



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

**“EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS EN LA
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE UREA Y AMONIACO EN PERROS ADULTOS DE TALLA
PEQUEÑA CLÍNICAMENTE SANOS”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ELIZABETH CHÁVEZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Carlos Gutiérrez Olvera
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dra. Yazmín Alcalá Canto
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM
PhD. María Esther Ortega Cerrilla
Colegio de Postgraduados

Ciudad Universitaria, CDMX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 BELEN GARCÍA ALVIS,
TE QUIERO MADRE

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM por los apoyos otorgados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 640938 recibida durante el periodo 2015-1 a 2016-2.

A mi Comité Tutorial: Dr. Carlos Gutiérrez Olvera, Dra. Yazmín Alcalá Canto y PhD. María Esther Ortega Cerrilla por el apoyo y orientación brindados para la realización de este proyecto.

A los miembros de mi jurado: Dr. René Rosiles Martínez, Dra. Adriana Llorente Bousquets, Dr. Carlos Gutiérrez Olvera, Dra. Yazmín Alcalá Canto, Dr. Juan Carlos Ramírez Orejel por sus observaciones y contribución en el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. María de Consuelo García Figueroa por el análisis estadístico y corrección de estilo.

Agradecimientos Personales

Familia Gutiérrez Torres,
MVZ. Mario E. Méndez Medina,
MVZ. Raúl Ávila Gallardo,
M en C. Víctor H. Busto Sánchez y
MVZ. Sergio J. Sánchez Balcázar

RESUMEN

El concepto de nutrición se ha modificado gracias a la constante investigación. Se tiene evidencia de que muchos de los componentes de la dieta tienen relación con el desarrollo y progresión de múltiples patologías de tipo metabólico como diabetes, obesidad, síndrome metabólico, hepatopatías y nefropatías no infecciosas. Se ha observado que existen nutrimentos que producen un efecto benéfico al ser incluidos en la alimentación de los individuos, con base en ello se creó una nueva clasificación de los ingredientes derivada de sus propiedades no sólo nutrimentales sino también de por apoyo terapéutico. En esta clasificación se incluyen los llamados nutracéuticos; entre los que se encuentran los prebióticos, probióticos y simbióticos, analizados en este trabajo, con la finalidad de indagar su efecto en el metabolismo y balance del nitrógeno, para lo cual se utilizaron 15 perros adultos de talla pequeña, divididos en forma completamente aleatorizada en 3 grupos de 5 individuos cada uno. Los perros fueron alimentados diariamente con alimento comercial, racionados con base a su requerimiento energético diario. El experimento consta de 3 tratamientos: Probiótico (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*), Prebiótico (inulina 1%) y Simbiótico (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* más inulina 1%), administrados 1 vez/día durante 60 días. Se realizó medición de la concentración sérica de urea (U) y amoníaco (A) a los días 0, 15, 30, 45 y 60 con el equipo IDEXX Vet Test 8008. Los resultados obtenidos no muestran diferencia ($P>0.05$) en la concentración sérica de U y A entre tratamientos. Sin embargo existe diferencia ($P<0.05$) en cada uno de los tratamientos analizados respecto al tiempo. El único tratamiento que tuvo efecto benéfico es el prebiótico, evidenciado por la disminución de U.

Palabras Clave: Nutracéuticos, perros, urea, amoníaco, fibra, bacterias.

ABSTRACT

The concept of nutrition has been modified thanks to constant research. There is evidence that many of the diet components are related to the development and progression of multiple metabolic pathologies such as diabetes, obesity, metabolic syndrome, liver diseases and non-infectious nephropathies. It has been observed that there are nutrients that produce a beneficial effect if included in the food of individuals, derived from its properties not only nutritional but also for therapeutic support it was created a new classification of the ingredients. This classification includes the so called nutraceuticals; among which are the prebiotics, probiotics and synbiotics, analyzed in this work, in order to investigate their effect on metabolism and nitrogen balance, for which 15 adult small dogs were used, divided in a completely randomized manner in 3 groups of 5 individuals each. The dogs were fed daily with commercial feed, rationed based on their energy requirement. The experiment consists of 3 treatments: Probiotic (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*), Prebiotic (1% inulin) and Synbiotic (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* plus 1% inulin), administered 1 time / day for 60 days. The serum concentration of urea (U) and ammonia (A) was measured at days 0, 15, 30, 45 and 60 with the IDEXX Vet Test 8008 equipment. The results obtained show no difference ($P > 0.05$) in the serum concentration of U and A between treatments. However, there is a difference ($P < 0.05$) in each of the treatments analyzed with respect to time. The only treatment that had a beneficial effect is the prebiotic, evidenced by the decrease in U.

Keywords: Nutraceuticals, dogs, urea, ammonia, fiber, bacteria.

CONTENIDO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. | <i>Probióticos</i> | 2 |
| 1.1.1. | Características de los Probióticos | 3 |
| 1.1.2. | Funciones de los Probióticos..... | 4 |
| 1.1.3. | Ejemplos de Probióticos..... | 5 |
| 1.2. | <i>Prebióticos</i> | 7 |
| 1.4. | <i>Uso en la Salud</i> | 10 |
| 1.5. | <i>Uso en Perros</i> | 10 |
| 1.6. | <i>Participación en el Metabolismo del Nitrógeno</i> | 11 |
| 2. | JUSTIFICACIÓN..... | 14 |
| 3. | HIPÓTESIS..... | 14 |
| 4. | OBJETIVO GENERAL | 15 |
| 4.1. | <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> | 15 |
| 5. | MATERIAL Y MÉTODOS | 16 |
| 5.1. | <i>Animales de experimentación</i> | 16 |
| 5.2. | <i>Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación</i> | 17 |
| 5.3. | <i>Tratamientos</i> | 18 |
| 5.4. | <i>Toma de las Muestras</i> | 18 |
| 5.5. | <i>Determinación de la Concentración de Metabolitos Proteicos</i> | 18 |
| 5.6. | <i>Análisis Estadístico</i> | 19 |
| 6. | RESULTADOS..... | 20 |
| 6.1. | <i>Amoniaco</i> | 20 |
| 6.2. | <i>Urea</i> | 22 |
| 7. | DISCUSION..... | 29 |
| 8. | CONCLUSIONES | 34 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 35 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Producción y eliminación del amoniaco y la urea..... | 13 |
| Figura 2. Concentración de amoniaco en suero (μM) en perros suplementados con probióticos, prebióticos y simbióticos | 20 |
| Figura 3. Regresión lineal de la concentración de amoniaco en suero (μM) en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico | 21 |
| Figura 4. Concentración de amoniaco en suero respecto al rango fisiológico en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico | 22 |
| Figura 5. Concentración de urea en suero (mM) en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico | 23 |
| Figura 6. Regresión lineal de la concentración de urea en suero (mM) en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico | 24 |
| Figura 7. Concentración de urea en suero respecto al rango fisiológico en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico | 25 |
| Figura 8. Análisis de correlación de Pearson y linearización de la producción de urea respecto a la concentración de amoniaco de perros tratados con prebióticos | 26 |
| Figura 9. Análisis de correlación de Pearson y linearización de la producción de urea respecto a la concentración de amoniaco en perros tratados con probióticos | 27 |
| Figura 10. Análisis de correlación de Pearson y linearización de la producción de urea respecto a la concentración de amoniaco en perros tratados con simbióticos | 28 |

1. INTRODUCCIÓN

La evidencia de que una alimentación adecuada es uno de los pilares de la salud se ha ido consolidando en el estilo de vida de los humanos en los últimos años y recientemente se ha adecuado este esquema en la alimentación animal, sobre todo en los animales de compañía (perros y gatos) que comparten no sólo el espacio y el alimento con sus tutores, sino también los gustos y costumbres. Lo que lleva a la búsqueda de nuevas tecnologías alimentarias que satisfagan la necesidad de un alimento que no sólo brinde nutrimentos sino que también aporte un beneficio extra en el cuidado de la salud. Una de las líneas de investigación más reciente, en este sentido, es la búsqueda de propiedades o sustancias que puedan aportar éste beneficio (Araya y Lutz, 2003; Valenzuela, *et al.*, 2014).

Los alimentos por si solos cumplen la función de proporcionar nutrimentos a los individuos que los consumen; sin embargo y gracias a los avances tecnológicos, hoy podemos afirmar que además de esta función conocida como *Función nutrimental*, los alimentos también poseen funciones secundarias como: la *Función sensorial*, derivada de la capacidad que tienen los alimentos de estimular el apetito y que depende de las características organolépticas como: color, olor y sabor. En cuanto a la *Función saludable*, esta deriva de las sustancias químicas que contienen y los efectos positivos que aportan o promueven a la salud de los individuos (Araya y Lutz, 2003).

A partir de lo anterior se derivan conceptos como alimentos funcionales, nutracéuticos y complementos alimenticios, muy relacionados entre sí.

El término de *Alimento funcional* surgió en los años ochenta para definir a cualquier alimento o ingrediente que potencialmente proporcione beneficios a la salud, tanto en el mantenimiento del estado de salud como en la reducción del

riesgo de padecer una enfermedad, más allá del papel nutritivo básico (Sanders, 1998).

El concepto de *Nutracéutico* ha sido recientemente reconocido como "aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal" (Zeisel, 1999; Sloan, 1996).

Los *Complementos alimenticios o suplementos dietéticos*, como su nombre lo indica, son productos utilizados para complementar elementos que se encuentran en los alimentos como vitaminas, minerales, especies vegetales o botánicas, aminoácidos, extractos y concentrados, metabolitos necesarios para la adecuada función del organismo (Pérez-Leonard, 2006).

Dentro de los nutraceuticos han adquirido un papel relevante los *Probióticos, Prebióticos y Simbióticos*, con importantes funciones en la prevención y tratamiento de las enfermedades, así como en la regulación del metabolismo e incremento en la calidad de vida (Jones, 2002; Diplock, *et al.*, 1999).

1.1. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud en el huésped (FAO/WHO, 2002).

Los probióticos se definen como ingredientes fermentadores selectivos que producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, por lo tanto, también confieren beneficios para la salud en el huésped (Fuller, 1989; Gibson, *et al.*, 2010).

