



---

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
FARMACOBIOLOGICAS

TÍTULO:

**“Evaluación del efecto *sinbiótico* de la cepa  
*Saccharomyces boulardii* con fructanos de *Agave salmiana*  
en la microbiota intestinal”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

**QFB. Miguel Ángel Álvarez Zapata**

**Director de tesis**

**Dr. Fidel Martínez Gutiérrez**

Asesores:

**Dra. Ruth Elena Soria Guerra**

**Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003382, nivel en Desarrollo.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **628420**



**ESTE PROYECTO SE REALIZÓ CON APOYO DEL  
FONDO DE APOYO DE INVESTIGACIÓN (FAI) DE LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

Clave del Proyecto: C18-FAI-05-40.40

**REALIZADO EN:**

Laboratorio de Antimicrobianos, Biopelículas y Microbiota de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por sus consejos, su gran ejemplo y por siempre motivar e impulsar mis sueños, y acompañarme en cada nueva aventura.

Al Doctor Fidel Martínez Gutiérrez, por volver a confiar en mis capacidades y abrirme las puertas de su laboratorio, agradezco su tiempo, conocimientos y paciencia, pero, sobre todo su amistad. Mi plena admiración para usted.

A la Doctora Ruth Soria Guerra, quien me recibió como un miembro activo en su laboratorio, dándome las herramientas y compartiendo su conocimiento para concretar la metodología experimental.

A la Doctora Diana Portales Pérez por atender y estar al tanto en el desarrollo de este estudio, además de ser una de las mejores maestras en mi formación profesional.

A mis asesores clínicos el Dr. Abel Salazar Martínez y la Dra. Claudia Leija Cuevas por su ayuda en el reclutamiento y compartir de sus conocimientos en trato a los pacientes.

A la Dra. Bertha Irene Juárez Flores del Instituto de Zonas Desérticas de la UASLP, especialmente al Dr. Cesar Godínez Hernández por ayudarme, compartir sus experiencias y conocimiento en la recolección y procesamiento del Agave.

Al Dr. Mariano García Soto, por aportar con sus conocimientos las herramientas necesarias para el diseño y desarrollo de las pruebas in vitro, además agradecer a la estudiante Andrea Gonzales, estudiante de proyecto profesional, por la realización de las pruebas in vitro, y hacer amenas las jornadas en el laboratorio.

A Biocodex ® México por la aportación del probiótico *Saccharomyces boulardii* CNCM I- 745.

A mis compañeros del Laboratorio de Antimicrobianos Biopelículas y Microbiota a Monserrat López, Selene Velázquez, Ceci Villanueva, por los buenos momentos, grandes experiencias, pero sobre todo el conocimiento compartido y hacer siempre agradables los días en el laboratorio.

A mis compañeros de Laboratorio de Biotecnología de plantas, Marcos, Dánae, Damaris y Julieta, por orientarme en el uso de las instalaciones de su laboratorio.

A mis amigos Andrés Banda, Jorge Ángeles, Viridiana Hernández, Dinora Alvarado.

A mi Hermana Diana Álvarez por siempre escucharme y compartir de mis mejores y peores momentos. A mi familia por siempre estar y ser un pilar importante que, sin sus buenos deseos, momentos felices y su gran cariño, nunca hubiera llegado hasta aquí.

A Perla Silva, con quién tuve la dicha de coincidir en este camino, convirtiéndose ella, en uno de los pilares fundamentales en mi vida, gracias por tanto.

Finalmente, a la sociedad mexicana, quién con sus impuestos sustentó mis estudios de Maestría.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Los probióticos como *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 son usados para disminuir la diarrea asociada a antibióticos. Los fructanos obtenidos de *Agave salmiana* (As), son polímeros de fructosa, caracterizados por presentar enlaces tipo Inulina ( $\beta$  1-2) y tipo levano ( $\beta$  2-6), ideales para el aprovechamiento de las bacterias benéficas de la microbiota intestinal. No existe evidencia que demuestre los beneficios de la mezcla *sinbiótica* entre *S. boulardii* y los fructanos de As.

**OBJETIVO:** Evaluar los cambios en la composición de la microbiota intestinal, la respuesta inmune adquirida, así como la frecuencia de diarrea asociada al uso de amoxicilina/clavulato en pacientes Potosinos con infección de vías respiratorias altas (IVRA) comparado con un grupo control saludable.

**METODOLOGÍA:** Se realizó la extracción y pruebas de inocuidad al polvo de fructanos extraído del núcleo del As siguiendo la normativa vigente. Se realizaron estudios *in vitro* en condiciones anaeróbicas con diferentes concentraciones del *sinbiótico*, evaluando la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por HPLC. Para el estudio del *sinbiótico* en pacientes el protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Estatal de Ética en Investigación, (**SLP/O11-2018**). La población de estudio fueron 15 niños de entre 2 y 10 años, divididos en tres grupos de según su estado de salud; cada grupo se integró por 5 miembros. Grupo 1: niños con IVRA tratados con amoxicilina-clavulanato. Grupo 2: niños con IVRA tratados con amoxicilina-clavulanato y formulación *sinbiótica*. Grupo 3: niños sanos que recibieron la formulación *sinbiótica*. Cada tratamiento se administró una vez al día durante 7 días. Se recolectó y analizó muestras de heces los días 0 (inicio de la intervención) y día 7 (término del tratamiento). A dichas muestras se les midió el pH, se evaluaron los cambios en la concentración de *S. boulardii*, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp y *Clostridium* spp por PCR en tiempo real, se determinó la concentración de Inmunoglobulina A soluble (sIgA) mediante ELISA, finalmente se aplicó una prueba de Kruskal Wallis, para analizar los cambios entre grupos utilizando el programa SPSS v23.0 ( $p < 0.05$ ).

**RESULTADOS:** Los estudios *in vitro* revelaron que el *sinbiótico* fue inocuo para consumo humano, presentando límites permisibles según la normativa, la concentración de los componentes del *sinbiótico* con un mejor crecimiento, así como, se evidenció la producción de AGCC. Derivado de la intervención en niños, se encontró que el *sinbiótico* fue bien tolerado, se observó una disminución en el pH de la muestra, predominio del género *Lactobacillus* y un aumento en la concentración de sIgA, al comparar la concentración antes y después de la administración del *sinbiótico*, en niños sanos y niños que recibieron además un tratamiento antibiótico, lo que posiblemente contribuyó a la evolución favorable de los pacientes. Sin embargo, no se observó diferencias significativas atribuibles al efecto entre grupos por el número reducido de pacientes incluidos en el estudio.

Palabras clave: probióticos, prebióticos, *sinbióticos*, amoxicilina - clavulanato, microbiota intestinal, niños.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** Probiotics such as *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 are used to reduce antibiotic-associated diarrhea. Fructans obtained from *Agave salmiana* (As) are fructose polymers, characterized by presenting Inulin ( $\beta$  1-2) and levano ( $\beta$  2-6) type bonds, ideal for the use of beneficial bacteria of the intestinal microbiota. There is no evidence to show the benefits of the symbiotic mixture between *S. boulardii* and As fructans.

**OBJECTIVE:** To evaluate the changes in the composition of the intestinal microbiota, the acquired immune response, as well as the frequency of diarrhea associated with the use of amoxicillin / clavulanate in Potosinos children with upper respiratory tract infection (URTI) compared with a healthy control group.

**METHODOLOGY:** The extraction and safety tests of the fructans powder extracted from the As nucleus were carried out following the current regulations. In vitro studies were performed under anaerobic conditions with different concentrations of the symbiotic, evaluating the production of short chain fatty acids (SCFA) by HPLC. For the study of the symbiotic in patients, the protocol was evaluated and approved by the State Committee of Research Ethics, (SLP / O11-2018). The study population was 15 children between 2 and 10 years, divided into three groups according to their state of health; Each group was integrated by 5 members. Group 1: children with URTI treated with amoxicillin-clavulanate. Group 2: children with URTI treated with amoxicillin-clavulanate and symbiotic formulation. Group 3: healthy children who received the symbiotic formulation. Each treatment was administered once a day for 7 days. Stool samples were collected and analyzed on days 0 (start of the intervention) and day 7 (end of treatment). These samples were measured pH, changes in the concentration of *S. boulardii*, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp and *Clostridium* spp by real-time PCR, the concentration of soluble Immunoglobulin A (sIgA) was determined by ELISA, finally a Kruskal Wallis test was applied to analyze the changes between groups using the SPSS v23.0 program ( $p < 0.05$ ).

**RESULTS:** *In vitro* studies revealed that the symbiotic was safe for human consumption, presenting permissible limits according to the regulations, the concentration of the symbiotic components with better growth, as well as the production of SCFA. Derived from the intervention in children, it was found that the symbiotic was well tolerated, a decrease in the pH of the sample, prevalence of the genus *Lactobacillus* and an increase in the concentration of sIgA was observed, when comparing the concentration before and after administration of the symbiotic, in healthy children and children who also received an antibiotic treatment, which possibly contributed to the favorable evolution of the patients. However, no significant differences attributable to the effect between groups were observed due to the small number of patients included in the study.

Key words: Probiotics, prebiotics, synbiotic, amoxicillin – clavulanate, gut microbiota, children.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Microbiota intestinal.</b> .....	1
<b>1.2 Desarrollo de la microbiota durante los primeros años de vida.</b> .....	2
<b>1.3 La microbiota intestinal en la salud.</b> .....	2
<b>1.4 Relación de la microbiota intestinal y el hospedero.</b> .....	2
<b>1.5 Generalidades sobre los probióticos.</b> .....	3
<b>1.6 Prebióticos</b> .....	4
<b>1.6.1 Fructanos y su relación biológica como prebióticos.</b> .....	4
<b>1.6.2 <i>Agave salmiana Otto Salm-Dick.</i></b> .....	5
<b>1.7 Uso de antibióticos y el desarrollo de la microbiota.</b> .....	5
<b>1.8 Uso de <i>Saccharomyces boulardii CNCM I-745</i> como probiótico.</b> .....	6
<b>1.9 Efecto benéfico de los <i>sinbióticos</i>.</b> .....	7
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	9
<b>3. OBJETIVO</b> .....	10
<b>3.1 Objetivos específicos:</b> .....	10
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	11
<b>5.1 Aspectos éticos.</b> .....	11
<b>5.2 Diseño del estudio.</b> .....	11
<b>5.3 Definición del estatus de la enfermedad.</b> .....	11
<b>5.4 Población de estudio y tiempo del proyecto.</b> .....	12
<b>5.5 Criterios de selección:</b> .....	12
<b>5.5.1 Criterios de inclusión</b> .....	12
<b>5.5.2 Criterios de no inclusión</b> .....	12

5.5.3 Criterios de eliminación .....	12
5.6 Asignación del grupo de estudio.....	13
5.7 Definición de la formulación <i>sinbiótica</i> .....	14
5.8 Tipo y manejo de la muestra.....	14
5.9 Obtención del asentimiento y consentimiento informado.....	14
5.10 Extracción, purificación y pruebas de inocuidad a fructanos de <i>Agave salmiana</i> .....	15
5.10.1 Selección del <i>Agave salmiana</i> .....	15
5.10.2 Extracción de fructanos de <i>Agave salmiana</i> .....	15
5.10.3 Pruebas de inocuidad.....	16
5.11 Evaluación del efecto <i>sinbiótico</i> de <i>Agave salmiana</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 a diferentes concentraciones en un modelo <i>in vitro</i> . .....	17
5.11.1 Efecto <i>sinbiótico</i> de <i>Agave salmiana</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 en un biorreactor anóxico. ....	17
5.11.2 Caracterización de la cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I – 745 con diferentes carbohidratos. ....	18
5.11.3 Evaluación de los metabolitos producidos por <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 con diferentes fuentes de carbohidratos mediante HPLC. ....	18
5.12 Evaluación del efecto del <i>sinbiótico</i> en pacientes mediante la medición de pH y grasa en heces.....	19
5.13 Evaluación de los cambios en la microbiota intestinal a partir de una muestra de heces. ....	19
6. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN .....	21
6.1 Análisis estadístico. ....	21
6.2 Tipo de muestreo y tamaño de la población.....	21

