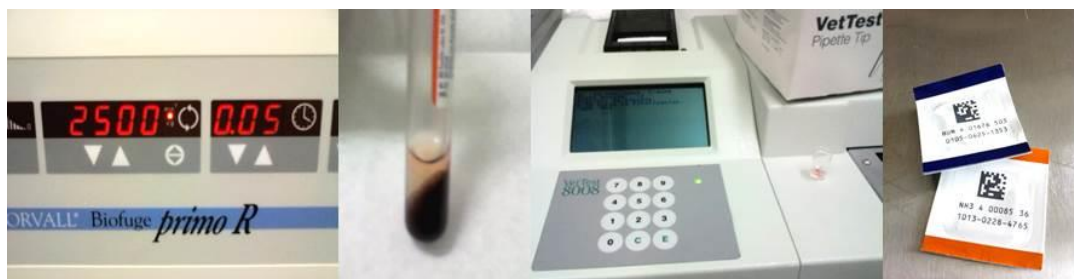
En cada muestreo se obtuvo sangre mediante veno punción de la vena cefálica con jeringas de 3 ml y agujas del # 22, se extrajeron alrededor de 2 ml por individuo. (Figura 15)



**Figura 15. Obtención de muestras sanguíneas por venopunción.**

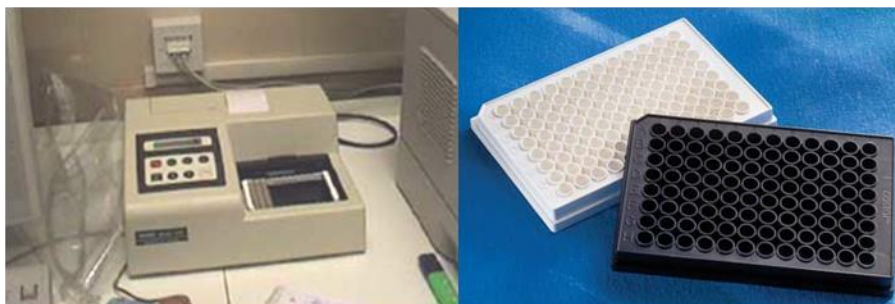
Un mililitro de sangre se depositó en un tubo vacutainer sin anticoagulante (tapón rojo) e inmediatamente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de la marca Thermo Scientific, modelo Biofuge primo R. El suero se extrajo con una pipeta y se determinó el contenido de los analitos urea y amoniaco en el equipo Vet Test 8008 del Laboratorio de Microbiología Ruminal del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica. (Figura 16)





**Figura 16. Procesamiento de muestra para determinación de urea y amoniac.**

Otro mililitro de muestra sanguínea se depositó en un microtainer con heparina como anticoagulante (tapón verde) y se congeló hasta su procesamiento. En la sangre completa se evaluó la cantidad de nitratos y nitritos presentes mediante la técnica de Griess (Tatsch *et al*; 2011) para determinar de forma indirecta la concentración de óxido nítrico en el Laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. (Anexo 3, Figura 17)



**Figura 17. Equipo empleado para la técnica de Griess.**

### **3.4. *Análisis estadístico***

Se empleó el programa SPSS versión 16.0 y JMP versión 5.1 para realizar los análisis estadísticos, así como para la determinación de supuestos (normalidad). Los analitos urea y amoniacó no cumplieron con dicha condición.

Para los analitos urea y amoniacó se realizó un estudio no paramétrico mediante Prueba de Friedman, al encontrar diferencia se realizaron comparaciones múltiples de rango (Wayne; 1978) para determinar que muestreo fue diferente.

Para el analito óxido nítrico (calculado a partir de nitratos), se realizó una Prueba t-Students para la diferencia de medias con muestras relacionadas (“t-Students pareada”), bajo la condición cumplida de normalidad

#### 4. RESULTADOS

Para el analito urea no se encontraron diferencias estadísticamente ( $P>0.05$ ). Por lo que se refiere que no existió efecto del tratamiento con *Bacillus subtilis* sobre la concentración sanguínea de dicho analito entre muestreos. Cuadro 4

**Cuadro 4. Promedio de la concentración sérica (mg/dL) de urea en perros adultos en mantenimiento complementados con probiótico *Bacillus subtilis*.**

Día	Media±Desv. Est. (mg/dL)
0	16.8±4.70 <sup>a</sup>
15	19.5±9.32 <sup>a</sup>
30	19.5±9.53 <sup>a</sup>
45	18.2±9.93 <sup>a</sup>
60	20.1±7.89 <sup>a</sup>