Fueron descritos por primera vez por Metchnikoff, en 1908, con base en sus observaciones sobre la longevidad de las personas que vivían en una región de Bulgaria; dicha longevidad la atribuía a la ingestión, de forma regular, de productos lácteos fermentados (Park y Floch, 2007).

1.1.1. Características de los Probióticos

Existen varios criterios que los microorganismos deben cumplir para ser considerados probióticos, deben ser seguros, viables y metabólicamente activos dentro del tracto gastrointestinal para ser beneficiosos para el huésped. Los candidatos a productos probióticos deben ser capaces de sobrevivir en un medio ácido y sales biliares durante por lo menos 90 minutos para llegar y adherirse al epitelio intestinal para una subsiguiente replicación (Lan-szu y Bart, 1999).

Idealmente los probióticos deben ser capaces de (Dunne, *et al.*, 2001; Tomasik, *et al.*, 2003):

- Originarse en la especie a ser tratada (productos de especies cruzadas podrían no colonizar bien el tracto gastrointestinal).
- Sobrevivir en un ambiente de pH bajo.
- Ser capaces de sobrevivir al contacto con la bilis.
- Adherirse a las células epiteliales intestinales.
- Estabilizar la microbiota intestinal inhibiendo los patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas.
- Ser no patógeno para el huésped.
- Tener la capacidad de multiplicarse rápidamente y colonizar el tracto gastrointestinal de forma permanente o temporal.
- Estimular al sistema inmunitario.
- Influir en la actividad metabólica, como la actividad de la lactasa y la producción de vitaminas.

- Sobrevivir en los alimentos y a la producción y envasado del producto.

1.1.2. Funciones de los Probióticos

Algunas de las funciones de los probióticos en el tracto gastrointestinal son (Floch, *et al.*, 2008):

- **Nutricionales:** síntesis de vitaminas del complejo B, mejoran la digestión de la ingesta del huésped gracias a la producción de enzimas proteolíticas.
- **Por su interacción con la microbiota del tracto gastrointestinal:** producción de factores antimicrobianos, competencia por los sitios de adhesión, disminución del pH en el lumen intestinal.
- **Físicas:** Aumento de la producción de moco, mejoran la reparación epitelial y previenen la apoptosis, aumenta la actividad enzimática de la membrana de las vellosidades intestinales.
- **Inmunológicas:** Activación de las respuestas inmunitarias específicas y de adaptación.

Los beneficios de la utilización de probióticos en animales domésticos incluyen: la modulación del sistema inmune, protección contra las infecciones causadas por enteropatógenos, aumento del crecimiento y desarrollo del huésped, control de trastornos alérgicos, (Sarowska, *et al.*, 2013; Walker, *et al.*, 2008) y por su efecto en el metabolismo del nitrógeno, no liberan amonio (NH_4^+) ni compuestos nitrogenados tóxicos (aminas) (Gibson, *et al.*, 2010; Salminen, *et al.*, 1999; Hall y German, 2007).

1.1.3. Ejemplos de Probióticos

Los microorganismos más comunes usados como probióticos son *Lactobacillus spp* (*L rhamnosus*, *L acidophilus*, *L casei*, *L plantarum*, *L reuteri*), *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus spp* (*S thermophilus*, *S faecium*), *Enterococcus faecium* y *Bifidobacterium spp* (*B bifidium*, *B breve*, *B lactis*, *B longum*) (Borchers, et al., 2004). De estos, *Lactobacillus spp*, *Enterococcus sp*, y *Bifidobacterium spp* se usan con mayor frecuencia en probióticos comerciales humanos y animales (Borchers, et al., 2004; Sauter, et al., 2006).

1.1.3.1. *Lactobacillus ssp.*

Los lactobacilos son bacilos Gram-positivos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, fermentadores estrictos. La glucosa la pueden fermentar predominantemente en ácido láctico (homofermentativos) o en cantidades equimolares de ácido láctico, monóxido de carbono (CO) y etanol (y/o ácido acético) (heterofermentativos) (Charteris, et al., 1997).

Los efectos benéficos que tienen sobre el huésped son:

- Colonizan rápidamente el epitelio intestinal de los vertebrados, lo que limita la incorporación de patógenos en el epitelio.
- A través de la fermentación, el lactato obtenido reduce el pH intestinal lo que limita el crecimiento de enterobacterias y ciertos enteropatógenos, como *Salmonella spp.*
- Tienen acciones inmunorreguladoras, incluida una mayor actividad de los macrófagos y la producción de inmunoglobulinas (Ig A) (Limdi, et al., 2006; Gotteland, et al., 2006).

1.1.3.2. *Bifidobacterium spp.*

Las bifidobacterias son bacilos polimórficos Gram-positivos que pueden aparecer individualmente, en cadenas o en grupos. Estas bacterias no forman esporas, no son móviles y no son filamentosas (Felis y Dellaglio, 2007). Su morfología varía de formas “Y” y “V” bifurcadas uniformes a ramificadas (Leahy, *et al.*, 2005). Son anaerobios obligados (algunas cepas pueden tolerar el oxígeno en presencia de dióxido de carbono (CO₂)) (Simpson, *et al.*, 2004). *Bifidobacterium* es sacarolítico, produce ácido acético y láctico en la proporción molar 3:2 sin producción de monóxido de carbono (CO). La enzima fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (enzima clave de la fermentación glucolítica), sirve como un carácter taxonómico en la identificación del género, pero no permite la diferenciación interespecies. Son catalasa negativas con la excepción de *Bifidobacterium indicum* y *Bifidobacterium asteroides*, cuando se cultivan en presencia de aire (Felis y Dellaglio, 2007).

Se reconoce como bacteria probiótica por la producción de ácido acético y ácido láctico que reduce el pH intestinal e inhibe competitivamente la colonización de enteropatógenos. También se ha propuesto que las bifidobacterias contrarrestan las alteraciones identificadas en la microbiota intestinal después de la terapia con antibióticos y para producir ciertas vitaminas del complejo B (Borchers, *et al.*, 2004).

1.1.3.3. *Enterococcus spp.*

Son cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos de la familia *Streptococcaceae*. Son de forma esférica a ovoide y se presentan en pares o cadenas cortas. Los enterococos son catalasa negativos, no forman esporas y generalmente no son móviles. Estas bacterias se encuentran comúnmente en la

microbiota intestinal de humanos y animales. *E faecium* SF68 es una cepa probiótica específica que se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades diarreicas (Borchers, *et al.*, 2004).

El género *Enterococcus* comprende 37 especies diferentes. *E faecalis* y *E faecium* son los más importantes porque se encuentran en mayor número, su papel patogénico y su multi-resistencia a antibióticos. Se han identificado cinco grupos en el género, el grupo *E faecalis* sp; el grupo *E faecium* sp, que incluye *E hirae*; el grupo *E avium* sp; el grupo *E gallinarum* sp; y los enterococos desagregados (Gotteland, *et al.*, 2006).

1.2. Prebióticos

Los prebióticos se definen como ingredientes fermentables no digestibles de los alimentos que actúan estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una de las especies de bacterias que están ya establecidas en el colon, o de un número limitado de ellas, por tanto, también confieren beneficios para la salud en el huésped (Gibson y Roberfroid, 1995; Andersson, *et al.*, 2001; Collins y Gibson, 1999).

Para que un sustrato dietético se clasifique como prebiótico debe cumplir los siguientes criterios:

1. El sustrato no debe hidrolizarse ni absorberse en el estómago o el intestino delgado.
2. Debe ser selectivo para las bacterias comensales benéficas en el colon tales como las bifidobacterias.
3. La fermentación del sustrato debería inducir efectos luminales y/o sistémicos beneficiosos dentro del huésped.

Los prebióticos consisten principalmente en oligosacáridos, moléculas de dos o más monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos, los cuales son fermentados en el colon por la microbiota formando ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente, acetato, propionato y butirato y otros metabolitos como lactato, piruvato, etanol, succinato y gases como: (CO₂), metano (CH₄) y ácido sulfhídrico (H₂S) (Roberfroid y Gibson, *et al.*, 2010).

Los AGCC acidifican el pH luminal que suprime el crecimiento de patógenos, también influyen en la motilidad intestinal. El butirato se metaboliza en gran medida por el epitelio colónico, donde sirve como el principal sustrato de energía y como un regulador del crecimiento y la diferenciación celular de la mucosa colónica (Roberfroid y Gibson, *et al.*, 2010; Mussatto y Mancilha, 2007).

Diversos sustratos pueden ser fermentados por la microbiota del colon; aportados por la dieta se encuentran los almidones resistentes, seguidos de polisacáridos no amiláceos derivados de plantas, como pectina, celulosa, hemicelulosa, goma guar. Oligosacáridos tales como lactulosa, rafinosa, estaquiosa y fructooligosacáridos (FOS), inulinas, isomaltooligosacáridos, lactilol, lactosacarosa, oligofructosa, pirodextrinas, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos (Sekhon y Jairath, 2010; Mussatto y Mancilha, 2007).

Las glicoproteínas de mucina, producidas por las células caliciformes en el epitelio colónico, los mucopolisacáridos como el sulfato de condroitina y heparina, y secreciones pancreáticas y bacterianas son otros sustratos fermentables, aunque en menor medida que los carbohidratos, al igual que algunas proteínas y péptidos que no fueron digeridos el intestino delgado (Manning y Gibson, 2004; Gibson, *et al.*, 2010).

Algunos estudios en perros sanos alimentados con una dieta suplementada con achicoria, como fuente de un oligosacárido fermentable, demostraron una consistencia fecal firme, pH fecal bajo, y el aumento de los niveles de bifidobacterias y disminución de *Clostridium perfringens* en sus heces en comparación con los animales con una dieta rica en proteínas (Zentek, *et al.*, 2003). Por el contrario, la alimentación de perros con bajo nivel de fibra dietética cuando se empleó pulpa de remolacha, observaron la disminución de *Fusobacteria* y el aumento de *Firmicutes* (Middelbos, *et al.*, 2010).