<b>7. RESULTADOS</b> .....	22
<b>7.1 Extracción de fructanos de <i>Agave salmiana</i></b> .....	22
<b>7.1.2 Inocuidad de los fructanos de <i>Agave salmiana</i></b> .....	22
<b>7.2 Evaluación del efecto sinbiótico a diferentes concentraciones en un biorreactor anóxico.</b> .....	24
<b>7.2.1 Evaluación de los componentes del medio después de la incubación de <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 y diferentes carbohidratos mediante HPLC.</b> .....	27
<b>7.3 Efecto del <i>sinbiótico</i> en pacientes</b> .....	30
<b>7.3.1 Evaluación del pH y grasa en heces</b> .....	31
<b>7.3.2 Cuantificación de las especies microbianas de la microbiota</b> .....	32
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>8.1 Extracción de fructanos de <i>Agave salmiana</i></b> .....	35
<b>8.1.2 Inocuidad de los fructanos de <i>Agave salmiana</i></b> .....	35
<b>8.2 Evaluación del efecto <i>sinbiótico</i> de <i>Agave salmiana</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I- 745 a diferentes concentraciones en un biorreactor anóxico.</b> .....	35
<b>8.2.1 Evaluación de los componentes del medio después de la incubación de <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 y diferentes carbohidratos mediante HPLC.</b> .....	36
<b>8.3 Efecto del <i>sinbiótico</i> en pacientes</b> .....	36
<b>8.3.1 pH y grasa en heces</b> .....	37
<b>8.3.2 Cuantificación de las especies microbianas de la microbiota</b> .....	38
<b>8.3.3 Caracterización del efecto inmunológico</b> .....	39
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	41
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	42
<b>10. ANEXO 1. Carta de aprobación por el CEID de la FCQ</b> .....	51

<b>10.1 ANEXO 2. Carta de aprobación por el Comité Estatal de Ética en Investigación en salud de San Luis Potosí. ....</b>	<b>52</b>
<b>10.3 ANEXO 4. Asentimiento informado.....</b>	<b>54</b>
<b>10.4 ANEXO 5. Modelo de Biorreactor anóxico utilizado. ....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los grupos de estudio .....	13
Figura 2. Crecimiento de <i>S. boulardii</i> con diferentes carbohidratos .....	25
Figura 3. Comparación de parámetros de crecimiento de <i>S. boulardii</i> con diferentes carbohidratos .....	26
Figura 4. pH a diferentes tiempos de incubación .....	27
Figura 5. Cromatograma que muestras los principales picos de interés .....	28
Figura 6.- Metabolitos identificados después de 30h de incubación .....	29
Figura 7.- pH de la muestra por grupo de estudio y tiempo de intervención .....	31
Figura 8. Cuantificación relativa de géneros bacterianos de interés .....	32
Figura 9.- Concentración de sIgA de muestras representativas de cada grupo.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas de inocuidad aplicada a Fructanos de <i>Agave</i> .....	17
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación relativa de las especies de la microbiota intestinal .....	20
Tabla 3 A. Pruebas de inocuidad de fructanos .....	23
Tabla 3 B. Resultados de las pruebas de inocuidad de fructanos .....	24
Tabla 4. Carbohidratos utilizados para la cinética de crecimiento .....	24
Tabla 5. Tiempos de retención y coeficiente de determinación de las moléculas de interés .....	38
Tabla 6. Datos generales de los pacientes en estudio .....	30

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Microbiota intestinal.

La microbiota es un conjunto de microorganismos y virus que se encuentra en ciertos sitios anatómicos del cuerpo humano, en donde participa en funciones específicas para mantener el estado de salud. Para su estudio se ha dividido en: microbiota oral, microbiota de la piel, microbiota del tracto genital y microbiota del tracto gastrointestinal. La microbiota intestinal humana está constituida por una gran cantidad de microorganismos que interactúan en un microambiente dinámico, y en un estado simbiótico con las células del epitelio del tracto gastrointestinal (TG). El número de microorganismos estará determinado según la sección del TG siendo el intestino delgado y el intestino grueso donde se encuentra la mayor cantidad y diversidad de microorganismos con cifras de  $10^8$  a  $10^{12}$  bacterias/gramo donde aproximadamente 500 especies estarán presentes, superando 10 veces el número de células en el organismo y 100 veces la diversidad genética (1, 2). Debido a la gran cantidad y variabilidad microbiana, es un hecho que la microbiota tiene un papel fundamental en el metabolismo, fisiología, inmunomodulación y nutrición del hospedero (3).

La microbiota intestinal es adquirida desde el nacimiento siendo un factor determinante la vía de parto (4), incluso diversos autores señalan que se adquiere previamente al nacimiento debido a la presencia de bacterias en la placenta, hipótesis que ha sido controversial y es motivo de investigaciones actuales (5). El establecimiento de la microbiota es fuertemente influido durante los primeros 5 años de vida, bajo la influencia de diversos factores como la alimentación con leche materna durante los primeros meses de vida, el consumo de antibióticos y la incorporación de la alimentación sólida. A lo largo de la vida, la composición microbiana presenta cambios tanto en diversidad como en número, con varios cientos de especies, dentro de los cuales los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* son los más abundantes (6). Alcanzando su mayor complejidad en el adulto. Cada individuo alcanzará un nivel de homeostasis, el cual permanecerá relativamente estable durante su vida en condiciones de salud.

## **1.2 Desarrollo de la microbiota durante los primeros años de vida.**

El establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal después del nacimiento, estará determinada por la influencia de la madre en cuanto a los cuidados y manejo del bebé (7). Los principales cambios pueden observarse días después al nacimiento, mientras que durante los siguientes dos años de vida estos cambios serán en menor proporción (8), alcanzando un equilibrio en poblaciones microbianas después de los cinco años (9).

A medida del desarrollo del infante, el TG presenta fluctuaciones fisiológicas. Algunos de los cambios que se observan son la cantidad de moco producido, la velocidad a la que la mucina está glicosilada, las variaciones en la producción de péptidos antimicrobianos (10) y fluctuaciones en los niveles hormonales (11) dichos factores tendrán un impacto directo en la instalación de la microbiota y los múltiples beneficios.

## **1.3 La microbiota intestinal en la salud.**

Conociendo la complejidad de la microbiota intestinal, así como su considerable número en relación con las células del organismo, se puede sospechar que exista una estrecha relación en cuanto a la estabilidad de la microbiota y el estado de salud del hospedero. Los millones de microorganismos que colonizan el tracto gastro intestinal generan metabolitos que contribuyen al adecuado mantenimiento del ecosistema, el cual se encuentra en constante competencia contra patógenos, además, la producción de algunas sustancias debido a la fermentación selectiva de algunos componentes de la dieta favorecen la asimilación de nutrientes, la modulación de la respuesta inmune, así como la estimulación de receptores específicos en diferentes partes del cuerpo, entre ellas del estómago, tejido graso, hígado, pulmón y cerebro. Dicha actividad promueve la salud del hospedero y previene de algunas enfermedades (12).

## **1.4 Relación de la microbiota intestinal y el hospedero.**

La microbiota normal es parte de la estructura anatómica y fisiológica del intestino, aumentando la superficie de absorción, promoviendo la renovación de las células del epitelio. Incluso se ha postulado que la relación entre el hospedero y el

microorganismo va más allá, de tal forma que modula la expresión de genes relacionados con diversas funciones intestinales (13). Para el establecimiento de la microbiota normal, la alimentación juega un papel clave pues ésta determinará la cantidad y calidad de sustratos asimilables por los microorganismos buenos. La relación entre los hábitos dietéticos y el establecimiento de la microbiota aún no está del todo definida, sin embargo diversos estudios señalan que los hábitos dietéticos parecen afectar el desarrollo y establecimiento de la microbiota (14). Aunque no se encontró una relación ambiental o genética que explique la diversidad microbiana agrupada en diferentes enterotipos (14), se encontró que estos estaban fuertemente asociados con las dietas a largo plazo con alto contenido proteico, relacionado con el enterotipo caracterizado por *Bacteroidetes*, mientras que una dieta rica en carbohidratos, se relacionó directamente con el enterotipo *Prevotella* (15). *Akkermansia muciniphila*, representa el único miembro intestinal del filo *Verrucomicrobia*, la mayoría de las proteínas producidas por estas bacterias están involucradas en el transporte y metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos. (16). El entendimiento del mecanismo de interacción entre un grupo específico de microorganismos con el estado de salud es actualmente motivo de interés científico, dada la posibilidad de que sea útil como marcador de salud en diferentes patologías, tales como el sobrepeso, obesidad, enfermedades inflamatorias sistémicas, así como a nivel del sistema nervioso central.

### **1.5 Generalidades sobre los probióticos.**

Al hablar del término probiótico se hace referencia a los microorganismos vivos que cuando se administran a concentraciones necesarias, confieren un beneficio para la salud del huésped (17). Si un alimento cuenta con la concentración similar a  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias por porción, puede ser considerado como probiótico (18). Dentro de los mecanismos generales por los cuales los probióticos brindan beneficios al ser humano, se encuentran: aumentar la resistencia a la colonización de géneros patógenos, estabilizar la microbiota intestinal alterada, aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta, regular el tránsito intestinal y aumentar el cambio de los enterocitos (19). Dado los beneficios de los probióticos, los cuales se ven potenciados al mezclar un prebiótico y un probiótico,

dicha combinación recibe el nombre de *sinbiótico*. Los prebióticos, son definidos como compuesto de naturaleza polisacárido u oligosacárido, no digerible por enzimas humanas, que aportan los nutrientes fundamentales para el metabolismo y desarrollo de la microbiota residente. Esta acción sinérgica de potencialización ha llevado a las investigaciones actuales a evaluar nuevas combinaciones de probióticos con prebióticos, donde la cepa probiótica de *Saccharomyces boulardii* puede presentar características interesantes para su aplicación en casos particulares, tales como la alteración de la microbiota intestinal (disbiosis) ocasionada por el uso de antibacterianos, siendo este probiótico una levadura con características estructurales diferentes a las bacterias, resulta buena alternativa.

## **1.6 Prebióticos**

### **1.6.1 Fructanos y su relación biológica como prebióticos.**

El término prebiótico apareció por primera vez en el año de 1995 y se definen como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y /o actividad de un número limitado de microorganismos en el tracto gastrointestinal, mejorando así la condición del huésped (20). Se ha demostrado que la ingesta de estos compuestos favorece la resistencia de los probióticos ante condiciones gastrointestinales, promoviendo la capacidad de adhesión, esto enriquece su capacidad para prevenir la colonización de patógenos y promueve la salud gastrointestinal (21).

Los fructanos se encuentran en aproximadamente el 15% de las plantas que florecen. Son polímeros de fructosa unidos por medio de enlaces fructuosilos y generalmente tienen un resto de glucosa terminal, su grado de polimerización máximo varía dependiendo del género y especie de la planta de la que se extraen, época del año y zona de cultivo (22). Con respecto a su estructura, se pueden distinguir diferentes tipos: inulina (enlace  $\beta$ 2-1), levano (enlaces  $\beta$ 2-6), graminados (enlaces  $\beta$ 2-1 y  $\beta$ 2-6), neo-inulina y neo-levano (fructanos que poseen un residuo interno de glucosa) (23).

Existen diferentes fuentes de fructanos, algunas de plantas endémicas de ciertas regiones, lo cual sería interesante explorar sus características como prebióticos. En

el caso de México, el género *Agave*, cuenta con alrededor de 211 especies de las cuales el 75 % se encuentran en el bajío, región a la que pertenece el Estado de San Luis Potosí (24). Sin embargo, poco es el conocimiento sobre si otras cepas probióticas no bacterianas, tal es el caso de *Saccharomyces boulardii*, pueden asimilar prebióticos locales como *Agave salmiana*.

### **1.6.2 *Agave salmiana* Otto Salm-Dick.**

Las especies del género *Agave* contienen grandes cantidades de fructanos, además de ser abundante en la región altiplano del estado de San Luis Potosí: *A. salmiana*, el maguey mezcalero potosino (25). Dentro de las distintas especies del género *Agave* es posible encontrar monocárpicas y policárpicas. *A. salmiana* es una especie monocárpica, es decir, cuando alcanza su estado de madurez, fenece. La característica de ser una planta monocárpica sustenta su explotación con la finalidad de evitar que este valioso material vegetal, con todos los beneficios que proporciona se desaproveche, además su alta capacidad reproductiva nos lleva a deducir que no existe amenaza de extinción o agotamiento para la especie, siempre y cuando se procure aplicar un manejo adecuado del recurso, permitiendo su desarrollo y procurando su integridad (26).

### **1.7 Uso de antibióticos y el desarrollo de la microbiota.**

Uno de los principales factores para el desarrollo y establecimiento de la microbiota del tracto gastrointestinal es el uso de antibióticos, si bien existen antibióticos que alteran en forma parcial la microbiota, otros tienen una marcada influencia en la riqueza, diversidad y prevalencia dentro de las principales especies bacterianas (27). Dicha alteración de la microbiota se ha identificado como el principal factor para la presencia de diarrea asociada a antibióticos (DAA) (28). El impacto de dicho desequilibrio estará determinado por la dosis, el tipo de antibiótico, así como a la duración del tratamiento, además de considerar la capacidad de los microorganismos de la microbiota para resistir la colonización (29), tal es el caso de *Terococcus*, *Blautia*, *Faecalibacterium* y *Akkermansia*, los cuales poseen mejores mecanismos de supervivencia y una mayor capacidad para recolonizar (30).

El uso de los antibióticos se presenta con mayor frecuencia en el tratamiento de las infecciones agudas de vías respiratorias (31), la otitis media, sinusitis aguda y la faringitis estreptocócica del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), representan a la mayoría de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio agudas (32). La prescripción para el tratamiento de dichas infecciones resulta en aproximadamente la mitad de las prescripciones para niños (33). Además de alterar el equilibrio en la microbiota intestinal, el uso de antibióticos de amplio espectro puede provocar la resistencia a los mismos (34).