Literales diferentes indican diferencias ( $p>0.05$ )

Para el analito amoniaco se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre el muestreo 3 vs, lo que indica que la complementación de *Bacillus subtilis* aumentó la concentración sérica de amoniaco entre el día 30 y día 45, mas no frente al valor testigo. (Cuadro 5)

**Cuadro 5. Medias de rangos de la concentración sérica (umol/L) de amoniaco en perros adultos en mantenimiento complementados con probiótico *Bacillus subtilis*.**

Día	Media de rango (umol/L)
M1	2.4
M2	2.7
M3	1.9
M4	4.0 **
M5	4.0**

\*\* Diferencias ( $p < 0.05$ )

Para el analito nitrato, que evalúa indirectamente la concentración de óxido nítrico se encontraron diferencias significativas entre el muestreo inicial y el final ( $P = 0.032$ ). Este resultado indica la disminución de óxido nítrico tras la complementación de *Bacillus subtilis* en perros adultos en mantenimiento. (Cuadro 6)

**Cuadro 6. Diferencia de medias de la concentración sérica de nitrato en perros adultos en mantenimiento complementados con probiótico *Bacillus subtilis*.**

Día (di)	Media (di) $\pm$ Desv. Est. (nmol/ml)	Límite inferior – Límite superior Con un intervalo de confianza del 95%
0-60	7.97 $\pm$ 9.94	0.8617 - 15.0923

## 5. *DISCUSSION*

### *Urea*

En el presente estudio la concentración sanguínea de urea no disminuyó tras complementar el probiótico *Bacillus subtilis* ( $p>0.05$ ). De acuerdo con Krimer (2012) la urea es un compuesto que se produce en el hígado como mecanismo para eliminar el amoníaco, se excreta principalmente por vía renal, y una baja proporción se excreta a nivel gastrointestinal, generalmente en el colon se reabsorbe de forma directa o como amoníaco. También se puede considerar que de acuerdo con Levin *et al.*, (2003), la permeabilidad de la urea a nivel colónico es muy baja, pudiendo ser en conjunto la causa por la que la concentración sérica no se modificó.

### *Amoníaco*

En el presente trabajo se obtuvo un aumento significativo ( $p<0.05$ ) de la concentración sérica de amoníaco entre el día 30-45 y 30-60 de complementación. Esto puede explicarse de acuerdo a Braissant (2010), Bongaerts *et al.*, (2005) y Monfort *et al.*, (2002), quienes mencionan que de forma normal la microbiota gastrointestinal produce amoníaco a partir de bacterias ureasa positivas y de la desaminación de los aminoácidos de la dieta.

La respuesta esperada a partir de la complementación de *B. subtilis* de disminuir la concentración sanguínea de amoníaco, se basaba en el efecto descrito por Bongaerts *et al.*, (2004) quienes postulan que los probióticos disminuyen la concentración de amoníaco evitando signología de toxicidad mediante la competencia por sustrato fermentable con bacterias ureasas positivas intestinales, restringiendo así su crecimiento predominante y evitando una elevada producción de amoníaco. *Bacillus subtilis* es un probiótico que hidroliza carbohidratos para su adecuado crecimiento (Green *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1998) por lo que se esperaba que fuera capaz de competir con las bacterias ureasa positivas limitando su desarrollo, sin embargo; dicho efecto no fue comprobado en el presente trabajo.

El aumento observado en el analito amoniaco entre el día 30 y el día 60 también puede derivar de la incapacidad del microorganismo *B. subtilis* para aprovechar el amoniaco a partir de su transformación a glutamina, ya sea por una baja cantidad de glutamato o de una inadecuada estimulación de la vía. De acuerdo a lo que mencionan Merrick *et al.*, (1995) y Wacker *et al.*, (2003), otro efecto mediante el cual podía esperarse que *B. subtilis* redujera la concentración sérica de amoniaco, es su capacidad de utilizar glutamina como una fuente de carbono y nitrógeno. La glutamina es un aminoácido que deriva del proceso de desnitrificación que llevan a cabo ciertas bacterias a partir de otros compuestos nitrogenados como el nitrato (González *et al.*, 2006). Dentro de este proceso de transformación se encuentra al amoniaco como intermediario (Nakano *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2000). Una vez que se forma el amoniaco y se encuentra disponible en el medio, *Bacillus subtilis* lo transforma enzimáticamente a glutamina (vía glutamina sintetasa) siempre que exista disponibilidad de glutamato y una adecuada activación del proceso (Merrick *et al.*, 1995; Wacker *et al.*, 2003).