1.3. Simbióticos

Los simbióticos se refieren a la mezcla de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia y la implantación de suplementos dietéticos a base de microorganismos vivos en el aparato digestivo del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995; Andersson, *et al.*, 2001; Collins y Gibson, 1999).

Son suplementos nutricionales que combinan probióticos y prebióticos que actúan en conjunto de manera sinérgica, ya que se ha sugerido que una combinación de un probiótico y un prebiótico, podría ser más activa que un probiótico o prebiótico solo en la prevención de trastornos gastrointestinales. Sin embargo, el reto es determinar la mejor combinación para cada enfermedad y cada individuo (Bengmark, 2005; Geiner, *et al.*, 2007; Collins y Gibson, 1999).

Para establecer un simbiótico es necesario considerar que hayan demostrado beneficios individuales (probióticos y prebióticos) para determinar si hay efectos aditivos (Geiner, *et al.*, 2007). Ejemplos de simbióticos son Bifidobacteria + Fructooligosacáridos, *Lactobacilli* + Lactitol, Bifidobacteria + Galactooligosacáridos (Collins y Gibson, 1999).

1.4. Uso en la Salud

La utilización de ciertas cepas de bacterias como terapia o prevención de enfermedades patógenas del tracto gastrointestinal en humanos ha sido descrito desde comienzos del siglo XX. Fue el inmunólogo Elías Metchnikoff (premio Nobel de Medicina) el primero en estudiar los efectos benéficos del yogurt en la vida de las personas que se alimentaban con él, atribuyendo estos efectos al ácido láctico que producen los microorganismos ácido lácticos; el cual altera el pH del medio y provoca un efecto antagónico y una disminución en el crecimiento de las bacterias patógenas (Park y Floch, 2007).

Sin embargo, estudios epidemiológicos, realizados en humanos, dan evidencia de que el desarrollo de algunas enfermedades está relacionado directamente con la biota intestinal, siendo así que en la colonización el tracto gastrointestinal han coevolucionado juntos y juega un papel importante en la prevención de enfermedades debido a la interacción microorganismo-huésped, aunque, cuando el balance no es el apropiado y el mutualismo o simbiosis se ven alterados pueden propiciar el desarrollo de un trastorno o enfermedad (Vael, *et al.*, 2009; Rummel, 2009). Las modificaciones de la microbiota del intestino, ya sea en cantidad o composición, incrementan el riesgo de generar infecciones y causar problemas digestivos (Vanderhoof, 1998).

1.5. Uso en Perros

Una parte importante de la salud de los animales se deriva desde el intestino. El tubo digestivo alberga una comunidad microbiana compleja que afectan tanto a la absorción y el metabolismo de los nutrientes, así como funciones de protección del huésped. Cualquier alteración dentro de la microbiota intestinal pueden conducir al desarrollo de diversas enfermedades y trastornos (Lee y Hase, 2014).

Se sabe que la microbiota normal es uno de los mecanismos de protección en el tracto gastrointestinal de los animales ya que sirve como barrera contra la colonización de los microorganismos patógenos. Así mismo, la microbiota tiene diversos efectos en las funciones inmunológicas, fisiológicas y bioquímicas de su huésped, por lo que el uso de estos microorganismos como complemento alimentario se ha utilizado en la prevención, tratamiento o control de diversas enfermedades en el humano y recientemente se usan como mecanismos de prevención y/o tratamiento en diferentes patologías en perros y gatos (Lee y Hase, 2014).

1.6. Participación en el Metabolismo del Nitrógeno

Recientemente se ha observado que la utilización de microorganismos (probióticos) y sustratos que sirven de alimento a estos microorganismos (prebióticos) adicionados a la dieta en forma simultánea (simbióticos) tiene un efecto benéfico en el metabolismo del nitrógeno.

El hígado es el principal responsable de la mayor parte de la desintoxicación del amoniaco. El amoniaco se genera principalmente en el aparato digestivo por la acción bacteriana en la degradación de las aminas, los aminoácidos y las purinas, por la acción de la ureasa bacteriana sobre la urea y por el catabolismo intestinal de la glutamina. El amoniaco difunde a través de la mucosa intestinal a la circulación portal, donde llega al hígado. Después de la captación por los hepatocitos, el amoniaco se metaboliza por la conversión enzimática a urea en el ciclo mitocondrial de la urea o por su consumo en la síntesis de glutamina. A continuación la urea se excreta por el riñón. El amoniaco que se escapa al metabolismo hepático entra en la circulación sistémica donde otros tejidos, como los riñones, el músculo, el cerebro y el intestino, lo metabolizan mediante la formación de glutamina (Fig. 1) (Berg, *et al.*, 2008; Guyton y Hall, 2011; Webster, 2007).

La incapacidad del hígado para metabolizar el amoníaco o desviarlo de la sangre portal desde el hígado produce hiperamonemia (Berg, *et al.*, 2008; Guyton y Hall, 2011; Webster, 2007).

En el caso de la insuficiencia renal existe un aumento de la concentración de urea y otros compuestos nitrogenados como el ácido úrico y la creatinina, aunque también pueden verse afectados por el estado de hidratación, el contenido de proteínas en la dieta, hemorragias digestivas, la tasa de filtración glomerular y la diuresis de líquidos y solutos (Berg, *et al.*, 2008; Guyton y Hall, 2011; Webster, 2007).

La azotemia y la uremia se deben a la acumulación de subproductos del catabolismo, de una ingesta proteica excesiva y de la degradación de la proteína endógena. Un consumo demasiado elevado de proteína, exacerba la azotemia y la morbilidad de la insuficiencia renal crónica (IRC), sin embargo, una restricción proteica severa puede promover un déficit proteico alterando la respuesta inmune, reducción en la producción de hemoglobina y la concentración de proteínas plasmáticas, además de promover el desgaste muscular. Algunos estudios han mostrado que la reducción de la ingesta proteica, reduce el nitrógeno ureico en sangre (BUN) (Blood urea nitrogen, por sus siglas en inglés) y mejora el cuadro clínico en los perros con IRC (Polzin, *et al.*, 1983; Leibetseder y Neufeld, 1991; Jacob, *et al.*, 2002).

Se ha mostrado que la fibra fermentable de la dieta, influye en la excreción de nitrógeno (N₂) y las concentraciones sanguíneas de urea. Esta fibra altera el flujo de urea y amoníaco en el intestino grueso y ciego, desplazando la excreción desde los riñones a través de la orina, hasta el intestino grueso a través de las heces, esto promueve la reducción del BUN. La fibra fermentable aumenta el crecimiento y la actividad bacteriana en intestino grueso. La producción de AGCC, obtenidos a partir de la fermentación, son utilizados por las células del colon como

fuerza de energía, lo que promueve el crecimiento del epitelio y se aumenta el área de superficie. Se incrementa el flujo sanguíneo al colon, lo que conlleva a una mayor disposición de la urea y con ello un aumento de la excreción de N_2 . Las bacterias que proliferan en el colon, producen ureasas que convierten la urea en amoníaco y (CO_2) , este amoníaco es utilizado como fuente de N_2 para la síntesis de proteína bacteriana, esto promueve la reducción del BUN debido a la incorporación en las bacterias y que será eliminado a través de las heces (Fig. 1) (Titens, *et al.*, 1996; Younes, *et al.*, 1997; Assimon y Stein, 1994; Bliss, *et al.*, 1996; Howard, *et al.*, 1997, Brown, *et al.*, 1998).

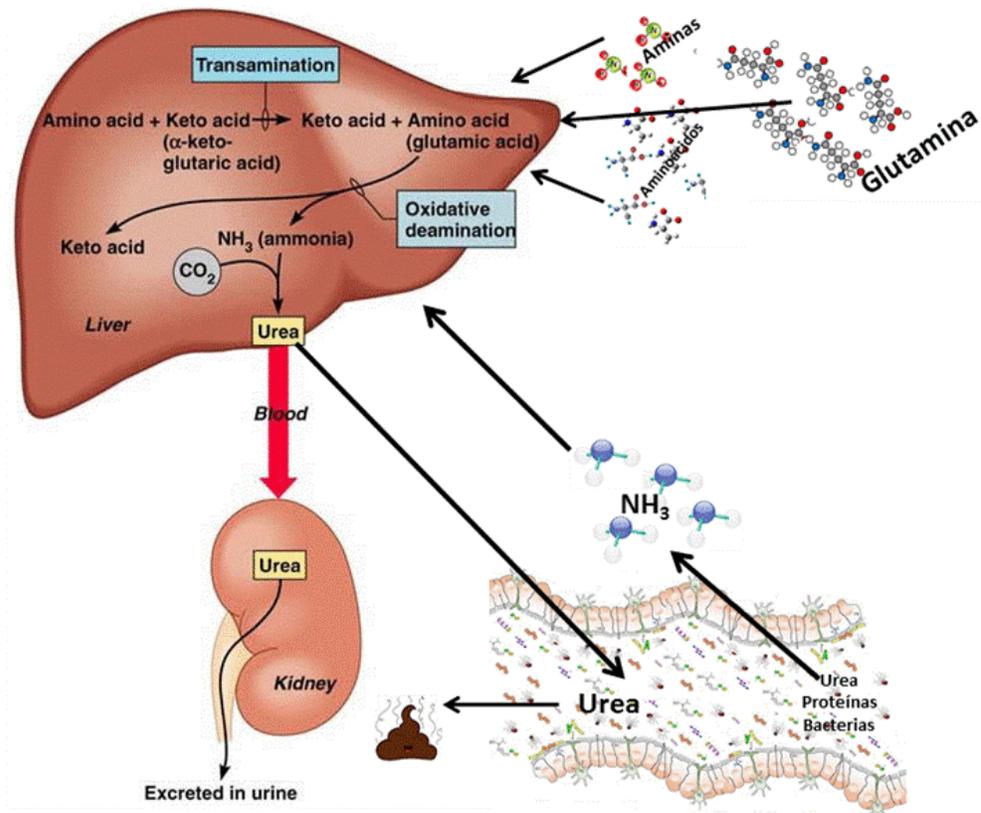


Figura 1. Producción y eliminación del amoníaco y la urea

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe en el mercado una amplia gama de productos nutracéuticos o complementos alimenticios que contienen probióticos, prebióticos o simbióticos y, de uso más reciente, en productos veterinarios para pequeñas especies, cuyos beneficios no son del todo claros o manifiestos. Dado que la administración de estos productos en perros y gatos se ha hecho por traspolación de los efectos terapéuticos en humanos, se requiere de estudios particulares en estas especies con el fin de conocer los efectos reales en el organismo, siendo uno de ellos el uso de compuestos nitrogenados resultantes del metabolismo proteico, a través de la medición de ciertos parámetros como amoniaco y urea en sangre.