La elección sobre el antibiótico a utilizar para el tratamiento de dichas infecciones es inconsistente, es por eso por lo que la academia Estadounidense de Pediatría recomienda la penicilina o amoxicilina siendo estos de bajo espectro, como terapia de primera línea (35), sin embargo, diversos estudios sugieren como apropiado el uso de amoxicilina-clavulanato el cual es un antibiótico de amplio espectro, para el tratamiento de las principales infecciones agudas del tracto respiratorio (36).

### **1.8 Uso de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 como probiótico.**

*Saccharomyces boulardii* es una levadura no patogénica que ha sido descrita desde hace más de treinta años (37). Diversos mecanismos de acción han sido identificados, así como su capacidad para contener microorganismos patógenos, además de regular la microbiota intestinal, una respuesta local y sistémica de la respuesta inmune, aunado a la promoción de una buena función de las barreras gastrointestinales produciendo enzimas proteolíticas que protegen del ataque por parte de patógenos. Diversos autores han descrito estas propiedades, incluyendo a) la capacidad de llegar íntegro a su órgano diana (el colon): se ha encontrado que las dosis orales generalmente se encuentran en niveles superiores a  $10^8$  organismos / gramo de heces) (38); b) la capacidad de sobrevivir a la temperatura corporal (37 °C): siendo una de las pocas levaduras que mejor se desempeña a la temperatura del cuerpo humano, además de que el liofilizado de *S. boulardii* sobrevive a los ácidos gástricos, proteólisis y naturalmente son resistentes a los antibióticos al presentar una distinta composición de su pared celular (39).

### **1.9 Efecto benéfico de los *sinbióticos*.**

La definición de lo que actualmente se conoce como prebiótico, fue inicialmente propuesta por Gibson y Roberfroid en 1995 (40). Desde entonces se sospechó sobre algún beneficio adicional si se combinaba los prebióticos con los probióticos, a dicha combinación se le denominó *sinbiótico*, tecnicismo derivado de la palabra en inglés *synbiotic* (41). El objetivo de las mezclas *sinbióticas* es el de superar algunas de las dificultades en el crecimiento y supervivencia del probiótico, al brindar una fuente de sustrato aprovechable. Algunas de las evidencias que justifican el uso de un *sinbiótico* son: mejora la integridad de cepas probióticas al paso del tracto gastrointestinal superior, una eficiente colonización, así como un efecto estimulante del crecimiento tanto de probióticos, como de bacterias residentes, mismas que contribuirán a mantener un equilibrio en la microbiota intestinal y buena salud al hospedero (42). Los géneros tales como: *Lactobacillus* spp, *Bifidobacteria* spp., *S. boulardii*, *B. coagulans*, entre otras, son algunas de las cepas que comúnmente son utilizadas en formulaciones *sinbióticas*, mientras que las sustancias no digeribles como los fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) e inulina son los prebióticos de fuentes naturales que más se utilizan (43). La evidencia del uso de *S. boulardii* en formulaciones *sinbióticas* es escasa, sin embargo, algunos estudios como el de Elmer y colaboradores en 1999 (44), demuestran que algunos tipos de fibra como el Plántago *psyllium* y el policarbofilo aumentaron los niveles de *S. boulardii* en comparación con las ratas alimentadas con una dieta libre de fibra, y proponen varias hipótesis para explicar dicho hallazgo. Una de ellas es que la fibra disminuyó el tiempo de tránsito intestinal de modo que *S. boulardii* estuvo expuesto en un menor periodo de tiempo a algún tipo de degradación. La siguiente sugiere que el uso de fibra disminuyó el componente anaeróbico de la microbiota intestinal, mismo que está implicado en la pérdida de viabilidad de *S. boulardii* (45).

Como podemos observar, la evidencia de una formulación *sinbiótica* que incluya *S. boulardii* y algún tipo de fibra que estimule selectivamente su crecimiento, es escasa. Por lo cual se sugiere que si bien el uso de un prebiótico no favorecerá directamente a la levadura, dicho beneficio se confiera a la microbiota residente y le

ayude a restablecerse después del uso de un antibiótico de amplio espectro o bien tenga afecto directamente en el organismo como la modulación del metabolismo de triacilglicéridos, aumento de la concentración de ácidos grasos de cadena corta como el acetato y propionato, reducción del colesterol sérico total (46), aumento de la densidad mineral ósea, reducción de enfermedades asociadas con la resistencia a la insulina (47), y por último disminuir el riesgo de cáncer de colon (48).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El uso de antibióticos modifica la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal, trayendo consigo importantes modificaciones en la fisiología intestinal del individuo, ocasionando problemas diarreicos, alteración de la respuesta inmune adaptativa, entre otros. Dicho fenómeno se observa de forma evidente tras el uso de antibióticos de amplio espectro, tal es el caso del Amoxicilina- clavulanato. Actualmente el uso de probióticos y prebióticos y su combinación (*sinbiótico*), para el tratamiento y profilaxis de problemas intestinales derivados del uso de antibióticos no es aún claro y no existe evidencia descrita en población mexicana. Conociendo los beneficios comprobados del probiótico *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 y tomando como prebiótico los fructanos del *Agave salmiana*, un producto común en la región noroeste del Estado, de fácil acceso, y seguridad comprobada, se busca el desarrollo de beneficios del *sinbiótico* por dos vertientes; por una parte que el probiótico ayude generando una respuesta inmune de protección, mediante la estimulación y producción de Inmunoglobulina Ig A secretora, y por otro lado que el prebiótico promueva el crecimiento selectivo de las bacterias benéficas de la microbiota intestinal, ayudando en la regulación y restablecimiento de la microbiota normal. De esta forma el paciente en tratamiento con antibiótico estará protegido contra las posibles complicaciones tras la administración de este, además de fortalecer la respuesta inmune.

### 3. OBJETIVO

Evaluar los cambios en la composición de la microbiota intestinal, la respuesta inmune adquirida, así como la frecuencia de diarrea asociada al uso de amoxicilina/clavulanato en pacientes Potosinos con infección de vías respiratorias altas (IVRA) comparado con un grupo control saludable.

#### 3.1 Objetivos específicos:

- Extraer, purificar y realizar pruebas de inocuidad a fructanos de *Agave salmiana*.
- Evaluar *in vitro* el efecto sinbiótico de *Agave salmiana* y *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 a diferentes concentraciones.
- Evaluar los cambios en la concentración de *S. boulardii* en la microbiota intestinal, antes, durante y después de la intervención, a partir de una muestra de heces.
- Evaluar el restablecimiento de la microbiota intestinal realizando la cuantificación de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacteria* spp, *Clostridium* spp, a diferentes tiempos en el periodo de intervención a partir de una muestra de heces.
- Evaluar la estimulación de la respuesta inmune por parte de la formulación *sinbiótica* cuantificando IgA secretora, a partir de una muestra de heces.

### 4. HIPÓTESIS

El consumo del *sinbiótico* compuesto por *S. boulardii* CNCM I-745 y fructanos de *A. salmiana* reduce en un 50 % la incidencia de diarrea asociada al uso de Amoxicilina-clavulanato y participa en el restablecimiento de la microbiota intestinal y la activación de la respuesta inmune adquirida una vez terminada la intervención.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Aspectos éticos.**

El presente trabajo tiene como propósito el análisis de muestras de heces de pacientes pediátricos de entre 2 y 12 años, para la obtención de dichas muestras no se realizó ningún procedimiento de estimulación de la evacuación, por lo cual la toma de muestra se consideró no invasiva. Los individuos incluidos en el estudio tuvieron una alimentación normal de acuerdo con su estilo de vida y en ningún momento se promovió el cambio de la alimentación o se realizó alguna intervención alimentaria (a menos que dicha recomendación sea realizada por el médico tratante) por lo que este estudio se considera una investigación sin riesgos. Cabe hacer mención que este proyecto fue aprobado por el Comité Estatal de Ética en Investigación del Estado de San Luis Potosí con el folio: SLP/O11-2018 (Anexo 1). Así como por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas folio: CEID2018-095 (Anexo 2), lugar donde se desarrolló el procesamiento y análisis de la totalidad de las muestras.

### **5.2 Diseño del estudio.**

En este estudio se buscó encontrar el efecto en la microbiota intestinal después de la administración de un producto *sinbiótico*, se consideró un estudio a pequeña escala el cual pretende sentar las bases para la realización de un estudio clínico controlado. Dicho estudio se considera un estudio piloto donde se realizará un muestreo aleatorizado con el fin de disminuir el sesgo. Tanto las madres como el médico tratante conocieron de antemano los componentes de la formulación *sinbiótica* (*S. boulardii* CNCM I-745 y *Agave salmiana*) ya que previo a la firma del consentimiento y asentimiento informados, se proporcionarán los detalles del estudio.

### **5.3 Definición del estatus de la enfermedad.**

Casos confirmados de infección de vías respiratorias altas, y el inicio de tratamiento con Amoxicilina- ácido clavulánico en la dosis: 40 mg por kg de peso por siete días. La confirmación de la infección bacteriana, así como la prescripción del antibiótico estará indicada por los médicos tratantes. Se contará con el apoyo de los siguientes

consultorios privados: Dr. Abel Salazar Martínez, y la Dra. Claudia Elizabeth Leija Cuevas.

Los médicos participantes realizaron la actividad de seleccionar a la población bajo los criterios de inclusión y no inclusión, además se solicitó la firma de consentimiento informado por los padres y autorización del asentimiento informado por parte del menor.

#### **5.4 Población de estudio y tiempo del proyecto.**

Niños Potosinos de entre 2 y 10 años que acudieron a consulta pediátrica en alguno de los consultorios anteriormente mencionados, en el periodo de septiembre de 2018 a marzo de 2019.

#### **5.5 Criterios de selección:**

##### **5.5.1 Criterios de inclusión**

- Edad entre 2 a 12 años
- Firma del consentimiento informado por parte del padre o tutor.
- Autorización de asentimiento informado por parte del niño.

##### **5.5.2 Criterios de no inclusión**

- Pacientes fuera del rango
- Uso previo de probióticos en el último mes
- Inmunodeficiencias
- Cirugías gastrointestinales
- Malformaciones congénitas
- Parálisis cerebral
- Uso previo de antibióticos en el último mes
- Diarrea

##### **5.5.3 Criterios de eliminación**

- Presencia de efectos adversos atribuibles o no a la intervención
- Falta de apego al tratamiento
- Voluntad propia
- Pérdida de la muestra

## 5.6 Asignación del grupo de estudio.

Se contemplarán 3 grupos de estudio con 5 integrantes cada uno según la intervención, por lo cual nuestra población será de 15 miembros.

**Grupo 1.-** Niños en tratamiento con Amoxicilina/ Ácido clavulánico (**AC**) **n= 5**.

Niños a los cuales el médico tratante indique necesario el uso del antibiótico por el tiempo recomendado.

**Grupo 2.-** Niños en tratamiento con Amoxicilina/Ácido clavulánico y con la formulación sinbiótica (**AC+SIN**) **n=5**.

Niños a los cuales el médico tratante indique que es necesario el uso del antibiótico por el tiempo recomendado y además indique un probiótico, en este caso la formulación sinbiótica, con el propósito de contrarrestar los efectos a la microbiota por el antibiótico.

**Grupo 3.-** Niños que reciben la formulación *sinbiótica*. (**SIN**) **n=5**

Niños que acuden a revisión médica después de ser tratados por algún padecimiento no infeccioso, y que se recomiende el uso del *sinbiótico* para fortalecer la microbiota intestinal.

**Figura 1. Distribución de los grupos de estudio.**



### **5.7 Definición de la formulación *sinbiótica*.**

La formulación *sinbiótica* está integrada por un sobre del producto comercial **FLORATIL** 250 mg, la cual incluye una concentración de  $2.5 \times 10^{10}$  UFC de la cepa *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, además de un sobre con **1 gramo de fructanos de *Agave salmiana***, al cual se realizaron las pruebas de inocuidad según las Normas Mexicanas: NOM 092, NOM 111, NOM 113, NOM 114, de Secretaria de Salud establecidas en 1994.

### **5.8 Tipo y manejo de la muestra.**

Se analizó una muestra de materia fecal no mayor a 5 gramos, de la primera evacuación del día, excepto el día cero donde la muestra fue recolectada a partir de cualquier evacuación a lo largo del día. Cabe mencionar que la muestra se recolectó periódicamente a los días 0 (día de la intervención), y día 7 (final de la intervención) (Figura 1). Se recomendó que fuera la primera evacuación del día, de no ser posible la muestra podía ser tomada en cualquier evacuación a lo largo del día. No se emplearon procedimientos invasivos o de estimulación de la evacuación. Se proporcionaron los recipientes adecuados en un paquete cerrados que contenían tanto el tratamiento *sinbiótico* como lo necesario para la toma de muestra y conservación, además de las instrucciones impresas, cuestionario general sobre la alimentación, y registro de las evacuaciones según la escala de Brixtol. Se contactó vía telefónica con los padres o tutores del niño, y en cuanto la muestra fue recolectada, se procedió a su transporte al laboratorio en un tiempo menor a 2 horas. Cabe señalar que, en su totalidad, las muestras fueron procesadas y analizadas dentro del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, dónde se tomaron alícuotas para los diferentes análisis y se conservaron a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su análisis, el resto de la muestra se desechó al drenaje municipal.