Por otra parte, Felipo *et al.*, (2002); Quigley *et al.*, (2012) y Levin *et al.*, (2003) mencionan que el pH determina en gran parte el comportamiento de transformación y absorción molecular del amoniaco a nivel del colon, siendo un factor que pudo intervenir en el aumento de la concentración sanguínea registrado en el presente trabajo, sin que dicho efecto sea concluyente debido a que el pH no fue un parámetro evaluado.

Debido a que a pesar del aumento significativo del amoniaco sanguíneo en el muestreo cinco, los niveles no superaron el límite superior (98  $\mu\text{mol/L}$ ), y que no existieron signos relacionados a toxicidad en base a lo descrito por Braissant., (2010) y Dhiman., (2013), puede decirse que la eliminación de este compuesto fue adecuada posiblemente por medio del ciclo de la urea (Bongaerts *et al.*, 2005; Monfort *et al.*, 2002) o a nivel fecal (Fisher., 1999; Hu *et al.*, 1999).

## *Óxido nítrico*

En el presente estudio se registró una disminución significativa de la concentración sanguínea de óxido nítrico entre el día cero y 60 de complementación. Detsch *et al.*, (2003); Merrick *et al.*, (1995) y Richardson *et al.*, (1999) mencionan que muchos organismos han desarrollado sistemas altamente eficientes en la adquisición y utilización del nitrógeno como fuente metabólica, pudiendo cumplir dos funciones en los microorganismos: ser aceptores de electrones en la respiración anaeróbica o fuente de nitrógeno para biosíntesis de proteínas microbianas. El aprovechamiento de estos compuestos puede cumplir un rol importante en el control de moléculas nitrogenadas con potencial citotóxico como el óxido nítrico y sus derivados.

De acuerdo con Gusarov *et al.*, (2005) y Ruíz *et al.*, (2010), el óxido nítrico es un intermediario de la oxidación del nitrógeno, se origina a partir de la conversión de arginina y oxígeno por acción de la óxido nítrico sintetasa (NOS), no solo es secretado por células endoteliales, sino también por plaquetas, macrófagos y células cerebrales.

Rao (2002) indica que el óxido nítrico es una molécula de señalización en el sistema nervioso, cardiovascular e inmune con función antioxidante, neuroprotectora y mediadora del desarrollo de edema cerebral si existen condiciones patológicas. Debido a su alta capacidad de oxidación, una vez que cumple su función (Ruíz *et al.*, 2010), el óxido nítrico puede actuar como un radical libre de fácil difusión (soluble en agua y lípidos) capaz de inhibir enzimas, dañar el ADN, iniciar la peroxidación de lípidos, estimular la apoptosis y exacerbar el daño inducido por peróxidos, ejerciendo sus efectos con un alcance de hasta 4 a 5 células aledañas (Chokshi *et al.*, 2008; D'Souza *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2000) o puede formar especies reactivas de nitrógeno (RNOS por sus siglas en inglés) dentro de las que se encuentran el óxido de nitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o superóxido que genera a su vez el peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>), causantes de daño citopático, con una vida media de un milisegundo, suficiente para difundir la membrana celular y alterar su funcionamiento. Beckman., *et al* (1998) y Da Silva (2013) señalan que todos estos productos finales, se consideran indicadores del estrés oxidativo en el organismo.

Beckman *et al.*, (1998); Chokshi *et al.*, (2008); Kim *et al.*, (2000) y Ruíz *et al.*, (2010); describen que en condiciones fisiológicas el óxido nítrico requiere transformarse en una molécula más estable mediante una reacción que requiere la participación de la oxihemoglobina originando metahemoglobina y posteriormente nitratos y nitritos.

Por su parte Glaser *et al.*,(1995); González *et al.*,(2006); Nakano *et al.*, (1998) y Sun *et al.*, (1996) han descrito el metabolismo del nitrógeno que lleva a cabo *Bacillus subtilis*, pudiendo explicar con ello el comportamiento del óxido nítrico observado en el presente estudio. Debido a la capacidad de este microorganismo probiótico para aprovechar a los nitratos, nitritos y otras moléculas nitrogenadas mediante la desnitrificación, puede considerarse que *B. subtilis* fue capaz de reducir el óxido nítrico o sus moléculas derivadas a nivel intestinal para favorecer su crecimiento. Los mismos autores también mencionan que a partir de este metabolismo, se produce amoníaco como intermediario, relacionándose directamente y como ya se ha descrito, con el comportamiento reportado para el analito amoníaco.