3. HIPÓTESIS

La complementación de un simbiótico (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* e inulina) en la dieta para perros sanos, tiene una mayor eficiencia en la disminución de la concentración sérica de los productos del metabolismo de proteínas, que la adición de un probiótico (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*) y un prebiótico (inulina) en forma separada.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inclusión de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* como probiótico, inulina (1% de la ración diaria) como prebiótico y la combinación de ambos como simbiótico en la concentración sérica de los productos del metabolismo de proteínas (urea y amoniaco) en perros adultos de talla pequeña clínicamente sanos.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración de urea en suero de perros adultos sanos tratados con una dieta adicionada con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* como probiótico, inulina (1% de la ración diaria) como prebiótico y la combinación de ambos como simbiótico.
2. Determinar la concentración de amoniaco en suero de perros adultos sanos tratados con una dieta adicionada con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* como probiótico, inulina (1% de la ración diaria) como prebiótico y la combinación de ambos como simbiótico.
3. Analizar el efecto tiempo-tratamiento de la concentración de la urea y el amoniaco.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales de experimentación

Se utilizaron 15 perros adultos de talla pequeña (de 5 a 9 kg peso corporal), entre 1 a 3 años de edad. Se realizó examen físico general y química sanguínea a los sujetos de experimentación con la finalidad de definir su estado de salud.

Los animales fueron alimentados con alimento comercial seco de la marca Exceed Member's Mark®, con una densidad energética de 353 kilocalorías de energía metabolizable por 100 gramos de peso del alimento (EM kcal/100g), calculada mediante el análisis garantizado impreso en la etiqueta y factores *Atwater* modificados (Thatcher, *et al.*, 2000) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cálculo de la densidad energética del alimento comercial Exceed Member's Mark®

| Nutrimento | % de Inclusión | | Factor <i>Atwater</i> modificado para Perros | Kcal/g |
|--|-----------------------|---|---|---------------|
| Proteína Cruda | 26 | * | 3.5 | 91 |
| Grasa Cruda | 16 | * | 8.5 | 136 |
| Fibra Cruda | 3 | | | |
| Humedad | 12 | | | |
| Cenizas | 7 | | | |
| Elementos libres de nitrógeno (carbohidratos) | 36 | * | 3.5 | 126 |
| EM kcal/100g | | | | 353 |

El porcentaje de inclusión de carbohidratos (% ELN) se calculó a partir de restarle a 100 la suma de todos los elementos del análisis garantizado, esto es:

$$\% \text{ ELN} = 100 - (\% \text{ Proteína Cruda (PC)} + \% \text{ Grasa Cruda (GC)} + \% \text{ Fibra Cruda (FC)} + \% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas})$$

La ración de alimento ofrecido se calculó con base en el requerimiento energético diario (RED) para mantenimiento de perros adultos intactos y la densidad energética del alimento (Thatcher, *et al.*, 2000) dividida en 2 porciones. Se proporcionó agua *ad libitum* y se mantuvieron con sus tutores hasta el final del experimento.

El RED se obtuvo mediante el cálculo del requerimiento energético en reposo (RER) por una constante de 1.8 que corresponde a perros adultos intactos ($\text{RED} = \text{RER} * 1.8$). El RER se calculó de acuerdo al peso corporal en kilogramos (PC_{kg}) elevado a una potencia de 0.75, por una constante que es 70 (utilizada en el caso de mamíferos) ($\text{RER} = 70 * (\text{PC}_{\text{kg}})^{0.75}$).

5.2. Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación

- a) **Inclusión:** Todos aquellos individuos clínicamente sanos, con un peso corporal <10 kg, condición corporal 3/5, de 1 a 3 años de edad.
- b) **Exclusión:** Todos aquellos individuos que no cumplieron con el perfil solicitado.
- c) **Eliminación:** Todos aquellos individuos que durante el estudio aumentaron su condición corporal o enfermaron.

5.3. Tratamientos

Se formaron tres grupos de cinco perros cada uno: Grupo I dieta con probiótico, alimento comercial adicionado con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*, Grupo II o dieta con prebiótico, alimento comercial adicionado con inulina y Grupo III o dieta con simbiótico; alimento comercial adicionado con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* e inulina.

El probiótico utilizado fue de la marca Probiolog® de laboratorio Mayoly Spinder. La concentración de probiótico adicionada a la ración diaria de los animales fue de 6 log UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*, equivalente a dos cápsulas al día. Para el caso de la inulina, ésta se adicionó a razón del 1% del total de la ración del alimento diario.

Para evitar trastornos gastrointestinales ocasionados por el cambio de alimento, se realizó una transición alimenticia con un periodo de adaptación de 15 días.

5.4. Toma de las Muestras

Se realizó punción de la vena cefálica a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de tratamiento.

5.5. Determinación de la Concentración de Metabolitos Proteicos

La determinación de urea y amoniaco se realizó en forma automatizada con el equipo IDEXX Vet Test 8008.

5.6. Análisis Estadístico

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. El tamaño de la muestra es de 5 perros por tratamiento ($n = 5$).

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de dos vías con prueba de Bonferroni t-test para diferencia de medias en el programa SIGMA PLOT 13.

6. RESULTADOS

6.1. Amoniaco

En la concentración sérica de amoniaco (Fig. 2) de perros tratados con probióticos, prebiótico y simbiótico no se observó diferencia entre tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo el análisis de regresión lineal (Fig. 3) mostró diferencias en el tiempo ($p < 0.05$) en todos los tratamientos.

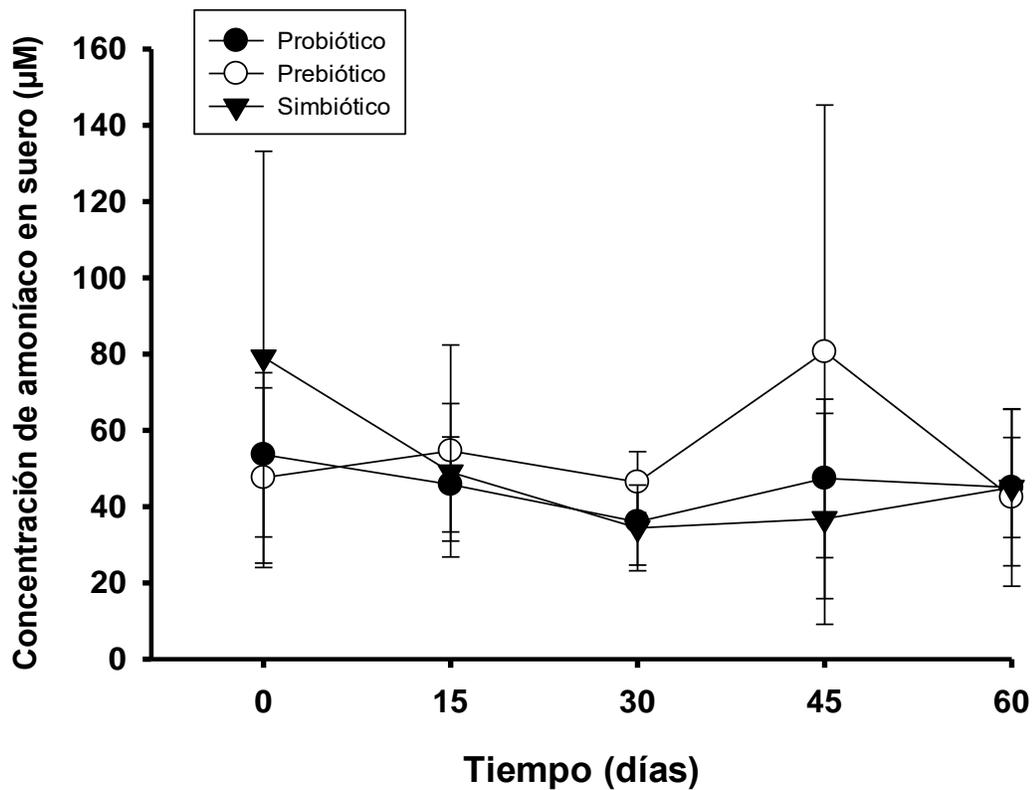


Figura 2. Concentración de amoniaco en suero (μM) en perros suplementados con probióticos, prebióticos y simbióticos

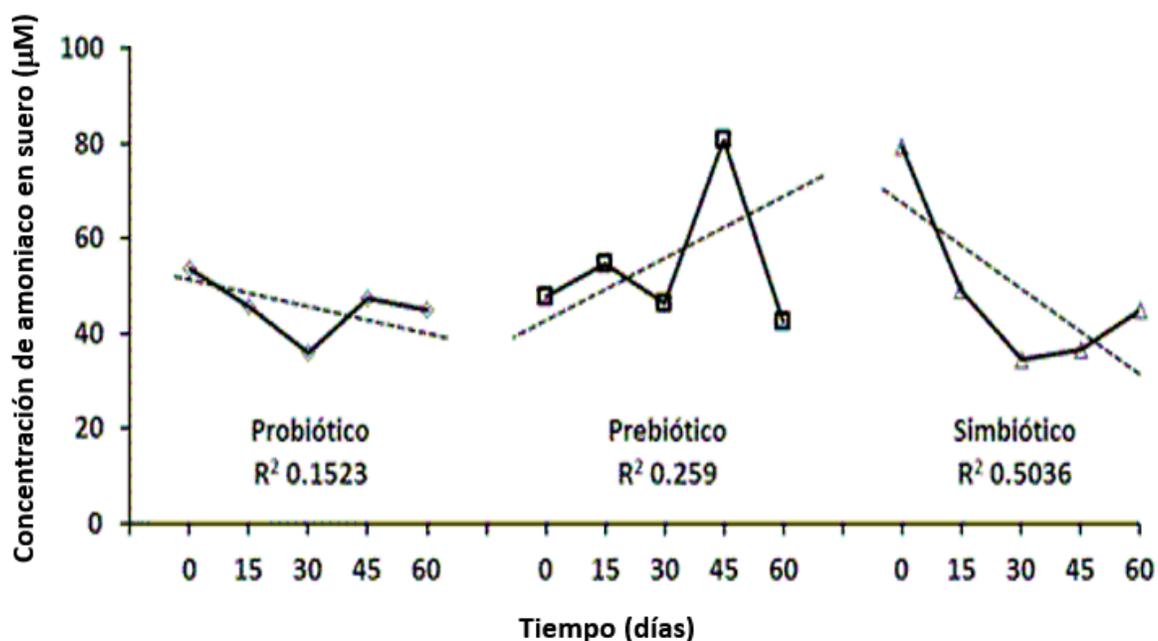


Figura 3. Regresión lineal de la concentración de amoniaco en suero (μM) en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico

El comportamiento del amoniaco en el tiempo tuvo un efecto cuadrático en todos los tratamientos, con tendencia a incrementar en el grupo de individuos que recibieron el prebiótico al día 45 y a disminuir en los otros dos grupos a mitad del estudio, con un ligero incremento hacia el final.