### **5.9 Obtención del asentimiento y consentimiento informado.**

Una vez atendidas las necesidades de la consulta médica, se habló con los padres del niño, dando a conocer los objetivos, riesgos y beneficios de este estudio. En caso de que los padres estuvieran de acuerdo en participar, con un lenguaje adecuado se informó al niño (únicamente mayores de 3 años) sobre el estudio, las

características de este, la muestra que se solicitó, así como la importancia de su participación, dicho esto se le pidió que si estaba de acuerdo señalara la figura que indica si le gustaría o no le gustaría participar en el estudio.

### **5.10 Extracción, purificación y pruebas de inocuidad a fructanos de *Agave salmiana*.**

La alta solubilidad de los fructanos de *Agave salmiana* en agua favoreció la obtención de un extracto natural, para el cual no se utilizaron reacciones químicas para su separación. Es importante señalar que, para evitar una hidrólisis térmica a las diferentes estructuras de los fructanos, se trabajó siempre a temperaturas menores a los 55°C.

#### **5.10.1 Selección del *Agave salmiana***

La recolección de la piña de maguey *A. salmiana* se realizó en el terreno de la fábrica de mezcal Laguna Seca, la cual se encuentra en el municipio de Charcas, San Luis Potosí. La piña de maguey *A. salmiana* tenía un estado de madurez en el que el maguey contenía una concentración máxima de fructanos, lo cual ocurre inmediatamente antes de que la planta emita el escapo floral, tallo que en su momento emerge del centro del maguey, presentando solamente flores en el ápice. Una vez identificadas las características del maguey que cumplieran con nuestro objetivo, se procedió a la recolección y posteriormente se eliminaron las 10 a 20 hojas carnosas de color verde claro que se desprenden del núcleo o cabeza, dicha cabeza se llevó al laboratorio para su procesamiento. Los fructanos de *A. salmiana* se extrajeron del tallo de la piña de esta planta (21) en las instalaciones del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

#### **5.10.2 Extracción de fructanos de *Agave salmiana*.**

Una vez retiradas las bases de las pencas, se extrajo el tallo de la piña y se obtuvo el jugo con extractor (EXS Series 6/18/02, Volt-von, Francia), el residuo sólido o bagazo restante se exprimó en un dispositivo de acero inoxidable diseñado para la extracción de jugos a una presión constante de 14kg.cm<sup>2</sup> y se obtuvo un jugo secundario.

Los jugos se colocaron en recipientes herméticos y se congelaron a  $-15^{\circ}\text{C}$  (Torrey CHTC25, EE, UU) inmediatamente después de su extracción, una vez descongelado, el jugo se centrifugó a 2,000 rpm por 30 min para asegurar la precipitación de oxalatos de calcio.

Se colectó el sobrenadante y se condensó en equipo de impregnación al vacío (J.P. Selecta Gastrovac, Barcelona, España) previamente adaptado a un condensador externo, donde el jugo se evaporó al 40% de su volumen original.

Posteriormente se colocó en moldes de silicón y se dejó secar a  $50^{\circ}\text{C}$  por 24 h en horno de aire forzado (Free Dry System, Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA).

El extracto seco se retiró de los moldes y se obtuvieron escamas, las cuales se molieron, tamizaron y pesaron para finalmente almacenar en desecadores herméticamente cerrados, hasta su uso posterior.

### **5.10.3 Pruebas de inocuidad.**

Se realizaron los ensayos de acuerdo con el siguiente procedimiento establecido por las Normas Oficiales Mexicanas:

- A. Pesar la cantidad correspondiente del polvo de los fructanos, homogenizar en su respectivo volumen de diluyente y preparar diluciones seriadas (10-1, 10-2, 10-3, 10-4). Para *Salmonella* spp. además del pre -enriquecimiento con agua lactosada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h, es necesario enriquecer el medio con caldo tetracionato a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h antes de sembrar en los medios por estría.
- B. Inocular por duplicado, 1 mL de la dilución en cajas estériles mediante pipeta estéril. Agregar de 18 a 20 mL del medio fundido.
- C. Homogenizar, mediante 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio.
- D. Dejar solidificar e incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.
- E. Incubar las cajas en posición invertida a  $37^{\circ}\text{C}$  por el tiempo indicado

F. Realizar el conteo de unidades formadoras de colonia por mililitro al término de la incubación.

**Tabla 1. Pruebas de inocuidad aplicada a fructanos de *Agave***

Prueba	Bacterias aerobias	Hongos y levaduras	Coliformes totales	<i>Salmonella spp.</i>
Muestra	1 g	1 g	1 g	2.5 g
Diluyente	9 mL	9 mL	9 mL	2.25 mL
Diluyente	Agua peptonada	Agua peptonada	Agua peptonada	Agua lactosada
Medio(s) de cultivo	Agar Tripton-Extracto de Levadura	Agar Papa Dextrosa	Agar Bilis Rojo Violeta	XLD, SS, Hektoen, VB, SB
Incubación	24 horas	5 días	24 horas	24 horas
Norma de referencia	NOM-092-SSA1-994	NOM-111-SSA1-994	NOM-113-SSA1-994	NOM-114-SSA1-994

XLD: Agar xilosa-lisina-desoxicolato. SS: Agar *Salmonella-Shigella*. VB: Agar verde brillante SB: Agar sulfito de bismuto.

### 5.11 Evaluación del efecto *sinbiótico* de *Agave salmiana* y *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 a diferentes concentraciones en un modelo *in vitro*.

La evaluación del prebiótico se realizó mediante el uso de un biorreactor anóxico, empleando Agar Sabouraud Dextrosa para el mantenimiento de las cepas y Caldo Sabouraud reducido y nitrogenado (sellados bajo N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>). Utilizando diferentes fuentes de carbono tal es el caso de fructosa al 1 y 2% como control de carbohidrato simple; Inulina comercial, como prebiótico de referencia; fructanos de *Agave salmiana* al 1 y 2% como propuesta de prebiótico.

#### 5.11.1 Efecto *sinbiótico* de *Agave salmiana* y *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 en un biorreactor anóxico.

Se siguió la metodología descrita por Martínez y colaboradores en 2017 (49) agregando el medio en frascos ámbar de 50 mL, inoculados con 1 mL de suspensión de la cepa de 24 h (1.0 ABS a 625 nm con caldo Sabouraud) y sometidos a diferentes concentraciones con *A. salmiana*, fructuosa, inulina y medio reducido sin Dextrosa, realizándolo por triplicado e incubándolos a 37°C.

Se extrajeron 3 alícuotas de 2 mL de cada frasco, remplazando el medio faltante con un desplazador de vidrio cada 6 horas para evaluar la cinética del crecimiento, se usó el espectrofotómetro para medir la absorbancia y se obtuvo el valor del pH

relacionando el valor con la producción de ácidos grasos de cadena corta. Se obtuvo así, la relación entre la concentración idónea para el crecimiento del *S. boulardii* con *A. salmiana* y que puedan considerarse como un *sinbiótico*.

#### **5.11.2 Caracterización de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* CNCM I – 745 con diferentes carbohidratos.**

El modelo de crecimiento poblacional tipo Gompertz se utilizó para caracterizar la cinética de *S. boulardii*, ajustando parámetros biológicos como la densidad óptica en relación con fase de adaptación, tasa de crecimiento y máximo de crecimiento, reflejados en una curva de crecimiento microbiano. Los datos experimentales son ajustados al modelo en mención, resolviendo una ecuación no lineal calculando los parámetros que resulten de una suma de cuadrados residuales al 99% de intervalo de confianza.

#### **5.11.3 Evaluación de los metabolitos producidos por *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 con diferentes fuentes de carbohidratos mediante HPLC.**

Se extrajeron 3 alícuotas de 1 mL de cada frasco de 50 mL según el punto 5.12.1, a diferentes tiempos de incubación, a las 0, 12 y 36 horas. Después se realizó una filtración con una membrana de 0.22 micras y se procedió a la inyección de 45 µL de muestra. Para finalmente analizarla en un cromatógrafo HP- Agilent Technologies series 1100, Alemania. Utilizando como fase estacionaria una columna de intercambio iónico Agilent Hi-Plex H, 7.7 x 300 mm, 8 µm y una fase móvil filtrada con gradiente isocrático de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 M con un flujo de 0.7 mL/min. La temperatura de la columna fue de 60°C y detector de 55°C con un tiempo de operación por muestra de 23 min. Previo a la inyección de la muestra se realizó la curva de calibración para los compuestos de interés, y se utilizaron los tiempos de retención para la identificación de los diferentes componentes. Los estándares utilizados fueron: Ácido láctico, glicerol, ácido acético, ácido propiónico, etanol, butanol.

### **5.12 Evaluación del efecto del *sinbiótico* en pacientes mediante la medición de pH y grasa en heces.**

Una vez colectada la muestra biológica de heces fecales, se procedió a realizar la determinación del pH a partir de una alícuota de aproximadamente 1g de heces, realizando una dilución 1:10 en solución salina según la metodología de Lohner y colaboradores en 2018 (50) y con ayuda de un pH metro Bante 210 Benchtop®. Además, se realizó la determinación de grasa en heces siguiendo la metodología de Drummey y colaboradores en 1961 (51) para la determinación de grasas neutras, en la cual, con un aplicador de madera la muestra se extiende en porta objetos dibujando un círculo de 1cm de diámetro, inmediatamente después de colocan 2 gotas de sudan III, se homogeniza la mezcla, se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio con un aumento de 40X. Se considera una muestra positiva cuando se observan más de 10 gotas de 20 micras de tamaño.

### **5.13 Evaluación de los cambios en la microbiota intestinal a partir de una muestra de heces.**

Las muestras de heces recolectadas antes y después de la intervención (día 0 y día 7 de tratamiento) fueron separadas en pequeñas alícuotas e identificadas en viales de 1.5 mL para su posterior análisis. A partir de una alícuota de 100 mg de heces se realizó una dilución 1:10 en PBS 1%, homogenizando durante 1 min y filtrando inmediatamente después con ayuda de una gasa simple, y de esta forma eliminar la mayor cantidad de materia orgánica no degradada facilitando el manejo de la muestra. Finalmente se procedió a la extracción de ADN a partir del Kit comercial Purelink genomic DNA mini kit invitrogen. El ADN obtenido se cuantificó en el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verificando la pureza del ADN de acuerdo con la relación 260/280 (>1.8). Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para observar la calidad del ADN extraído.

### 5.13.1 Cuantificación de *Saccharomyces boulardii*, antes y después de la intervención, mediante PCR en Tiempo Real.

Para la cuantificación de *S. boulardii* se realizó una PCR en tiempo real en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR Applied Biosystems™. Bajo las siguientes condiciones de reacción: 5 uL de Sybrgreen (2X), 0.5 uL de oligo forward, 0.5 uL de oligo reverse, 1 uL de ADN (100 ng), y 3.5 uL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 95°C por 3 min, 35 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 1 min (disminuyendo a 55°C en el caso de *Clostridium*) y 70°C por 2 min, finalmente 1 ciclo a 70°C por 10 min, utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2, reportados por Khatri y colaboradores en 2013 (52). Finalmente, se realizó una cuantificación relativa, utilizando la ecuación del  $\Delta\Delta CT$ .

### 5.13.2 Cuantificación de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Clostridium* antes y después de la intervención, mediante PCR en Tiempo Real.

Para la cuantificación de las especies de interés en la microbiota se siguió la misma metodología mencionada en el punto 5.13.1 utilizando los oligonucleótidos reportados por Amit y colaboradores en 2004 (53)

**Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación relativa de las especies de la microbiota intestinal.**

Microrganismo (amplicón)	Secuencia
<i>Bifidobacterium spp</i> (510 pb)	Fw: GGGTGGTAATGCCGGATG Rv: CCACCGTTACACCGGGAA
<i>Lactobacillus spp</i> (286 pb)	Fw: CATCCAGTGCAAACCTAAGAG RV: GATCCGCTTGCCTTCGCA
<i>Clostridium spp</i> (722 pb)	Fw: AAAGGAAGATTAATACCGCATAA Rv: ATCTTGCGACCGTACTCCCC
<i>Saccharomyces boulardii</i> (300 pb)	ITS 1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS 4: TCCTCCGCTTATTGATATG

Pb: pares de bases. Fw: oligo sentido. Rv: oligo anti-sentido. ITS: Espacio transcrito interno

### **5.15 Cuantificación de IgA secretora a partir de una muestra de heces usando el ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA).**

Las muestras de heces recolectadas antes y después de la intervención (día 0 y día 7 de tratamiento) fueron separadas e identificaciones en viales de 1.5 mL, pesando 100 mg de la muestra y almacenadas a -40°C para su posterior análisis, según lo reportado por Man-Chin en 2016 (54).