## 6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que el efecto de la complementación de *Bacillus subtilis* en perros adultos clínicamente sanos en mantenimiento no tiene efecto sobre las concentración sérica de urea.

Al encontrar diferencias significativas en la concentración del analito amoniaco, se puede concluir que el efecto de la complementación de *Bacillus subtilis* no disminuyó la concentración sérica de amoniaco como se esperaba. El incremento observado indica que este probiótico puede no ser eficiente en la competición con bacterias ureasas positivas o en la utilización del amoniaco como fuente de nitrógeno, requiriendo estudios que abarquen la medición de otros parámetros que apoyen dicho hallazgo, tales como el pH intestinal, perfil de aminoácidos del alimento empleado y cultivos bacterianos de muestras fecales.

En el presente estudio fue posible observar una disminución del óxido nítrico (medido a partir de nitratos y nitritos), demostrando un posible potencial de *Bacillus subtilis* para utilizarlos como fuentes de nitrógeno. Este efecto puede ser empleado para reducir el riesgo de reactividad de los nitratos y nitritos; siendo importante considerar una evaluación más exhaustiva de parámetros relacionados a estrés oxidativo y daño celular.

Debido a que durante el trabajo experimental ninguno de los perros curso con signología correspondiente a enfermedad, puede decirse que la dosis fija utilizada durante 60 días no afectó el estado de salud de los animales, por lo que puede considerarse que el producto investigado (CALSPORIN<sup>®</sup>) a base de esporas de *Bacillus subtilis* C-3102, resulta inocuo para los animales a corto plazo y siendo requeridos estudios a largo plazo.

## ***RECOMENDACIONES***

- Debido a que el amoníaco es potencialmente tóxico para el sistema nervioso central, es recomendable realizar estudios a profundidad sobre el posible efecto negativo que podría tener la complementación de este probiótico a largo plazo.
- Algunos estudios realizados han mostrado cambios considerables en la reducción de compuestos nitrogenados tras el empleo de probióticos en pacientes con alguna patología, por lo que es importante considerar que futuras investigaciones contemplen la inclusión de animales con alguna patología hepática o renal.
- Otra interrogante establecida es la dosificación del probiótico, proponiendo el desarrollo de investigaciones que evalúen diferentes dosis, así como la complementación junto con otro producto natural como los prebióticos (simbióticos).

## 7. REFERENCIAS

- Adams, C; 2010: The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*. 23:37-46.
- Aguilar, C; Vlamakis, H; Losick, R; Kolter, R. 2007: Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 638-643.
- Anadón, A; Martínez-Larrañaga, MR; Aranzazu, MM. 2006: Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 45: 91-95.
- Arp DJ; Stein LY. 2003: Metabolism of inorganic N compounds by ammonia- oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 471-495.
- Atkinson, M; Fisher, S. 1991: Identification of genes and gene products whose expressions is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 173(1): 23-27.
- Bachmann C, Braissant O, Villard AM, Boulat O, Henry H. 2004: Ammonia toxicity to the brain and creatine. *Molecular Genetics and Metabolism*. 81: s52-s57.
- Beasley, SS; Manninen, TJ; Saris PE; 2006: Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 131-138.
- Beckman JS, Hoppenol WH. 1998: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *American Physiological Society*. C1424-C1437.
- Belitsky, B; Sonenshein, AL. 2004: Modulation of activity of *Bacillus subtilis* regulatory proteins GltC and TnrA by glutamate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*. 186(11): 3399-3407.
- Biagi, Giacomo; Cipollini, I; Pompei, A; Zaghini, G; Matteuzzi, D; 2007: Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. 124:160-165.
- Biourge, V; Vallet, C; Levesque, A; Sergheraert, S; Chevalier, S; Roberton, JL; 1998: The use of probiotics in the diet of dogs. *Journal of Nutrition*. 128: 2730S-2732S.
- Bomba, A; Nemcová R; Mudronová D; Guba P; 2002: The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 13: 121-126.
- Bongaerts G; Severijnen R; Timmerman H. 2005: Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses*. 64: 64-68.