Es importante mencionar que los valores de amoniaco observados en todos los tratamientos (excepto el tratamiento adicionado con prebiótico a los 45 días) permanecieron dentro del rango de la concentración normal reportada en perros (15 – 54 $\mu\text{mol/L}$) (Willard, *et al.*, 2002) (Fig. 4).

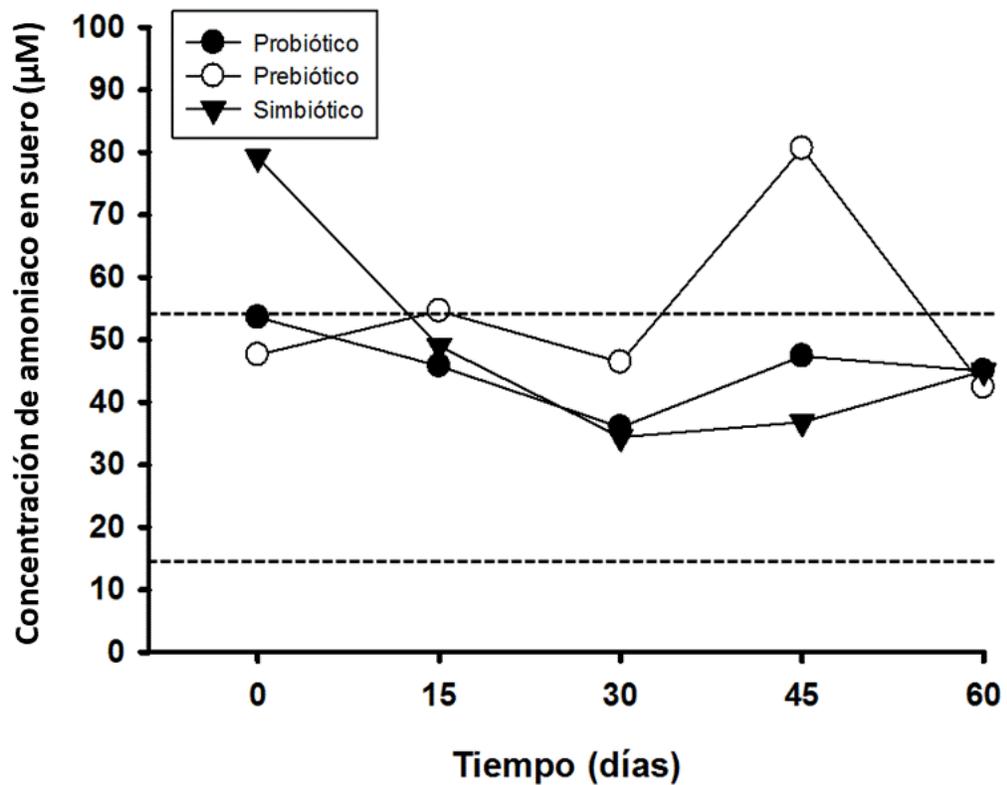


Figura 4. Concentración de amoniaco en suero respecto al rango fisiológico en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico

6.2. Urea

La concentración sérica de urea no mostró diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo se observó un comportamiento cuadrático en el tiempo (Fig. 5). El análisis de regresión mostró una tendencia a la disminución de la urea en el tratamiento con prebióticos al día 45 (Fig. 6).

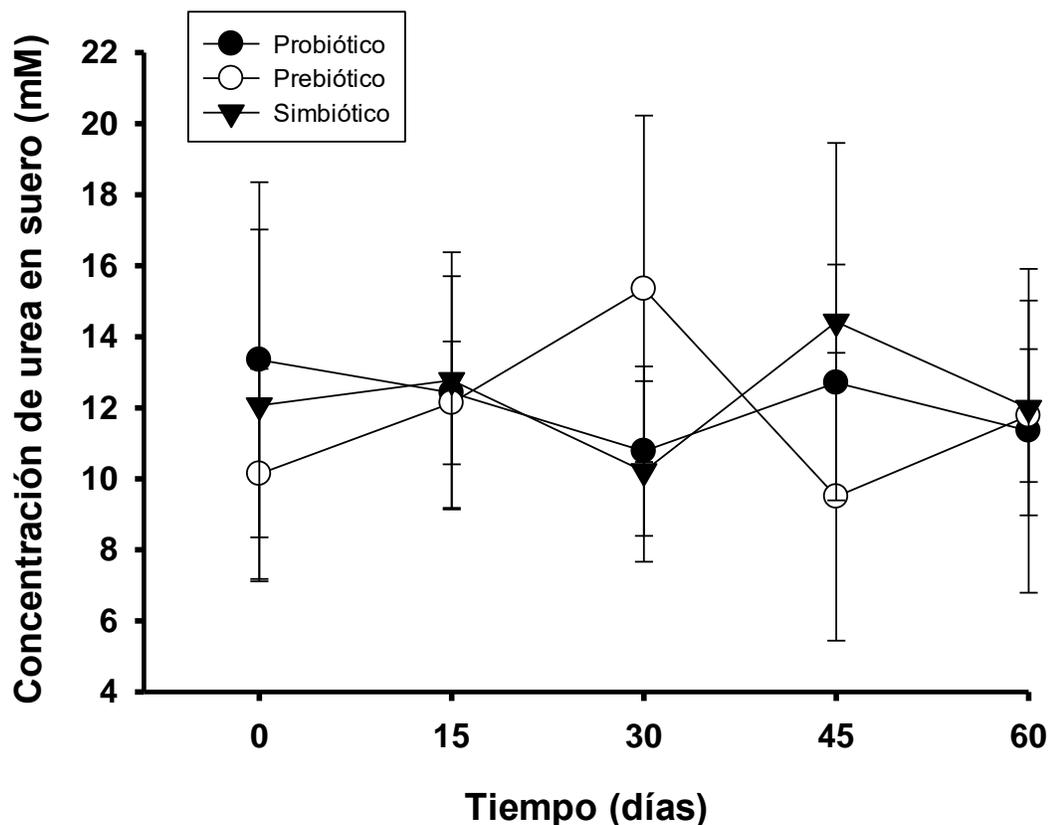


Figura 5. Concentración de urea en suero (mM) en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico

Los resultados de este metabolito en los animales del presente estudio se encuentran por arriba del límite superior reportado en perros (2.5 – 11.5 mM) (Willard, *et al.*, 2002) (Fig. 7), excediendo el valor del límite superior en los tres tratamientos, en un rango que va del 10 al 35% del valor señalado.

Pese a que no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en la concentración sérica de urea entre tratamientos, se observó que al igual que el amoníaco tiene un comportamiento cuadrático en relación al tiempo y que existieron diferencias ($p < 0.05$) en todos los tratamientos (Fig. 5).

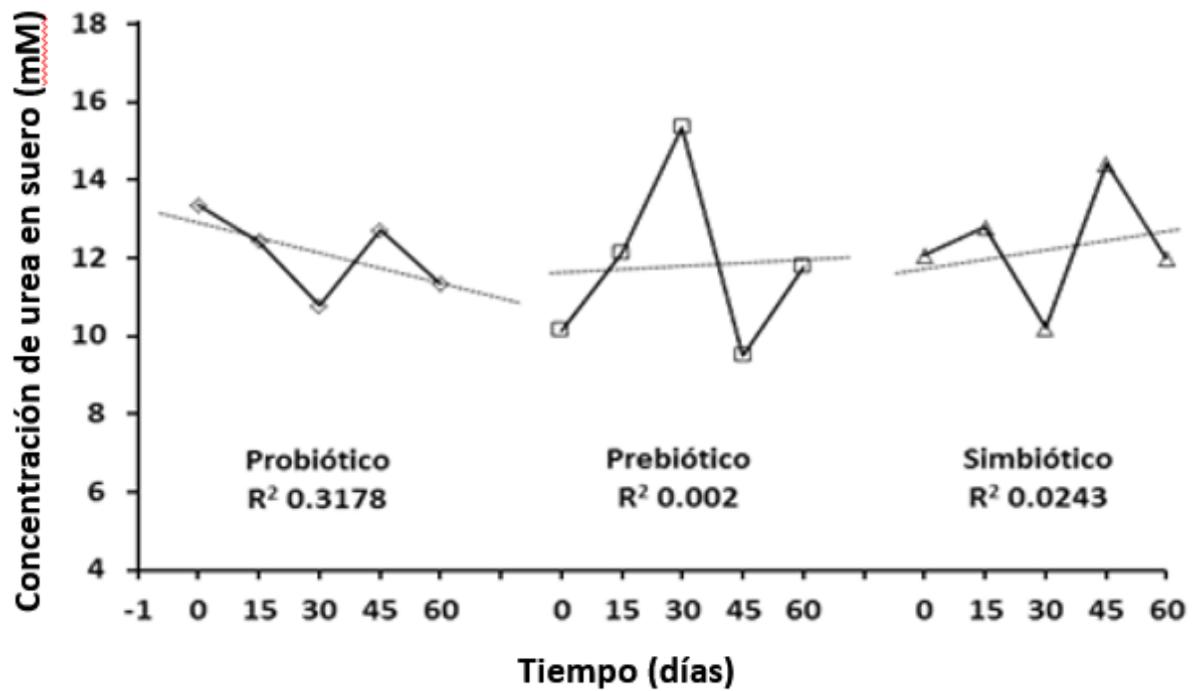


Figura 6. Regresión lineal de la concentración de urea en suero (mM) en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico

El análisis de regresión de cada uno de los tratamientos mostró un comportamiento que tuvo tendencia a normalizarse con el tiempo (Fig. 6).