Las muestras se descongelaron en hielo y se realizó una dilución 1:10 peso/volumen en PBS 1%, además de adicionar inhibidores de proteasas 2 µL/100 µL homogenizando y manteniendo en agitación durante 30 min a 80 rpm. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min a 10000 g a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo a partir del cual se realizó una dilución 1:100 v/v en PBS al 1% el cual se utilizó para la cuantificación de IgA, siguiendo la metodología descrita por el Kit Human IgA Ready-SET-Go! ® para lo cual se realizó una curva de calibración como lo describe el método.

## **6. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

### **6.1 Análisis estadístico.**

De acuerdo con la distribución de las variables se utilizaron pruebas no paramétricas los datos se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

### **6.2 Tipo de muestreo y tamaño de la población.**

Se realizará un muestreo no probabilístico por conveniencia. Donde con ayuda de Rand.block de los paquetes de R, se realizará una aleatorización de folios y de esta forma definir los grupos de intervención con formulación sinbiótica o sin formulación sinbiótica.

## **7. RESULTADOS**

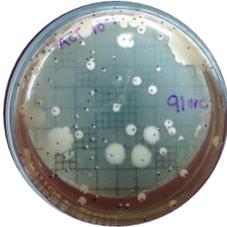
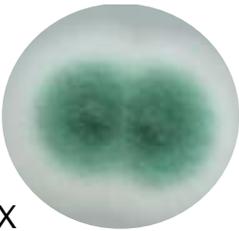
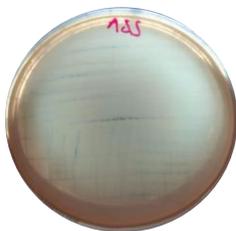
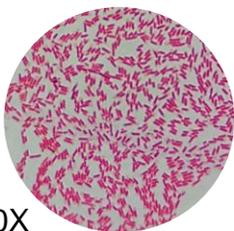
### **7.1 Extracción de fructanos de *Agave salmiana*.**

Se seleccionó una planta de *Agave* que cumpliera con la madurez fisiológica adecuada (entre 6 y 8 años), para esto se contó con la ayuda de un experto conocedor del tema, habitante de la comunidad de Laguna Seca en el Municipio de Charcas San Luis Potosí. Después de la selección, se procedió a realizar la colecta del *Agave*, el cual registro un peso aproximado de 44 kg de peso, se trasladó a el Laboratorio de Agroprocesos en el Instituto de Zonas Desérticas de la UASLP, donde se procedió a la extracción de los fructanos de *Agave* según la metodología de Godínez y colaboradores en 2016 (55) de donde se obtuvo un total de 350 g de polvo de fructanos, presentando las características de ser un polvo blanco cristalino, con alta solubilidad en agua.

#### **7.1.2 Inocuidad de los fructanos de *Agave salmiana*.**

Se procedió según la metodología el cuál se contempla el pesar 1 gramo de polvo de fructanos de *Agave* realizando diluciones seriadas 1:10 y cultivadas en medios selectivos según la normativa nacional y resumidas en la tabla 3, donde se muestran los resultados de la aplicación de las principales normas de inocuidad según la Normativa Mexicana. De acuerdo con los resultados, los fructanos extraídos están dentro de los límites permisibles para Bacterias anaerobias, Coliformes totales, Hongos y Levaduras, así como la ausencia de *Salmonella* spp. Se realizó una tinción de Gram para observar la morfología microscópica de las colonias aisladas en placa de Petri, encontrando los siguientes hallazgos:

**Tabla 3 A. Pruebas de inocuidad de fructanos.**

Determinación	Medio de cultivo	Cultivo en placa	Observación al microscopio
Bacterias aerobias	APE		 100X
Coliformes totales	ARVB		 100X
Hongos y levaduras	APD		 40X
<i>Salmonella</i> spp.	ASS		 100X

APE: Agar para cuenta estándar, ARVB Agar rojo violeta bilis, APD: Agar papa dextrosa, ASS: Agar *Salmonella Shigella*.

**Tabla 3 B. Resultados de las pruebas de inocuidad de fructanos.**

<b>Determinación</b>	<b>Resultado UFC/mL</b>	<b>Límite permitido UFC/mL</b>	<b>Referencia</b>
Bacterias aerobias	1090	$10^5$	NOM-092-SSA1-1994
Coliformes totales	360	$10^3$	NOM-113-SSA1-1994
Hongos y levaduras	20	$10^2$	NOM-111-SSA1-1994
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia	Ausencia	NOM-114-SSA1-1994

Debido a que el proceso de colecta del *Agave* se realiza a campo abierto, con herramienta habitual de trabajo; se llevó a cabo una técnica de limpieza y saneamiento con hipoclorito al 10% de las áreas comunes donde se realizó el proceso para la extracción de los fructanos, dicho procedimiento fue determinante, pues los resultados demostraron la inocuidad del polvo, ya que este cumple con los límites permisibles de Bacterias anaerobias, Coliformes totales, Hongos y Levaduras, así como la ausencia de *Salmonella spp.* Por lo tanto, pueden ser utilizados para consumo humano con total seguridad y respaldo de la normativa mexicana.

## **7.2 Evaluación del efecto sinbiótico a diferentes concentraciones en un biorreactor anóxico.**

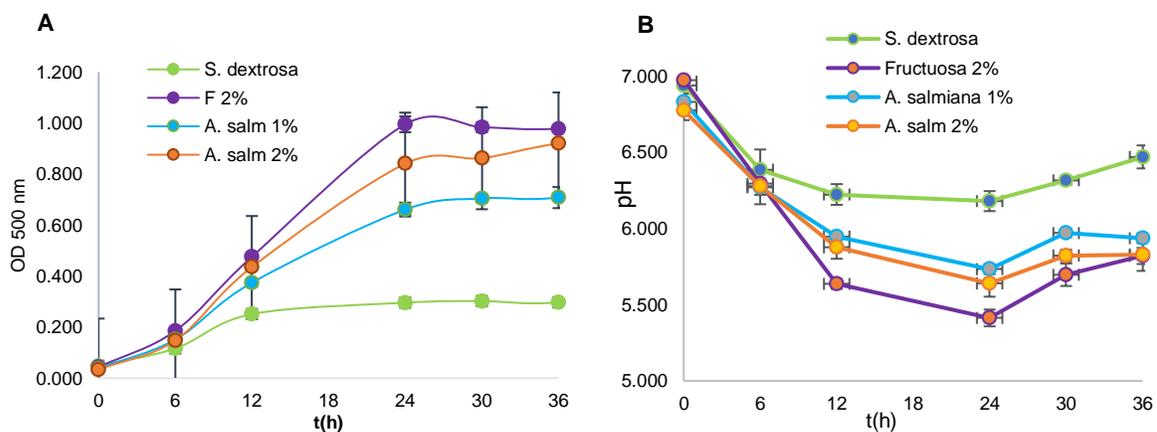
Empleando los componentes principales del caldo Sabouraud y sellados bajo N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> se utilizaron diferentes fuentes de carbono a distintas concentraciones (tabla 4) para caracterizar la cinética de crecimiento (a través de la lectura de absorbancia a 500 nm y pH) para calcular parámetros de crecimiento según la ecuación de Gompertz.

**Tabla 4. Carbohidratos utilizados para la cinética de crecimiento.**

<b>Fuente de carbono</b>	<b>Concentración</b>
Fructosa	1% y 2%
Fructanos <i>de Agave</i>	1% y 2%
Inulina	1%

Se describe un crecimiento proporcional a la concentración del carbohidrato utilizado, observando el mejor desarrollo cuando se añade fructosa al 2% siendo este un monosacárido, dicho crecimiento es comparable con el mostrado al utilizar fructanos al 2%, por lo cual sugerimos la capacidad de la maquinaria enzimática para aprovechar las diferentes estructuras presentes en los fructanos de *Agave salmiana*, y producir metabolitos capaces de disminuir el pH del medio, como se observa en la siguiente gráfica (Figura 2).

**Figura 2. Crecimiento de *S. boulardii* con diferentes carbohidratos.**

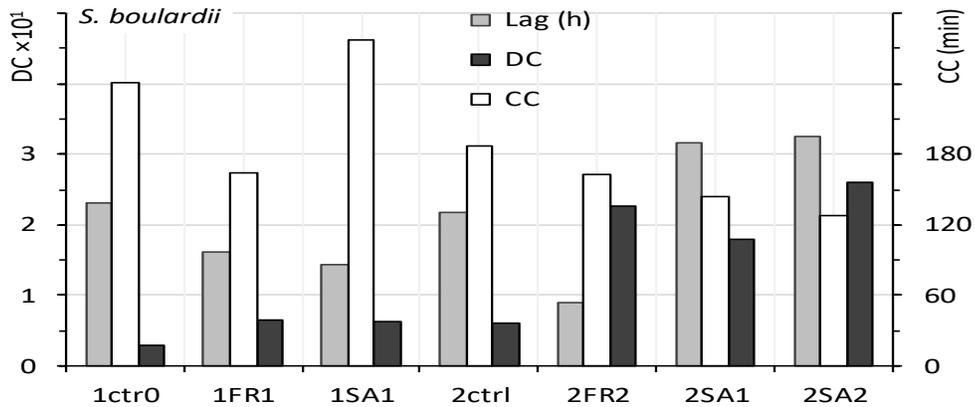


S. dextrosa: Sin dextrosa, F 2%: fructanos al 2%, A. salm 1%: *Agave salmiana* al 1%, A. salm 2%: *Agave salmiana* al 2%.

Dicha disminución del pH (figura 2. B) se estima que sea debido a la producción de metabolitos ácidos como el ácido láctico o los ácidos grasos de cadena corta, o alguna otra sustancia con la capacidad de disminuir el pH del medio, sin embargo, se sugiere realizar pruebas metabolómicas para describir la relación de los metabolitos y la composición de los fructanos de *Agave salmiana* a diferentes tiempos de incubación.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia (figura 2. A), se adaptaron a una ecuación matemática no lineal obteniendo valores de tiempo de adaptación, razón de duplicación y número de veces que se duplico. Obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3.

**Figura 3. Comparación de parámetros de crecimiento de *S. boulardii* con diferentes carbohidratos.**

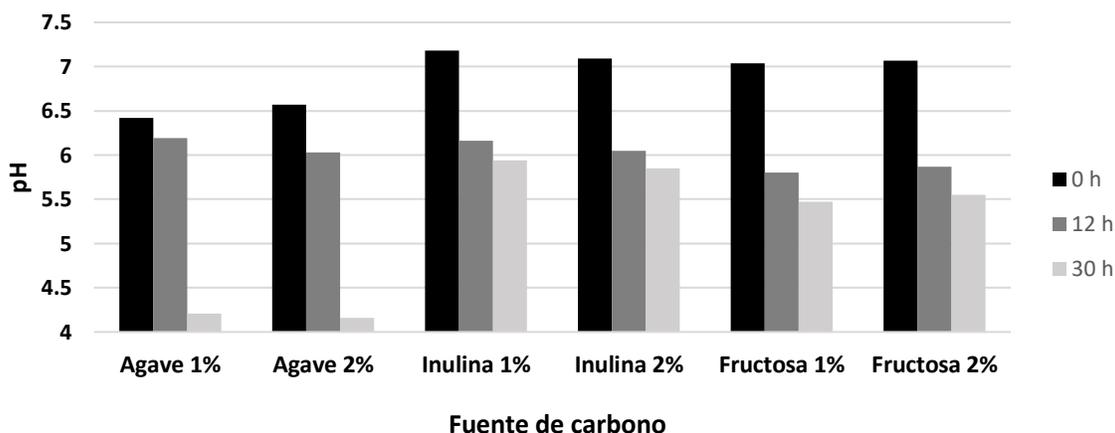


Comparación de parámetros de crecimiento de *S. boulardii* en medio sin carbohidratos (ctr0), 1 % fructosa (FR1), 1 % o 2 % *A. salmiana* (SA1, SA2) de dos ensayos independientes. **Lag**: tiempo de adaptación. **DC**: Duplicación Celular, número de veces. **CC**: Ciclo Celular, tiempo de duplicación.

Los resultados observados en la figura muestran que el tiempo de adaptación de *S. boulardii* es corto cuando se da fructosa al 1 y 2%, mientras que va en aumento al tratarse de fructanos al 1 y 2%, dicho tiempo de adaptación es un reflejo de la tasa de duplicación que finalmente ambos parámetros concretan en una menor cantidad de biomasa generada. En nuestra propuesta *A. salmiana* al 2% resultó tener un tiempo de adaptación mayor a 3 h, con una tasa de duplicación de 2 h, obteniendo una biomasa de  $2.5 \times 10^{10}$ . Finalmente, en cuanto al control de crecimiento se trató de caldo Sabouraud sin carbohidratos, donde se observa que a pesar de tener un tiempo de adaptación menor al de fructosa y fructanos al 2%, su tasa de duplicación es mínima.