- Borchers, AT; Selmi, C; Meyers, F; Keen, C; Gershwin, ME; 2009: Probiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*. 44:26-46.
- Braissant, O. 2010: Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 100: S3-S12.
- Cagnon L, Braissant O. 2007: Hyperammonemia-induces toxicity for the developing central nervous system. *Brain Research Reviews*. 56: 183-197.
- Carballido-López, R; Formstone, A. 2007: Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 611-616.
- Cartman, ST; La Ragione, RM; Woodward, MJ. 2008: *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(16): 5254-5258.
- Case LP, Hayek MG, Daristotle L, Foess M. Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professionals. 3<sup>rd</sup> Edition. Elsevier Inc. 2011.
- Casula, G; Cutting, SM. 2002: *Bacillus* Probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5): 2344-2352.
- Cesaro C; Tiso A; Del Prete A; Cariello R; Tuccillo C; Cotticelli G; Blanco CV; Loguercio C . 2011: Gut microbiota and probiotics in chronic liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 43: 431-438.
- Chen, RM; Wu, JJ; Lee, C; Huang, AH; Wu, M. 1999: Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion. *Journal Dairy Science*. 82:2308–2314.
- Chokshi, NK; Hunter, C; Guner, Y; Grishin, A; Ford, H. 2008: The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal NEC. *Semin. Perinatology*. 32(2): 92-99.
- D´Souza, A; Fordjour, L; Ahmad, A; Cai, C; Kumar, D; Valencia, G; Aranda, JV; BEharry, KD. 2010: Effects of probiotics, prebiotics and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. *Pediatric Research*. 67(5): 526-531.
- Da Silva AS, Munhoz TD, Faria JLM, Vargas-Hernández G, Machado RZ, Almeida TC, Moresco RN, Stefani LM, Tinucci-Costa M. 2013: Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: Effect on the pathogenesis on the disease. *Veterinary Microbiology*. 162: 366-369.

Detsch, C; Stülke, J. 2003: Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Micobiology*. 149: 3289-3297.

Dhiman R. 2013: Gut microbiota and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 28:321-326.

Donohue, D; 2006: Safety of probiotics. *Journal of Clinical Nutrition*. 15(4): 563-569.

Eamonn,M; Quigley, M; Quera, R; 2006: Small intestinal bacterial overgrowth: Roles of antibiotics, prebiotics and probiotics. *Gastroenterology*. 130:S78-S90.

Earl, AM; Losick, R; Kolter, R. 2008: Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 16(6):269-275.

Espinosa de los Monteros, FJ; 2005. “Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias”. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Felipo V, Butterworth RF. 2002: Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*. 67: 259-279.

Fisher, SH; 1999: Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*. 32(2): 223-232.

Fujiya, M; Musch, MW; Nakagawa, Y; Hu, s; Alverdy, J; Kohgo, Y; Schneewind, O; Jabri, B; Chang, EB. 2007: The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host & Microbe*. 1:299-308.

Fuller,R; 1989: A review probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology* 66, 365-378.

García Mazcorro JF; Minamoto Y. 2013: Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Arch Med Vet.*; 45(2): 111-124.

Ghai, S; Sood, S; Jain, RK. 2007: Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolated collected from soil samples. *Indian Journal of Microbiology*. 47:77-80.

Gill,H; Prasad,J; 2008: Probiotics, Immunomodulaton, and Health Benefits. *Bioactive Components of Milk*.

Glaser, P; Danchin, A; Kunts, F; Zuber, P, Nakano, M. 1995: Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 177(4): 1112-1115.

Goldin, BR; Gorbach, SL. 1984: The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 39: 756-761.

González, PJ; Correia, C; Moura, I; Brondino, CD; Moura, JGG. 2006: Bacterial nitrate reductasa: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 100: 1015-1023.

Green, DH; Wakeley, PR; Page, A; Barnes, A; Baccigalupi, L; Ricca, E; Cutting, SM. 1999: Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4288-4291.

Gusarov I, Nudler E. 2005: NO- mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *PNAS*. 102(39): 13855-13860.

Hand MS, Tatcher CD, Remillard RL, Roudebush P. Nutrición clínica en Pequeños Animales. 4th Edition. Mark Morris Institute. 2000.

Hermenejildo C; Montoliu C; Llansola M; Muñoz MD; Gaztelu JM; Miñana MD; Felipo V. 1998: Chronic hyperammonemia impairs the glutamate – nitric- oxide cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat *in vivo*. *European Journal of Neuroscience*. 10: 3201-3209.