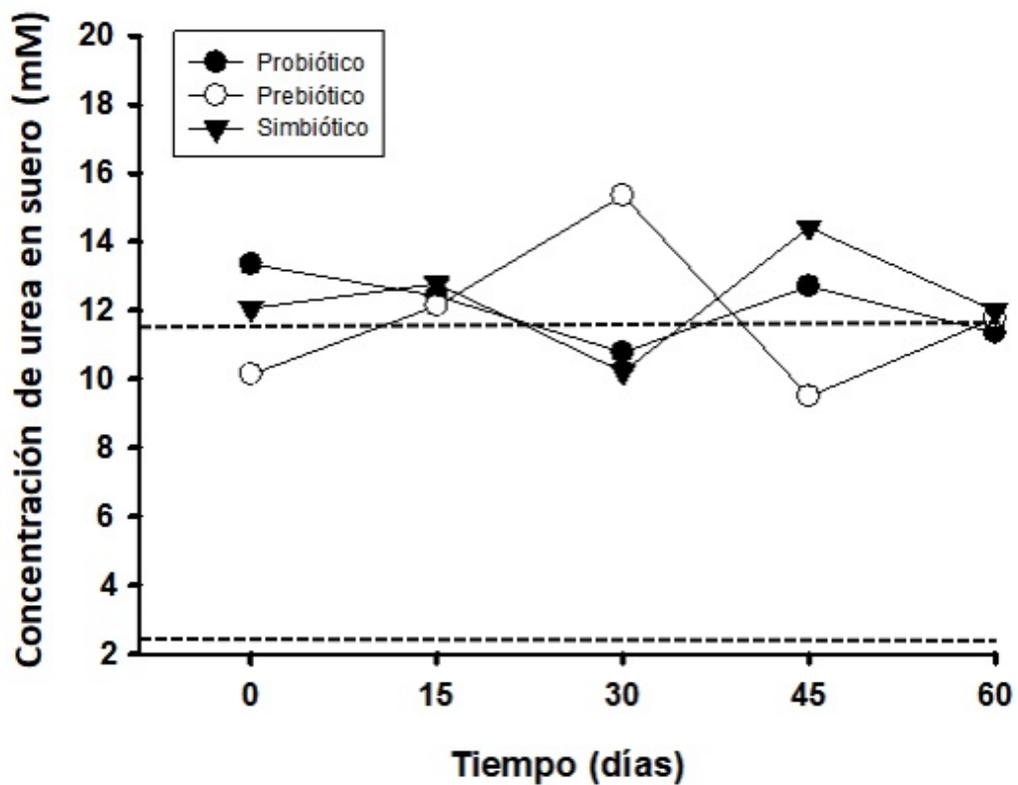


Figura 7. Concentración de urea en suero respecto al rango fisiológico en perros suplementados con probióticos, prebiótico y simbiótico

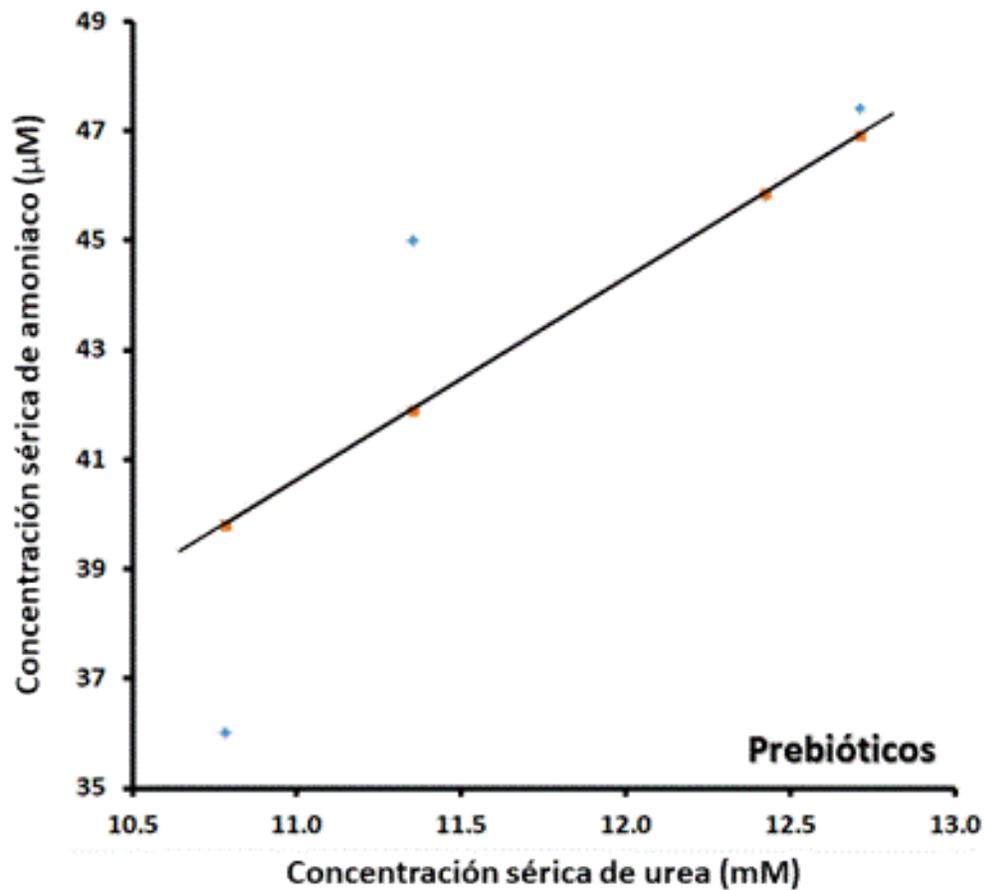


Figura 8. Análisis de correlación de Pearson y linearización de la producción de urea respecto a la concentración de amoniaco de perros tratados con prebióticos

En la figura 8 podemos observar que la concentración de amoniaco es dependiente de la concentración de urea en el grupo de animales tratados con prebióticos. Por cada valor incrementado de urea existe un incremento en la formación del amoniaco, lo que sugiere que no hay efecto benéfico.

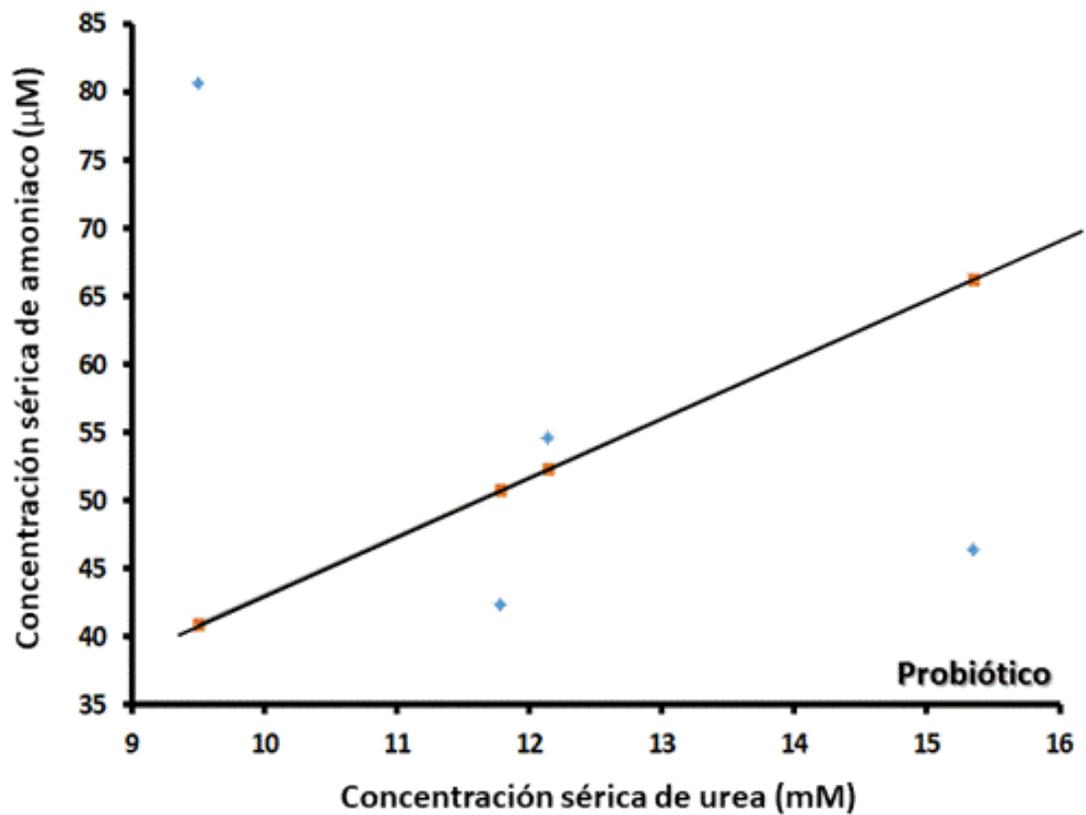


Figura 9. Análisis de correlación de Pearson y linearización de la producción de urea respecto a la concentración de amoniaco en perros tratados con probióticos

Existe correlación positiva tiempo-tratamiento entre la concentración sérica de urea y la concentración sérica de amoniaco ($p < 0.05$) en los perros suplementados con probióticos, lo que sugiere que por cada unidad de urea incrementada habrá mayor concentración sérica de amoniaco en sangre (Fig. 9).