Las mismas muestras utilizadas para la medición de la densidad óptica se utilizaron por duplicado para la determinación del pH, en las cuales se observó una tendencia contraria pues a menor concentración de carbohidrato utilizado, mayor producción de metabolitos ácidos.

**Figura 4. pH a diferentes tiempos de incubación.**



Nuestro interés se centró en los fructanos de *Agave* debido a que en su caso se presentó la mayor disminución del pH, presentando valores de 4.1 después de 30 horas de incubación, mientras que su contraparte la inulina como prebiótico de referencia se obtuvieron los valores más altos de pH, registrando un valor de pH:5.8 seguido de la fructosa con un valor de pH:5.4, todos ellos a un tiempo de incubación de 30 horas.

### 7.2.1 Evaluación de los componentes del medio después de la incubación de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 y diferentes carbohidratos mediante HPLC.

Se utilizaron los tiempos de retención para la identificación de las moléculas de interés y se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de estos, la cual se resume en la siguiente tabla (Tabla 5).

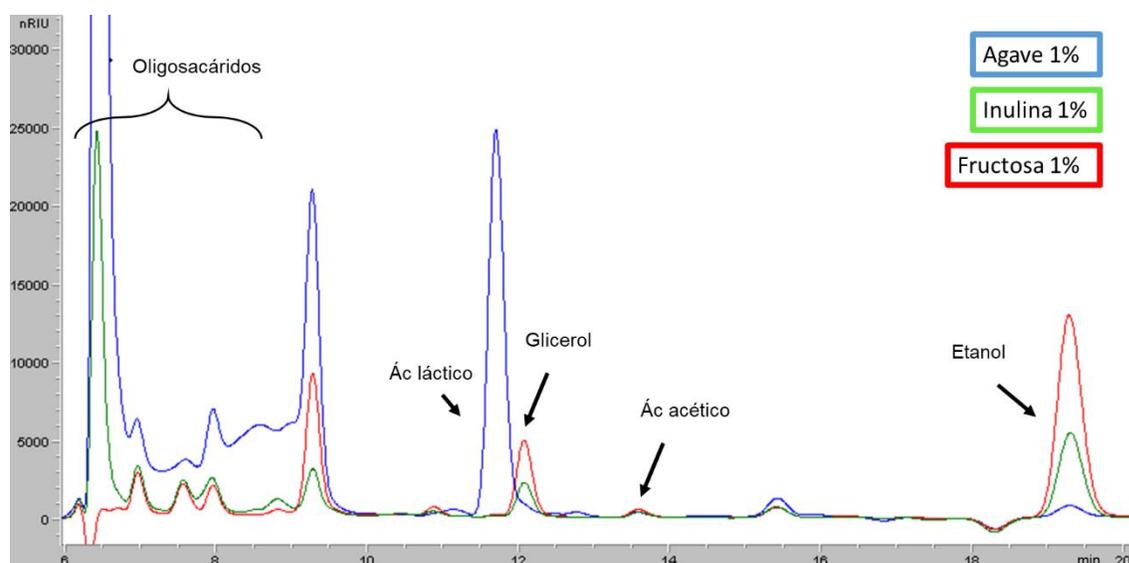
**Tabla 5. Tiempos de retención y coeficiente de determinación de las moléculas de interés.**

Molécula	Tiempo de retención (min)	R <sup>2</sup>
Ácido láctico	11.6	0.9971
Glicerol	12	0.998
Ácido acético	13.5	0.9968
Ácido propiónico	15.9	0.9986
Etanol	19.2	0.9964

El objetivo principal fue la determinación de los principales Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC), y además se aprovecharon los estándares internos disponibles, como ácido láctico, glicerol y etanol, y de esta forma analizar los productos de la fermentación.

La figura 5 muestra un cromatograma con los principales productos finales de la fermentación, para cada uno de los sustratos evaluados, mostrando picos de interés de las moléculas anteriormente señaladas, en el cual se puede observar su presencia en relación con el tiempo de retención de cada una de ellas.

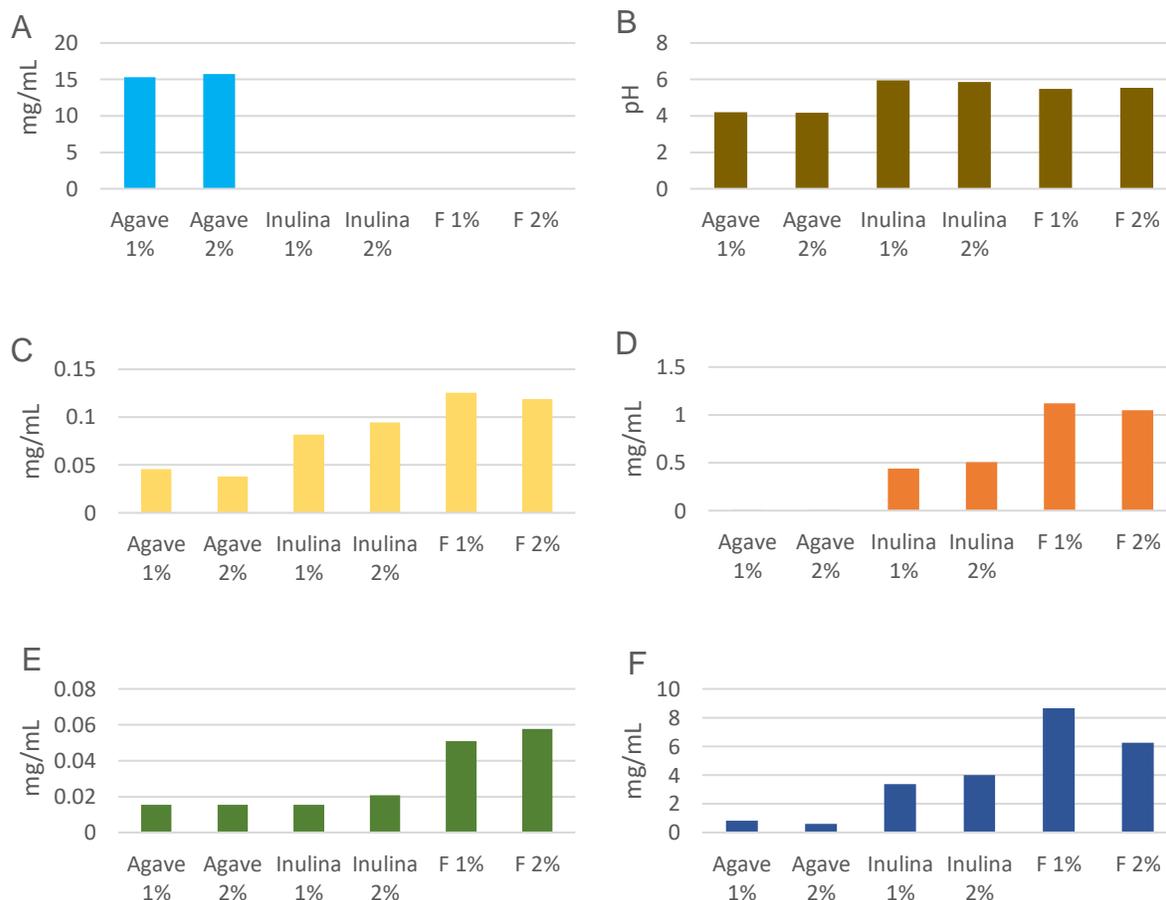
**Figura 5. Cromatograma que muestra los principales picos de interés.**



Es interesante señalar que dicho cromatograma corresponde a la totalidad de los carbohidratos, es decir *Agave 1%*, *Inulina 1%*, *Fructosa 1%*, después de un tiempo de incubación de 12 h. Los picos correspondientes que se resuelven entre los 6 y 8 min son oligosacáridos presentes en las múltiples estructuras que se presentan tanto en la inulina (enlaces  $\beta$  1-2) y los fructanos (enlaces  $\beta$  1-2, y  $\beta$  2-6). Los cuales como podemos observar tienen una gran concentración, es decir, *S. boulardii* no tiene la capacidad de degradar la totalidad de las estructuras presentes después de 12 h de incubación. El pico presente a los 9 min corresponde a la fructosa que, para nuestro fin, no se analizó su concentración. En la figura 5 se puede observar que las diferentes fuentes de carbono, debido a su composición, generan diferentes

metabolitos, observando principalmente la producción de ácido láctico en una concentración de 15.3 mg/mL cuando el sustrato fueron los fructanos al 1%. Además, se puede observar que los principales metabolitos cuantificados por este método fueron el glicerol y etanol cuando se trata de fructosa e inulina al 1%, debido a una fermentación alcohólica. En general, la producción de ácido acético se presentó en las tres fuentes de carbono. La figura 6 corresponde a la representación gráfica de los metabolitos cuantificados para cada uno de los sustratos estudiados, donde podemos encontrar la relación entre la mayor disminución del pH y la producción de ácido láctico a partir de los fructanos al 1%.

**Figura 6.- Metabolitos identificados después de 30h de incubación.**



A: Producción de Ácido láctico. B: Acidificación del medio. C: Producción de Ácido acético D: Producción de Glicerol. E: Producción de Ácido propiónico. F: Producción de Etanol. F 1%: Fructosa 1%, F 2%: Fructosa 2%. Se utilizaron diferentes fuentes de carbono en concentración creciente y se analizaron después de 30h de incubación.

### 7.3 Efecto del *sinbiótico* en pacientes.

Se contó con la participación de 15 niños de entre 2 a 10 años. Se recolectaron un total de 5 muestras por grupo de estudio, antes y después de la intervención para un total de 30 muestras. Los datos generales de los pacientes se reflejan en la tabla 6, donde se puede observar que una tercera parte son mujeres de entre 2 a 9 años, mientras que el resto fueron hombres de entre 2 a 10 años.

**Tabla 6. Datos generales de los pacientes en estudio.**

Folio	Sexo	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	PC (cm)
1.0	Mujer	4.0	12.00	100	49.00
7.0	Hombre	3.0	15.20	100	50.00
8.0	Mujer	8.0	41.00	135	53.00
9.0	Hombre	4.0	16.00	105	48.00
10.0	Mujer	9.0	38.00	120	50.00
12.0	Hombre	2.7	14.00	92	50.00
14.0	Hombre	6.0	18.80	114	51.00
24.0	Hombre	9.0	41.60	138	54.00
38.0	Hombre	2.0	13.20	92	47.00
41.0	Hombre	3.1	16.50	94	49.50
49.0	Hombre	5.4	21.10	115	54.30
50.0	Hombre	5.0	20.00	110	53.00
51.0	Mujer	2.0	11.50	81	45.00
52.0	Hombre	10.0	45.00	142	56.00
53.0	Mujer	3.0	15.00	95	49.00

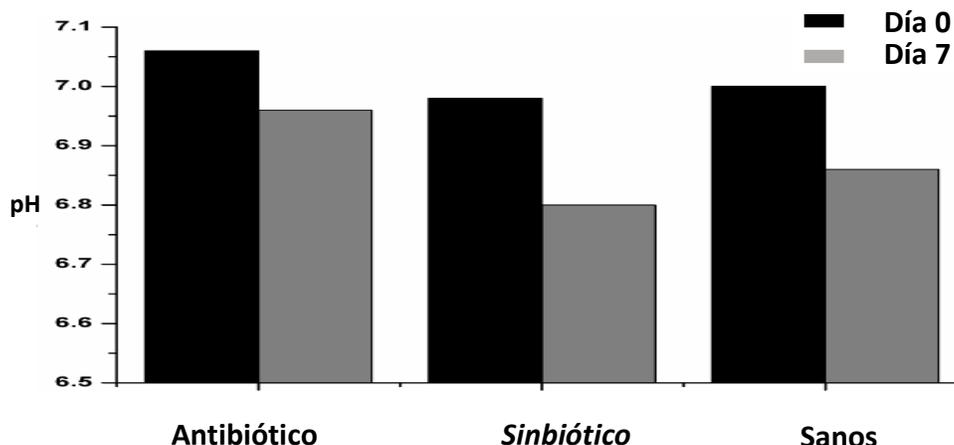
PC: perímetro cefálico

Todos los pacientes iniciaron y terminaron su tratamiento en tiempo, siguiendo las recomendaciones señaladas por el médico tratante, además se atendieron vía telefónicas las dudas surgidas durante el proceso. El tiempo de recolección se realizó en la temporada invernal del 2018, finalizando en la primavera de 2019. No se reportaron efectos adversos durante el tratamiento, sin embargo, se tuvo una tasa de rechazo del 50% por motivos no señalados por los padres o tutores. Se contó con la firma de consentimiento y asentimiento por parte de la totalidad de los padres o tutores y de los pacientes.