Herstad, HK; Nesheim, B; Abee-Lund, TL; Larsen, S; Skancke, E; 2010: Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis- a controlled clinical trial. *Journal of Small Animal Practice*. 51: 34-38.

Hoffmann, T; Frankenberg, N; Marino, M; Jahn, D. 1998: Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on *resDE*. *Journal of bacteriology*. 180(1): 186-189.

Hong, HA; Huang, JM; Khaneja, R; Hiep, LV; Urdaci, MC; Cutting, SM. 2008: The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 510-520.

Hooda, S; Minamoto Y; Schodolski, JS; Swanson, K; 2012: Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Animal Health Reseach Reviews* 13 (1): 78-88.

Hu,P; Leighton, T; Ishkhanova, G; Kustu, S; 1999: Sensing of nitrogen limitation by *Bacillus subtilis*: Comparison to enteric bacteria. *Journal of bacteriology*. 181(16): 5042-5050

Innes, VL; McCartney, AL; Khoo, C; Gross, L; Gibson, GR; 2007: Molecular characterization of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence *in situ* hibridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 91-.48-53.

Jahns, T; 1996: Ammonium/Urea-Dependent generation of a proton electrochemical potential and synthesis of ATP in *Bacillus pasteurii*. *Journal of Bacteriology*. 178(2): 403-409.

Jia, J; Frantz, N; Khoo, C; Ginson, G; Rastall, R; McCartney, A; 2010: Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. *Microbiology ecology*. 71:304-312.

Kerr, KR; Beloshapka, AN; Swanson, KS; 2013: Use of genomic biology to study companion animal intestinal microbiota. *Journal Animal Science*. 91:2504-2511.

Kil, D.Y; Swanson, S; 2011: Companion Animals Symposium: Role of microbes in canine and feline health. *Journal Animal Science*. 90: 1498-1505.

Kim SW; Lee JU; Paek YW; Kang DG; Choi KC. 2000: Decreased nitric oxide synthesis in rats with chronic renal failure. *J Korean Med Sci*. 15: 425-430.

Leejeerajumnean, A; Ames, JM; Owens, JD. 2000: Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Applied microbiology*. 30(5): 385-389.

Ley, R; Hamady, M; Lozupone, C; Turnbaugh, P; Roy, R; Bircher, S; Schlegel, M; Tucker, T; Schrenzel, M; Knight, R; Gordon, J; 2008: Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 320(5883):1647-1651.

Masnatta LD; Fischer PA; Dominguez GN; Cabrera EI; Ramirez A; Sánchez R. 2003: Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad vascular en el Hospital de Día. *Rev Fed Arg Cardiol*. 32:177-183.

Mate A; Vazquez CM. Principales mecanismos de absorción de tóxicos presentes en alimentos. Diaz de Santos. 1ª ed. 2012.

Mentula, S; Harmoinen, J; Heikkilä, M; Westermarck, E; Rautio, M; Huovinen, P; Könönen, E; 2005: Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *American Society for Microbiology*. 71 (8): 4169-4175.

Merrick, MJ; Edwards, RA. 1995: Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Reviews*. 59(4): 604-622.

Miranda KM; Espey MG; Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2001; 5(1): 62-71.

Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipe V. 2002: Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochemistry International* 41: 95-102.

- Moore, C; Nakano, M; Wang, T; Ye, RW; Helmann, JD; 2004: Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *Journal of bacteriology*. 186(14): 4655-4664.
- Moses, S; Sinner, T; Zaprasis, A; Stöveken, N; Hoffmann, T; Belitsky, BR; Soneshin, A; Bremer, E. 2011: Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *Journal of Bacteriology*. 10: 745-758.
- Musa, H.H; Wu ,S.L; Zhu, C.H; Seri, H.I; Zhu, G.Q; 2009: The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of animal and veterinary advances* 8 (2) 313-321.
- Nakano, M; Dailly, YP; Zuber, P; Clark, D; 1997: Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: Identification of fermentation end products and genes requires for growth. *Journal of microbiology*. 179(21): 6749-6755.
- Nakano, M; Hoffmann, T; Zhu, Y; Jahn, D. 1998: Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *Journal of microbiology*. 180(20): 5344-5350.
- Nakano, M; Zuber, P; 1998: Anaerobic growth of a strict aerobe (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiology*. 52: 165-190.
- O'Mahony,D; Murphy, KB; MacSharry, J; Boileau, T; Sunvold, G; Reinhart, G; Kiely, B; Shanahan, F; O'Mahony, L; 2009: Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium*-From gut to gut. *Veterinary microbiology*. 139:106-112.
- Ouoba, LI; Diawara, B; Jespersen, L; Jakobsen, M. 2006: Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *Journal of Applied Microbiology*. 102:963-970.
- Perelmuter, K; Fraga, M; Zunino, P; 2008: *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 1718-1725.
- Quigley EMM; Stanton C; Murphy EF. 2013: The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. *Journal of Hepatology*. 58: 1020-1027.
- Rao VLR. 2002: Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochemistry International*. 41: 161-170.
- Reid, G. 2010: The potential role for probiótico yogurt for people living with HIV/AIDS. *Gut microbes*. 1(6):411-414.