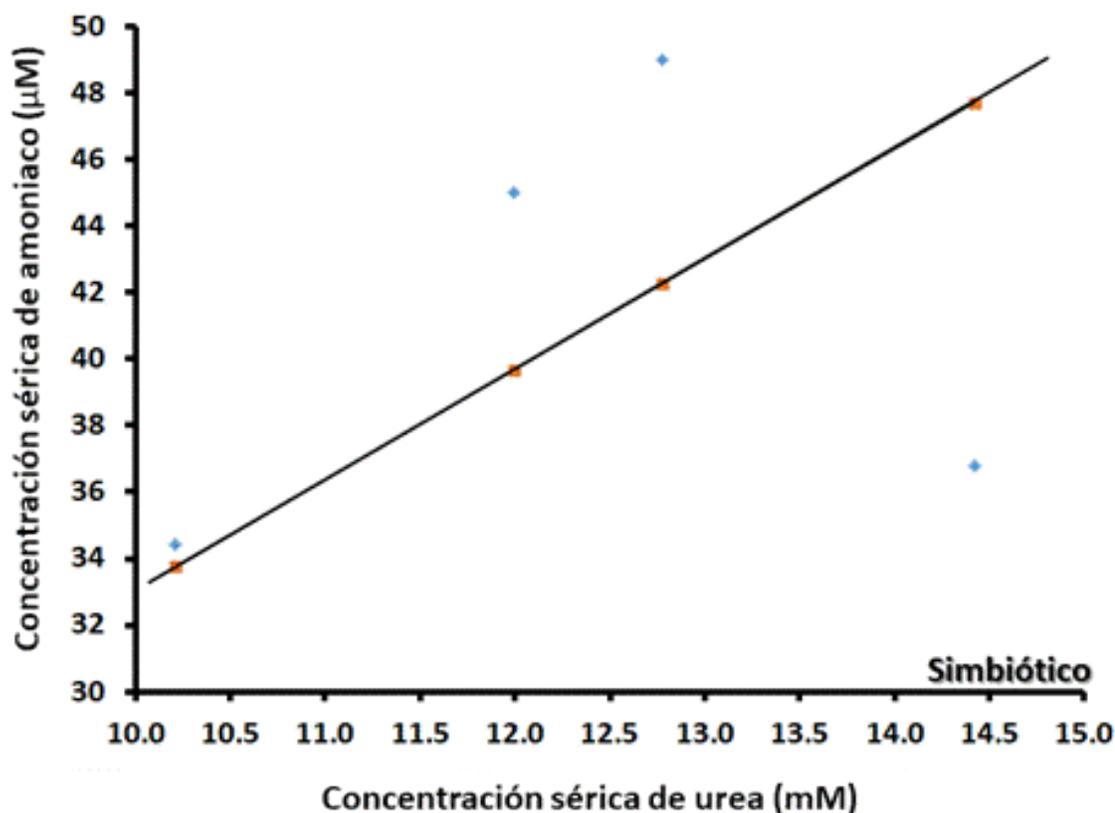


Figura 10. Análisis de correlación de Pearson y linearización de la producción de urea respecto a la concentración de amoniaco en perros tratados con simbióticos

En la figura 10 se observa el análisis de la correlación existente entre la producción de urea, medida como concentración sérica, y el correspondiente incremento de amoniaco en suero en perros que recibieron como suplemento la combinación de un prebiótico y un probiótico (simbiótico). En la gráfica se aprecia claramente una pendiente más acentuada comparada con los tratamientos en forma independiente (prebiótico y probiótico), lo que sugiere que este nutraceutico no tiene efecto en la prevención y/o control de la formación y eliminación de amoniaco sanguíneo.

7. DISCUSION

En el presente estudio se evaluó el efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en el equilibrio del nitrógeno en perros, para lo cual se analizaron diferentes concentraciones de amoniaco y urea en suero.

El amoniaco (NH_3^+) es un producto del metabolismo del nitrógeno (N_2) de todas las células del organismo, pero especialmente de las del intestino, el hígado y los riñones. La mayor parte del amoniaco producido es utilizado por el hígado para la producción de urea (Fig. 1), la cual también es un producto de deshecho pero menos tóxico que el amoniaco. En condiciones fisiológicas la tasa de producción y eliminación es estable y se mantienen estrechamente reguladas.

Los resultados obtenidos en los distintos tratamientos de este estudio reportan que no existieron diferencias entre ellos ($p > 0.05$), sin embargo se encontró una diferencia significativa en el tiempo ($p < 0.05$) en todos los tratamientos, lo que es indicativo de que a mayor tiempo de uso de estos productos los efectos se acentúan. Además de lo anterior, el comportamiento del amoniaco en el tiempo tiene un efecto cuadrático en todos los tratamientos, con una tendencia a incrementar en el grupo de individuos que recibieron el prebiótico y a disminuir en los otros dos grupos a mitad del estudio (fuera de las concentraciones normales), con un ligero incremento hacia el final (dentro de las concentraciones normales) (Fig. 2). Es importante mencionar que los valores de amoniaco observados en todos los tratamientos (excepto el tratado con prebiótico a los 45 días) permanecieron dentro del intervalo de la concentración normal reportada en perros (Fig. 4).

Gibson, *et al.* (2004) y Flickinger, *et al.* (2002) sostienen que el consumo de prebióticos conduce a la regulación del crecimiento y tipo de bacterias del intestino, propiciando un mayor número de bacterias benéficas como *Lactobacillus*

spp y *Bifidobacterium spp*. Estas bacterias tienen la capacidad de fermentar carbohidratos no digestibles, reducir el pH del intestino produciendo AGCC, ayudan a la exclusión competitiva de patógenos, estimulan la producción de inmunoglobulinas, entre otros efectos benéficos. Por otro lado Jenkins, *et al* (1999) mencionan que el efecto benéfico de los prebióticos se debe a la capacidad de las bacterias para utilizarlos como sustrato, lo que contribuye al crecimiento bacteriano y consecuentemente ayuda al huésped en la disminución de la concentración sérica de esta molécula debido a que es una de las fuentes de N_2 para el metabolismo bacteriano de proteína. En el presente estudio, la concentración de amoníaco tiene un comportamiento cuadrático en el tiempo, esto es, tiende a disminuir hacia el día 30, con un incremento en el día 45 y una nueva disminución el día 60, lo que sugiere una alteración en el crecimiento bacteriano por una posible saturación por el sustrato y adaptación de las bacterias al mismo.

Estudios en ratas adicionadas con diferentes tipos de fibras a una concentración de 8%, se observó una disminución de las concentraciones plasmáticas de urea un 37%. (Younes, *et al.*, 1996) La disminución de la concentración plasmática de urea puede explicarse por el metabolismo o actividad bacteriana del N_2 en el ciego. La mezcla de oligo/fibra genera la proliferación bacteriana caracterizada por la producción de AGCC, disminución del pH cecal y marcada hipertrofia cecal. A la concentración de 8% de oligo/fibra, la absorción de BUN en el ciego se incrementó en más de 2 veces. Hubo un aumento compensatorio en el flujo de N_2 amoniacal desde la luz del intestino hacia sangre a niveles más altos (dentro de las concentraciones normales), la dirección del N_2 se mantuvo fuertemente en la dirección del lumen cecal en las ratas alimentadas con oligoelementos (Younes, *et al.* 1996).

La urea ($CO (NH_2)_2$) es sintetizada en el hígado a partir de amoníaco (ciclo de la urea), se secreta al torrente sanguíneo y finalmente es filtrada por los riñones para excretarse en la orina. Debido a que la urea representa entre el 80-90% del

N₂ urinario, la excreción urinaria del N₂ ureico es un valioso indicador del estado del catabolismo celular y tisular (Konstantinides, 1992). La concentración sanguínea se puede incrementar por: la actividad muscular, traumas, infecciones, ayuno, etc. Los resultados de este metabolito en los animales del presente estudio se encuentran por arriba del límite superior reportado en perros (11.5 mM) (Willard, *et al.*, 2002) (Fig. 7). Pese a que no se encontraron diferencias en la concentración sérica de urea entre tratamientos ($p > 0.05$), se puede observar que, al igual que el amoníaco, tuvo un comportamiento cuadrático en relación con el tiempo y existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los tratamientos (Fig. 8). El análisis de regresión de los tratamientos mostró un comportamiento que tendió a normalizarse con el tiempo (Fig. 9).

De acuerdo con Younes, *et al.* (1995) y Tetens, *et al.* (1996) un desplazamiento de la excreción de N₂ de la orina hacia las heces depende en gran medida de la eficacia de los tipos de fibra que se utilizan para mejorar la proliferación bacteriana cecal, el aumento de la masa bacteriana fecal y la excreción de N₂ a través de esta ruta. En este estudio se muestra una ligera disminución en las concentraciones de amoníaco al día 30 y la mayor concentración de urea para el mismo día, lo que sugiere que hubo una mayor utilización de amoníaco por parte de las bacterias como fuente de N₂ y por lo tanto una mayor formación de urea como parte del metabolismo de éstas.

En estudios realizados en ratas, alimentadas con inulina (15%) y caseína (normal; 15% y alto; 45%), para determinar el balance de N₂ y los procesos de intercambio de éste entre el plasma y el intestino grueso, no observaron cambios en los grupos adicionados con caseína, mientras que aquellos que recibieron inulina, disminuyen (aparentemente) la absorción de N₂ en el intestino, en este mismo grupo de animales, además se observó acidificación del contenido e incremento de la reserva de ácidos grasos volátiles en ciego y la hipertrofia del epitelio de este órgano. Lo que sugiere un efecto benéfico ya que al incrementar la

excreción del N₂ por vía cecal disminuye su eliminación a través de la vía renal previniendo las nefropatías metabólicas, fenómeno que se observa con mayor frecuencia en los animales cuando son alimentados con los requerimientos de proteína recomendados por NRC (National Research Council, por sus siglas en inglés) (Levrat, *et al.*, 1992). En otro estudio hecho por Younes, *et al.* (1996) en la misma especie adicionadas con diferentes tipos de fibras a una concentración de 8%, observaron una descenso de las concentraciones plasmáticas de urea de un 37%. La alimentación con la mezcla de oligo/fibra provocó una proliferación bacteriana caracterizada por la producción de AGCC, disminución del pH cecal y marcada hipertrofia cecal. Al nivel de 8% de oligo / fibra, la absorción de nitrógeno ureico de la sangre en el ciego se incrementó en más de dos veces.