### 7.3.1 Evaluación del pH y grasa en heces.

La determinación de grasa en heces permitió relacionar la capacidad del tratamiento, de acidificar el trato intestinal, debido a los productos de la fermentación bacteriana de los prebióticos.

**Figura 7. pH de la muestra por grupo de estudio por tiempo de intervención.**



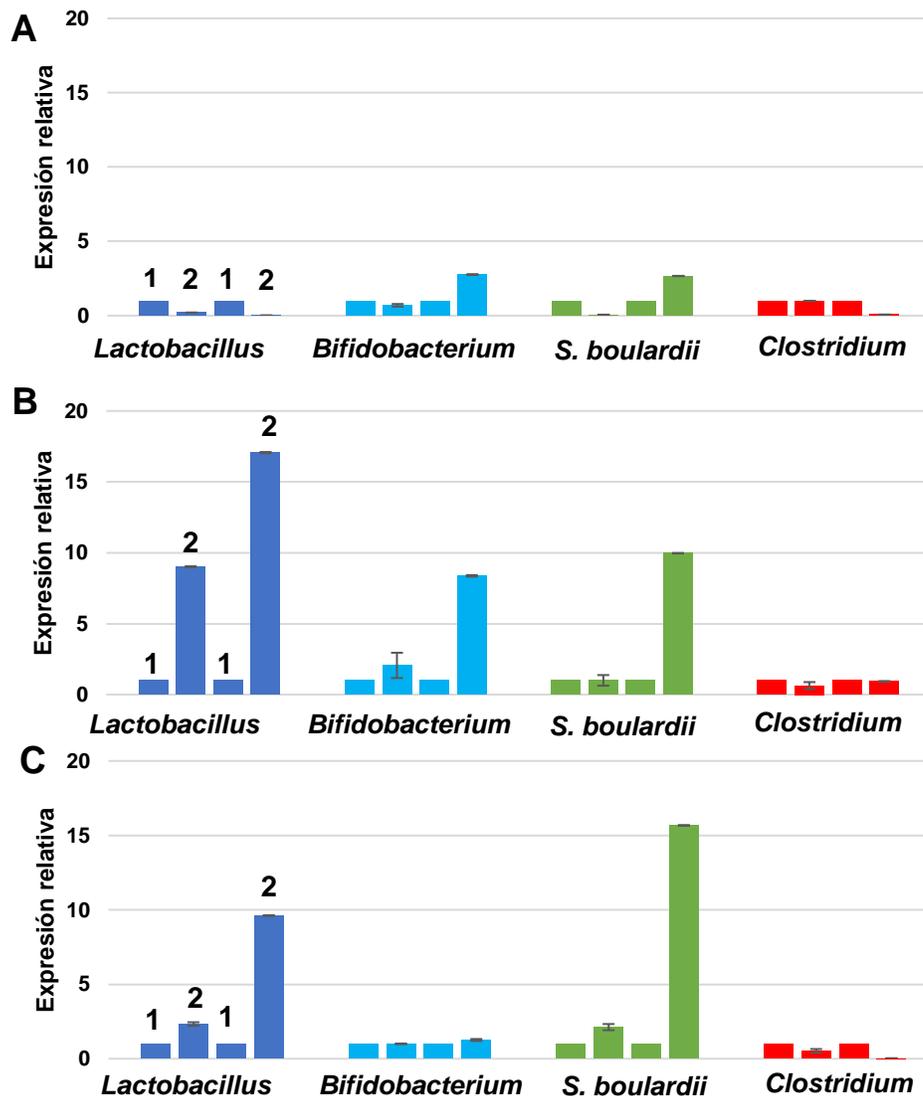
Se realizó la determinación del pH antes y después de finalizar el tratamiento donde no se observan diferencias de disminución de pH entre tratamiento, sin embargo, cabe señalar que en el grupo 2 (*sinbiótico*) se observó la mejor disminución, en 4 de los 5 integrantes del grupo hubo una disminución de por los menos 3% comparado con el valor inicial, y una disminución máxima de 8.6%, la media del valor observado al inicio del tratamiento, pH 6.94 disminuyó hasta pH 6.7. En el grupo 1 (Antibiótico), se observó un aumento mínimo del 4.3% y un aumento máximo de 5.7%. Finalmente, el grupo 3 (sanos) hubo una disminución del 4.8% en 3 de los 5 pacientes.

La determinación de grasa en heces nos arrojó datos cualitativos donde 6 muestras resultaron positivas (3 del grupo 2, y 3 del grupo 3) con más de 10 gotas de 20 micras, pertenecientes a los grupos 2 y 3, que correspondían a los pacientes con tratamiento *sinbiótico* – antibiótico, y pacientes sanos que recibieron *sinbiótico*. Se analizaron las muestras al inicio y final del tratamiento, donde 4 de los 6 pacientes positivos continuaron presentando más de 10 gotas de grasa en la muestra, después de terminado el tratamiento.

### 7.3.2 Cuantificación de las especies microbianas de la microbiota

Con el fin de conocer el impacto en la microbiota intestinal después del tratamiento, se realizó una cuantificación relativa de algunos de los principales géneros microbianos, donde se observó una diferencia interindividual entre cada muestra independientemente del grupo al que se pertenezca, sin embargo, se encontraron algunas particularidades representadas en la figura 8.

**Figura 8. Cuantificación relativa de géneros bacterianos de interés.**



A: Representación del grupo antibiótico, B: representación del grupo sinbiótico, C: representación del grupo sanos. 1: Inicio del tratamiento, 2: fin del tratamiento.

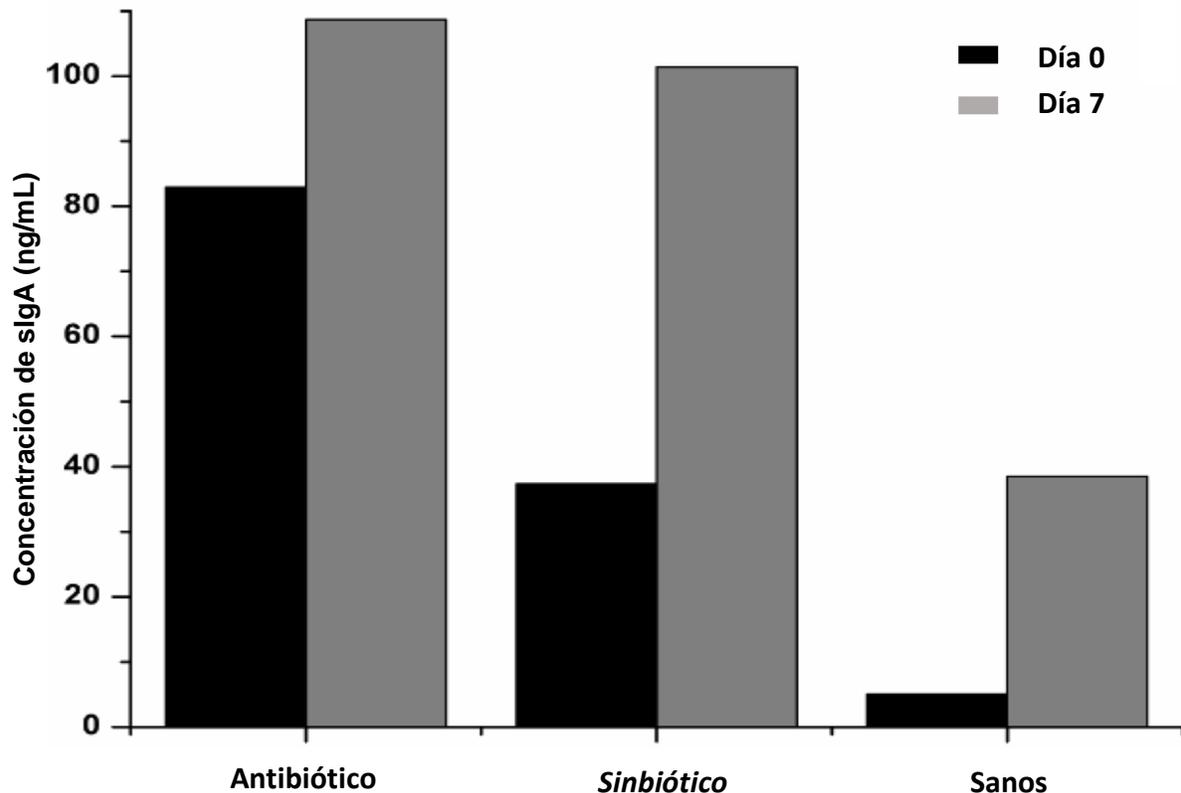
En la figura 8 se puede observar por diferentes grupos de estudio los cambios en la expresión relativa, antes y después del tratamiento normalizado con la expresión del gen de actina, un gen de referencia. Es de llamar la atención como en el grupo 1, representado en la figura 8<sup>a</sup>, se encuentra una baja expresión relativa de la totalidad de microorganismos estudiados, destacando una disminución de *Lactobacillus*, y *Clostridium*, sin embargo, se encontró un ligero aumento en la expresión de *Bifidobacterium* y *S. boulardii*. Contrario a lo que se muestra en el grupo de pacientes tratados solamente con antibiótico, en los grupos que se les intervinieron con el *sinbiótico*, la expresión relativa de los microorganismos *Lactobacillus* spp y *S. boulardii* fue mayor. Interesantemente en la gráfica 8B correspondiente al grupo de pacientes tratados con antibiótico más el *sinbiótico*, se observó un ligero aumento de *Bifidobacterium*. Finalmente, en la gráfica 8C correspondiente al grupo de niños sanos, aumentó la expresión de *Lactobacillus* en forma más marcada que el ligero incremento de *Bifidobacterium* presentado posterior a la intervención, estos resultados concuerdan con previos resultados in vitro, donde se evidenció que los componentes del *Agave salmiana* son mejor asimilados por los microorganismos del género *Lactobacillus* que por los microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium*, lo anterior debido a las características enzimáticas de cada uno de los géneros y su capacidad de asimilar los componentes prebióticos del *Agave salmiana*.

### **7.3.3 Caracterización del efecto inmunológico.**

Se realizó una curva de calibración siguiendo las recomendaciones señaladas por el fabricante, la cual nos arrojó un coeficiente de determinación de  $R=0.9926$ . Con la cual se realizó la determinación de la concentración de IgA en una muestra de heces. La figura 9 señala una muestra representativa de cada grupo al inicio y fin del tratamiento. En el grupo 1 (antibiótico) se observó un aumento en 2 de 5 pacientes, en el grupo 2 (*sinbiótico*) se observó el mayor aumento pues 4 de cada 5 integrantes mostraron un aumento, finalmente en el grupo 3 (sanos) se presentó un aumento en 2 de 5 muestras, una de ellas con un aumento del 666.5%. En dicha

representación se puede observar el aumento de sIgA conforme termina el tratamiento.

**Figura 9. Concentración de sIgA de muestras representativas de cada grupo.**



Se observa el mayor incremento en la concentración de sIgA en el grupo de niños sanos a un nivel de 666.5%, seguido del grupo *sinbiótico*, con un incremento del 171.6%, mientras que el menor incremento, es decir el 31% se presentó en el grupo de pacientes que recibían únicamente antibiótico. Los valores de sIgA fueron muy variados que van desde los 5.02 ng/mL hasta los 108.71 ng/mL. Se realizó además la comparación de la concentración de IgA según la forma de parto; parto natural  $n= 16$  y parto por cesárea  $n=4$ ; sin embargo, en el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas. U Kruskal Wallis para muestras independientes  $p = 0.659$ .

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 Extracción de fructanos de *Agave salmiana*.**

La extracción de fructanos resultó favorable con un rendimiento intermedio de aproximadamente el 0.8% del peso total de la cabeza del *Agave*, siendo esta cantidad la suficiente para realizar tanto las pruebas de inocuidad, así como para la dispensación a los pacientes. Estudios previos como el de Godínez y colaboradores en 2016 (55) reportan un rendimiento de 1.82% siguiendo la misma metodología de extracción. Para los fines de este estudio fueron suficientes los 350 g extraídos.

#### **8.1.2 Inocuidad de los fructanos de *Agave salmiana*.**

Los polvos de fructanos resultaron inocuos, y aptos para consumo humano, actualmente se cuenta con una Norma Oficial Mexicana para polvos de Fructanos NOM-02-SAGARPA-2016, donde los límites permisibles son equiparables a los reportados en nuestro estudio.