- Reid, G; Anukam, K; Koyama T. 2008: Probiotic products in Canada with clinical evidence: What can gastroenterologist recommend? *Canadian Journal Gastroenterology*. 22(2): 169-175.
- Reid,G; Jass,J; Sebulsky,M; McCormick,K; 2003: Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(4):658-672.
- Richardson, DJ; Watmough, NJ. 1999: Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3: 207-219.
- Rinkinen, M; Jalava, K; Westermarck, E; Salminen, S; Ouwehand, AC; 2003: Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?. *Veterinary Microbiology*. 92:111-119.
- Ruíz GG; Andamayo DE; Castillo DE; Ruíz MA; Navarro VS. 2010: Determinación de los niveles plasmáticos de óxido nítrico en animals de experimentación, por influencia de la altura. *BIOFARBO*. 18(2): 85-89.
- Sauter, SN; Allenspach, K; Gaschen, F; Gröne, A; Ontsouka, E; Blum, JW; 2005: Cytokine expression in an ex vivo culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: Modulation by probiotic bacteria. *Domestic Animal Endocrinology*. 29:605-622.
- Scaglia F. 2010: New insights in nutritional management and amino acid supplementation in urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 100: S72-S76.
- Schyns G, Serra CR, Lapointe T, Pereira-Leal JB, Potot S, Flickers P, Perkins JB, Wyss M, Henriques AO. 2013: Genome of gut strain of *Bacillus subtilis*. *Genome Announcements*. 1(1): 1-2.
- Singh RH, Rhead WJ, Smith W, Lee B, Sniderman L, Summar M. 2005: Nutritional management of urea cycle disorders. *Critical Care Clinical*. 21: S27-S35.
- Solga SF. 2003: Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses*. 61(2): 307-313.
- Sonenshein, AL; 2000: Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 3:561-566.
- Strompfová, V; Marcináková, M; Simonová, M; Bogovic-Matijasic, B; Lauková, A; 2006: Application of potencial probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe*. 12:75-79.
- Strompfová, V; Lauková, A; Ouwehand, AC; 2004: Selection of enterococci for potential canine probiotic additive. *Veterinary microbiology*. 100: 107-114.

- Suchodolsky, JS; 2011: Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal Animal Science*. 89:1520-1530.
- Sun, G; Sharkova, E; Chesnut, R; Birkey, S; Duggan, MF; Sorokin, A; Pujic, P; Ehrlich, D; Hulett, M. 1996: Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis* . *Journal of bacteriology*. 178(5): 1374-1385.
- Tam, N, Uyen, N; Hong, H; Duc, L; Hoa, T; Serra, C; Henriques, A; Cutting, S. 2006: The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*. 188(7): 2692-2302.
- Tatsch E; Varga BG; Da Silva PR; Kober H; Agertt VA; Anraku MM; Gomes P; Medeiros FDM; Noal MR. 2011: A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clinical Biochemistry*. 44: 348-350.
- Wacker, I; Ludwig, H; Reif, I; Blencke, HM; Detsch, C; Stülke, J. 2003: The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology*. 149: 3001-3009.
- Waller, PA; Gopal, PK; Leyer, GJ; Ouwehand AC; Reifer C; Stewart, ME; Miller, LE. 2011: Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scandinavian Journal Gastrointestinal*, 46: 1057-1064.
- Wayne WD. Applied nonparametric statistics. Houghton Mifflin Company. Boston USA. 1978.
- Williams, P; 2007: *Bacillus subtilis*: A shocking message from a probiotic. *Cell Host & Microbe*. 1: 248-249.
- Wray, L; Atkinson, M; Fisher, S. 1994: The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* *nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* *glnB*-encoded P<sub>II</sub> protein. *Journal of Bacteriology*. 176(1): 108-114.
- Ye, RW; Thomas, SM. 2000: Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 307-312

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1. Resultados de la bioquímica inicial realizada a los sujetos experimentales.