En un estudio realizado en perras adultas (ovariorrectomizadas), para evaluar los efectos de la inclusión de diferentes tipos de fibra en la dieta sobre el contenido energético y la concentración de N₂ de la misma, y los cambios de la microbiota en el intestino, se observó una disminución en la ingesta e incremento de la digestibilidad de la materia seca, y un aumento en el conteo de bacterias aeróbicas en el colon distal, en los animales que recibieron dietas adicionadas con FOS. Por otro lado, en los animales que recibieron una mezcla de goma arábica y FOS se observó una mayor excreción de N₂ (g/día) microbiano en heces y una disminución en el conteo de *Clostridium spp* en el íleon (Howard, *et al.*, 2000).

En la evaluación de probióticos (*Bacillus subtilis*) en perros adultos, no se observó disminución de la concentración sérica de urea; sin embargo, existe un incremento de la concentración de amoníaco ($p < 0.05$) en los periodos de 30 a 45 y 30 a 60 días (Cosio, 2014), resultados similares a los encontrados en este estudio donde se observa un incremento de esta molécula al día 45 de tratamiento. Por otro lado en la evaluación de los efectos de los prebióticos (inulina), en perros domésticos, se observó una disminución de la concentración sérica de amoníaco a los 90 días de tratamiento, sin evidencia de cambios en las

concentraciones de urea (Pérez, 2014), comparado con nuestro estudio podemos observar que hay una diferencia de 60 días en la aparición de los cambios en la concentración de esta molécula.

8. CONCLUSIONES

La inclusión de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* como probiótico no tiene efecto sobre los parámetros metabólicos del nitrógeno: concentración de amoníaco y urea.

La inclusión de inulina (1% de la ración diaria) como prebiótico tiene efecto positivo sobre los parámetros metabólicos del nitrógeno, disminuyendo la concentración de urea, sin efecto en la concentración de amoníaco.

La inclusión de la combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* e inulina (1% de la ración diaria) como simbiótico no tiene efecto sobre los parámetros metabólicos del nitrógeno: concentración de amoníaco y urea.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson H, Asp N-G, Bruce A, Roos S, Wadstrom T, Wold AE. Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scand J Nutr.* 2001; 45:58-75.
- Araya LH, Lutz RM. Alimentos Funcionales y Saludables. *Rev. Chil. Nutr.* 2003; 30:8-14.
- Assimon SA, Stein TP. Digestible fiber (gum arabic), nitrogen excretion and urea cycling in rats. *Nutr.* 1994; 10:544-550.
- Bengmark S. Bioecological control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented Probiotics and Synbiotics. *Gastroenterol Clin North Am.* 2005; 34:413-436.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica.* 6ª ed. España: Reverté, S. A.; 2008. pp. 649-678.
- Bliss DZ, Satein TP, Schleifer Cr, *et al.* Supplementation with gum arabic fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentrations in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63:392-398.
- Borchers A, Keen C, Gershwin M. Probiotics and prebiotics. En: Gershwin M, Nestel P, Keen C, eds. *Handbook of Nutrition and Immunity.* Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
- Brown SA, Reinhart GA, Haag M, *et al.* Influence of dietary fermentable fiber on nitrogen excretion in dog with chronic renal insufficiency. En: Reinhart GA, Carey DP, Eds. *Recent advances in canine and feline nutrition. Iams Nutrition Symposium Proceedings.* Ohio, EE. UU.: Orange Frazer Press; 1998.

- Charteris WP, Kellyb PM, Morelli L, Collins JK. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int J Food Microbiol.* 1997; 35:1-27.
- Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:S1052-S1077.
- Cosio KE. Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* sobre la concentración sanguínea de urea, amoníaco y la generación de especies reactivas de nitrógeno en perros adultos en mantenimiento (tesis de Maestría). México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br J Nutr.* 1999; 81:S1-7.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, *et al.* *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73:S386-392.
- FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO/WHO, London; ON. 2002.
- Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2007; 8:44-61.
- Flickinger EA, Van Loo J, Fahey GC Jr. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43:19-60.
- Floch MH, Walker WA, Guandalini S, *et al.* Recommendations for probiotic use. *J Clin Gastroenterol.* 2008; 42:S104-108.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989; 66:365-78.

- Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol.* 2007; 115:1-11.
- Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004; 17:259-75.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotic. *J Nutr.* 1995; 195:1401-1412.
- Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, *et al.* Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Foods.* 2010; 7:1-19.
- Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23:1077-1086.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica.* 12ª ed. España: Elsevier. 2011. pp. 834-835.
- Hall EJ, German AJ. Enfermedades del intestino delgado. En: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria.* 6ª ed. España: Elsevier. 2007. p.1370.
- Howard MD, Kerley MS, Mann FA, *et al.* Dietary fiber sources alter colonic blood flow and epithelial cell proliferation of dog. *J Anim Sci.* 1997; 75:170.
- Howard MD, Kerley MS, Sunvold GD, Reinhart GA. Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations. *Nutr Res.* 2000; 20:1473-1484.
- Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, *et al.* Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. *J am Vet Med Assoc.* 2002; 220:1163-1170.

- Jenkins DJ, Kendall CW, Vuksan V. Inulin, oligofructose and intestinal function. *J Nutr.* 1999; 129:S1431-1433.
- Jones PJ. Functional foods: more than just nutrition. *CMAJ.* 2002; 166:1555-1563.
- Konstantinides FN. Nitrogen balance studies in clinical nutrition. *Nutr Clin Pract.* 1992; 7:231-238.
- Lan-szu C, Bart W. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci.* 1999; 82:23-31.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol.* 2005; 98:1303-1315.
- Lee WJ, Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat Chem Biol.* 2014; 10:416-424.
- Leibetseder JL, Neufeld KW. Effects of medium protein diets in dogs with chronic renal failure. *J Nutr.* 1991; 121:S145-149.
- Levrat M-A, Rémés C, y Demigné C. Influence of inulin on urea and ammonia nitrogen fluxes in the rat *cecum*: consequences on nitrogen excretion. *J Nutr Biochem.* 1993; 4:351-356.
- Limdi J, O'Neill C, McLaughlin J. Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? *World J Gastroenterol.* 2006; 12:5447-5457.
- Manning TS, Gibson GR. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004; 18:287-298.
- Middelbos IS, Vester Boler BM, Qu A, White BA, Swanson KS, Fahey GC. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS One.* 2010; 5 e9768. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>.

- Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr Polym.* 2007; 68:587-597.
- Park J, Floch MH. Prebiotics, Probiotics, and Dietary Fiber in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol Clin N Am.* 2007; 36:47-63.
- Pérez H. Evaluación del efecto de la inulina en la disminución de analitos nitrogenados séricos en carnívoros domésticos. (tesis de Maestría). México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014.
- Pérez-Leonard H. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar.* 2006; 40:20-28.
- Polzin DJ, Osborne CA, Stevens JB, *et al.* Influence of modified protein diets on the nutritional status of dogs with induced chronic renal failure. *Am J Vet Res.* 1983; 44:1694-1702.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 2010; 104:S1-63.
- Ruemmele FM, Bier D, Marteau P, Rechkemmer G, Bourdet-Sicard R, Walker WA, Goulet O. Clinical evidence for immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 48:126-141
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? *Trend Food Sci Technol.* 1999; 10:107-110.
- Sanders ME. Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria. *Int Dairy J.* 1998; 8:341-347.
- Sarowska J, Choroszy-Król I, Regulska-Illow B, Frej-Madrzak M, Jama-Kmiecik A. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Adv Clin Exp Med.* 2013; 22:759-766.

- Sauter S, Benyacoub J, Allenspach K, *et al.* Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhea treated with an elimination diet. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2006; 90:269-277.
- Sekhon BS, Jairath S. Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *J Pharm Educ Res.* 2010; 1:13-36.
- Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54:401-406.
- Sloan E. The top 10 trends to watch and work on. *Food Technol.* 1996; 50:55-71.
- Thatcher CD, Hand MS, Remillard RL. Nutrición clínica en pequeños animales: un proceso repetitivo. En: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, Eds. *Nutrición Clínica en Pequeños Animales. (Small Animal Clinical Nutrition)* 4ª ed. Colombia: Panamericana, 2000:1-22.
- Titens I, Livesey G, Eggum BO. Effect of the type and level of dietary supplements on nitrogen retention and excretion patterns. *Brit J Nut.* 1996; 75:461-469.
- Tomasik PJ, Tomasik P. Probiotics and prebiotics. *Cereal Chem.* 2003; 80:113-117.
- Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009; 21:794-800.
- Valenzuela A, Valenzuela R, Sanhueza J, Morales G. Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Rev Chil Nutr.* 2014; 41(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000200011>
- Vanderhoof JA, Young RJ. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998; 27:323-332.

- Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis. 2008; 46:S87-91. <http://dx.doi.org/10.1086/523335> discussion S144e51.
- Webster CRL. Anamnesis, signos clínicos y hallazgos físicos en las enfermedades hepatobiliares. En: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 6ª ed. España: Elsevier; 2007. p.1427.
- Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH. Diagnóstico clinicopatológico práctico en los pequeños animales. 3ª ed. Buenos Aires, República Argentina: Inter-Médica. 2001.
- Younes H, Demigné C, Behr SR, Garieb KA, Rémésy C. A blend of dietary fibers increases urea disposal in the large intestine and lowers urinary nitrogen excretion in rats fed a low protein diet. J Nutr Biochem. 1996; 7:474-480.
- Younes H, Rémésy C, Behr S, Demigné C. Fermentable carbohydrate exerts a urea-lowering effect in normal and nephrectomized rats. Am J Physiol. 1997; 272:G515-521.
- Younes H, Garleb K, Behr S, Rémésy C, Demigné C. Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. J Nutr. 1995; 125:1010-6.
- Zeisel S. Regulation of "nutraceuticals". Science. 1999; 285:1853-1855.
- Zentek J, Marquart B, Pietrzak T, Balleve O, Rochat F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2003; 87:397-407.