IND	GÉN	AST U/L	ALT U/L	TRIG mg/dL	COL mg/dL	CREA mg/dL	BUN mg/dL	NH3 Umol/L
1	H	13	59	50	189	1.1	15	37
2	M	7	43	43	123	0.8	14	50
3	H	0	<10	31	123	0.7	15	39
4	M	0	<10	47	117	0.8	16	54
5	M	0	<10	50	173	1.2	20	44
6	H	0	55	<b>238</b>	200	1.1	19	51
7	M	8	35	49	182	0.9	27	49
8	H	0	17	65	191	0.9	10	41
9	H	0	NA	50	114	1.0	19	58
10	M	0	<10	56	133	0.9	13	47
<b>Rango normal</b>	-	<b>0-50</b>	<b>10-100</b>	<b>10-100</b>	<b>110-320</b>	<b>0.5-1.8</b>	<b>7-27</b>	<b>0-98</b>

## ANEXO 2. Determinación de la ración de alimento a ofrecer diariamente.

IND	PESO (Kg)	RAZA	NIVEL DE ACTIVIDAD	Kcal/día	GRAMOS ALIMENTO
1	10	C/Airdale	INACTIVO	463	152
2	5.8	Basenji	INACTIVO	321	105
3	5.7	Beagle	INACTIVO	317	104
4	5.6	Daschound	INACTIVO	313	103
5	7	Schnauzer	INACTIVO	364	119
6	7	Schnauzer	INACTIVO	364	119
7	7	Schnauzer	INACTIVO	364	119
8	8	Única	INACTIVO	398	130
9	4	Poodle	INACTIVO	253	83
10	8	Cocker	INACTIVO	398	130

## ANEXO 3. Descripción de la técnica de Griess.

La técnica de Griess se fundamenta en la detección colorimétrica de los metabolitos del óxido nítrico (nitritos  $\text{NO}_2$  y nitratos  $\text{NO}_3$ ) (Tatsch *et al.*; 2011), que constituyen un marcador de la cantidad de óxido nítrico presente en la sangre y se pueden determinar con facilidad por su reacción con el reactivo de Griess (1% Sulfanilamida/0.1% Nafiletileno diamina dihidroclorido/2.5%  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ). Se caracteriza por ser una prueba de elección debido a que es fácil, económica, rápida y altamente sensible (Miranda *et al.*, 2001; Tatsch *et al.*, 2011).

El  $\text{NO}_3$  se mide después de la conversión enzimática de éste a  $\text{NO}_2$ , por acción de la nitrato reductasa (González *et al.*, 2006; Tatsch *et al.*; 2011). Para ello, se colocaron las muestras, por triplicado, y se diluyeron 1:4 en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, luego se incubaron durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con  $5\mu\text{M}$  de FAD (Dinucleótido de Adenina y Flavina),  $50\mu\text{M}$  de NADPH (Dinucleótido de Adenina y Nicotilamida Fosfato y 200 U/L de la enzima Nitrato Reductasa)

Posteriormente, se agregó 0,001 g/ml de Lactato Deshidrogenada y 10 mM de Piruvato de Sodio y se incubaron durante 5 minutos. El montaje de esta técnica se realizó en placas

ELISA de 96 pocillos y fondo plano (Falcon, Becton Dickinson and Company), donde se incluyó por réplicas un blanco y un patrón de nitrito de sodio (500 mM) en tampón fosfato de pH=7,5 (15 uM K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 31 uM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [6:1]). A cada pocillo, se agregó 50 µl del sobrenadante de la muestra y 150 µl de reactivo de Griess y se incubó, en oscuridad durante 10 minutos para posteriormente medir su absorbancia a una densidad óptica de 595 nm en un lector de placas.

Las densidades ópticas se evaluaron automáticamente por el lector de ELISA, según la curva de calibración preparada para este experimento. La concentración de óxido nítrico, así determinada, fue proporcional a la concentración de nitritos y nitratos presentes en las muestras (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Los resultados de las concentraciones séricas de óxido nítrico fueron expresados en su media ± desviación estándar.