### **8.2 Evaluación del efecto *sinbiótico* de *Agave salmiana* y *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 a diferentes concentraciones en un biorreactor anóxico.**

El crecimiento de *S. boulardii* resultó ser proporcional a la concentración de la fuente de carbono utilizada, siendo la concentración de fructanos al 2% quien mejor propició el desarrollo de la levadura a las 24 horas de incubación. El polvo de *Agave* además de fructanos contiene pequeñas cantidades de mono y polisacáridos (55, 56) en esta instancia se puede predecir que mientras se aumente la concentración de la fuente de carbono y que esta cuente con carbohidratos simples, el pico más alto en la fase exponencial de una curva de crecimiento se alcanzará en un menor tiempo. Tal el caso del estudio de Trigeros y colaboradores en 2016 (57) el cual se añadieron al medio 60 g de glucosa a un medio similar alcanzando el máximo de crecimiento exponencial a las 15 horas de incubación a 30°C. En el mismo estudio (57) encontraron una relación entre el aumento de la concentración de nitrógeno en el medio, misma que favorecerá el aumento en la biomasa. En el caso de este estudio no se contempló la modificación de los componentes iniciales del Caldo Sabouraud, únicamente sustituimos la principal fuente de carbono, sin considerar compuestos necesarios para favorecer la actividad enzimática de *S. boulardii* tal es

el caso del sulfato de magnesio, útil para la activación de la enzima glucosa-6-fosfato (58).

### **8.2.1 Evaluación de los componentes del medio después de la incubación de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 y diferentes carbohidratos mediante HPLC.**

Se identificaron diferentes metabolitos después de la incubación de *S. boulardii* con diferentes fuentes de carbono. El uso de fructanos propició la formación de metabolitos relevantes, principalmente se produjo Ácido láctico el cual puede servir de sustrato para las bacterias ácido-lácticas de la microbiota intestinal. En el estudio de Gancedo y colaboradores, demostraron que los principales metabolitos en medios sub- anaeróbicos son el glicerol y los ácidos orgánicos (59). Otros estudios como el de Mousa y colaboradores, reportan la capacidad de *S. boulardii* de producir altas concentraciones de lactato cuando se utiliza en combinación con *Lactobacillus* (60), dicho mutualismo se puede presentar en el tracto gastrointestinal, disminuyendo el pH del medio y favoreciendo la absorción de minerales como el calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo debido a la ionización de estos formando sales solubles asimilables (61). La producción de ácidos grasos de cadena corta resulto limitado, sin embargo, se espera que al utilizar el *sinbiótico* para consumo humano, la composición de la pared de *S. boulardii* rica en glucanos y otros componentes, propicie la producción de AGCC por parte bacterias de la microbiota, como lo demuestra el estudio de Schneider en 2006, donde después de la administración de *S. boulardii* incrementa la concentración de butirato (62).

### **8.3 Efecto del sinbiótico en pacientes.**

La administración del *sinbiótico* compuesto por 1 g de *Agave salmiana* y un sobre de Floratil ® Biodex fue bien tolerado por los participantes en el estudio independientemente del grupo al que pertenecían, no se reportaron efectos atribuibles a la formulación a lo largo de la intervención. Existen estudios donde 6 g al día de fructanos de inulina (63) son bien tolerados en niños de 3 a 6 años.

El efecto de la administración del *sinbiótico* tiene varios puntos clave, uno de ellos depende directamente de la correcta administración; a pesar de dar las

recomendaciones puntuales a los padres del paciente, muchas veces son no consideradas, afectando directamente los resultados como un sesgo de selección.

Otro de los puntos que interesantemente tuvieron impacto en este estudio, y contrastando con el punto anterior, es el criterio de la dosis respuesta. La dosis administrada a los pacientes en el estudio fue de 250 mg Floratil Biocodex® que contiene  $2.5 \times 10^{10}$  UFC de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 una vez al día durante 7 días. En este contexto entendemos que el efecto dependerá del tiempo de exposición (64) y la pérdida de la viabilidad debido a los diversos microambientes presentes en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, en el estómago donde se ha descrito que hay una reducción de hasta el 27% de la concentración inicial (65). Sin embargo, uno de los puntos clave a favor, es la combinación con *Agave salmiana* que pudiera ser además de un complemento que estimule a las bacterias de la microbiota, pueda proteger a la levadura en su paso a lo largo del tracto gastrointestinal, en el estudio anteriormente mencionado (65) *Psyllium* favoreció el aumento de *S. boulardii* en el estado estacionario en ratas.

En un estudio similar (66) se administró Flastor®, Biocodex y Amoxicilina-clavulanato 875/125 mg 2 veces al día durante 7 días, sin embargo, este fue administrado en voluntarios sanos de entre 18 y 65 años en el cual se observaron diferencias mínimas en la disminución de la diarrea y especies dominantes en la microbiota intestinal antes y después del tratamiento.

### **8.3.1 pH y grasa en heces**

Siguiendo con el estudio del efecto sinbiótico, se midió el pH antes y después del tratamiento, para de esta forma evaluar indirectamente la producción de metabolitos con capacidad de acidificar el medio, como ya se discutió en el punto 8.2.1 donde se encontró que la mezcla sinbiótica tiene la capacidad *in vitro* de producir ácido láctico, sin embargo se esperaba una mayor producción de metabolitos ácidos debido a la fermentación de los fructanos de *Agave* por parte de las bacterias de la microbiota intestinal. En este caso en el grupo sinbiótico en donde se presentó la menor disminución del pH antes y después del tratamiento en un 3.45%. Un estudio previo donde se administraron 6 g de fructanos a niños de entre 3 a 6 años, no se

observa una diferencia significativa en la disminución del pH antes y después del tratamiento comparado con placebo (63).

La intención de realizar la determinación de grasa en heces fue la relación que esta tiene cuando la consistencia es grasosa y abundante, como se describe en el tipo 5 en la escala de Brixton (67), sin embargo, no hubo relación entre las muestras de grasa positiva y la consistencia de esta. Hablando propiamente de la consistencia de la muestra y su relación a disminución del pH, la escasa disminución del pH puede ser una condición propia del tiempo del tránsito intestinal, debido a la baja consistencia de las heces y el aumento en la frecuencia de las evacuaciones (68).

Finalmente contrastando los resultados señalados al momento con nuestra hipótesis inicial, no se observó la presencia de diarrea asociada al uso de antibióticos en los grupos de pacientes que recibían únicamente antibiótico, ni en el grupo de pacientes que recibían antibiótico y sinbiótico, se reportó una frecuencia promedio de 2 evacuaciones al día en la totalidad de los participantes del estudio, sin observar cambios importantes en la consistencia de la muestra antes y después de la intervención. Sin embargo, es importante señalar que la mejor disminución del pH se presentó en el grupo 2 (*sinbiótico*) esto podría ser señal del efecto de los fructanos de *A. salmiana*, así como al efecto de *S. boulardii*, mismo que se ha reportado que aumenta el tiempo de recuperación en heces cuando se administra junto con un antibiótico (69).

### **8.3.2 Cuantificación de las especies microbianas de la microbiota**

La modificación de las especies bacterianas en la microbiota depende de diversos factores que incluyen la dieta, calidad de vida y medio ambiente (70). En este caso la administración de un antibiótico (71, 72) o probiótico (63, 66) sigue la modificación parcial de algunas especies, sin embargo, no hay reportes de la administración de un *sinbiótico* a la par de un tratamiento antibiótico. En nuestros resultados el uso de un *sinbiótico* favoreció el aumento de *Lactobacillus*, y por ende la recuperación de *Saccharomyces boulardii*. Se han descrito estudios donde se evalúa el efecto prebiótico de los fructanos de *Agave* obtenidos de forma similar a nuestro estudio, observando un incremento significativo de *Bifidobacterium lactis*,

mientras que para *L. casei* no se observaron diferencias significativas (73). La administración del *sinbiótico* propició un decremento de *Clostridium*; en un estudio similar donde se administraron 6 g de fructanos de inulina, no se observaron diferencias significativas en la concentración de *Clostridium* (50). Por otro lado, el efecto de *S. boulardii* como parte de la formulación *sinbiótica*, se puede observar en la protección al microambiente intestinal por competición de espacio, además de la secreción de bacteriocinas capaz de controlar patógenos intestinales como *C. difficile* (74), sin embargo su principal beneficio en la microbiota intestinal, es su capacidad para estimular a través de la composición de su pared celular compuesta por glucanos, manoproteínas y quitina (75), mismas que actuarán como un sustrato fermentable para las especies bacterianas de la microbiota, que producen como principal metabolito los ácidos grasos de cadena corta (76).

Un punto culminante en este tipo de estudio es el tipo de muestra a utilizar para evaluar la microbiota, ya que se ha demostrado que existe una diferencia de poblaciones bacterianas dependiendo la porción del intestino (77), en este caso las bacterias que podemos cuantificar son las de la última porción del intestino grueso, donde debido a las condiciones del microambiente será más favorable el desarrollo de ciertas especies.

### **8.3.3 Caracterización del efecto inmunológico**

Uno de los principales beneficios que ofrece una microbiota intestinal saludable, es la protección ante patógenos y patobióntes (es decir microorganismos comensales que bajo ciertas circunstancias puede ocasionar un daño al hospedero), uno de los mecanismos implicados en dicho beneficio es la estimulación de la respuesta inmune adaptativa, concluyendo en la secreción de inmunoglobulinas, específicamente inmunoglobulina A. En este estudio se evaluó la producción de sIgA antes y después del tratamiento, observando principalmente un aumento de sIgA en los participantes sanos tratados con el *sinbiótico*, seguido de aquellos pacientes que recibieron a la par del tratamiento antibiótico, la formulación *sinbiótica*. El aumento en ambos casos se puede atribuir al aumento *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la microbiota intestinal, mismas que son consideradas con

potencial para estimular la producción de sIgA. En un estudio realizado en 2010 se administró *L. rhamnosus* a niños de entre 1 a 5 años durante un mes, observando un aumento significativo en los niveles de sIgA después de la intervención (78); en otro estudio se compararon los niveles de sIgA de voluntarios sanos que consumieron 180 g /día de pan suplementado con prebióticos, donde no se observaron diferencias significativas comparado con placebo (79). Se ha reportado la capacidad de *S. boulardii* para estimular la respuesta inmune y secreción de IgA en ratas (75, 80).

## 9. CONCLUSIÓN

Los fructanos de *Agave salmiana* extraído y purificados por un método tradicional, son inocuos y aptos para consumo humano; en niños de 2 a 10 años es bien tolerada la administración de 1g por día.

*Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 tiene la capacidad de degradar y aprovechar los fructanos de *Agave salmiana* como principal fuente de carbono, aumentando su biomasa en forma proporcional a la concentración de fructanos añadida al medio.

El *sinbiótico* compuesto por *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 y fructanos de *Agave salmiana* puede ser administrados en niños de entre 2 y 10 años, en los cuales el efecto *sinbiótico* se vio reflejado en una disminución de pH y grasa en heces, mientras que promovió el incremento de *Lactobacillus* y la colonización de *S. boulardii* en la microbiota intestinal, favoreciendo la producción de inmunoglobulina A secretora, tanto en aquellos pacientes que fueron tratados con Amoxicilina clavulanato, como en aquellos que solo recibieron la formulación *sinbiótica*.

Este estudio plantea las bases para la implementación de un estudio clínico, que resuelva la necesidad de un *sinbiótico*, elaborado con un prebiótico accesible en nuestra región, que pueda ser útil en condiciones clínicas en las cuales se desarrolle una disbiosis intestinal, evitando las complicaciones en dicha condición y aprovechando los beneficios que ofrece su uso para favorecer la recuperación y salud del paciente.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 2003;361(9356):512-9.
2. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2015;31(1):69.
3. Ottman N, Smidt H, De Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:104.
4. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(26):11971-5.
5. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*. 2014;6(237):237ra65-ra65.
6. Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, et al. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental microbiology*. 2009;11(7):1736-51.
7. Vaishampayan PA, Kuehl JV, Froula JL, Morgan JL, Ochman H, Francino MP. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome biology and evolution*. 2010;2:53-66.
8. Avershina E, Storrø O, Øien T, Johnsen R, Pope P, Rudi K. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS microbiology ecology*. 2014;87(1):280-90.
9. Cheng J, Ringel-Kulka T, Heikamp-de Jong I, Ringel Y, Carroll I, De Vos WM, et al. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *The ISME journal*. 2016;10(4):1002.

10. Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*. 2003;422(6931):522.
11. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.
12. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
13. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 2001;292(5519):1115-8.
14. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*. 2011;473(7346):174.
15. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
16. Derrien M, Collado MC, Ben-Amor K, Salminen S, de Vos WM. The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(5):1646-8.
17. Morelli L, Capurso L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology*. 2012;46:S1-S2.
18. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2014;11(8):506.
19. Valdovinos MA, Montijo E, Abreu AT, Heller S, González-Garay A, Bacarreza D, et al. Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de gastroenterologia de Mexico*. 2017;82(2):156-78.
20. Wasilewski, A., Zielńska, M., Storr, M., & Fichna, J. (2015). Beneficial Effects of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Psychobiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Basic Science Review Article*, 1674-1682.

21. Hernandez Hernandez, O., Muthiyar, A., Moreno, F., Montilla, A., Sanz, M., & Ricke, S. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 355-361.
22. López, M. G., Mendoza, D. G., & Mancilla Margalli, N. a. (2003). Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 7835-7840.
23. Mellado Mojica, E., & López, M. G. (2012). Fructan metabolism in *Agave tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11704-11713.
24. DGO. Dirección General de Comunicación Social. (26 de enero de 2018). Recuperado el 13 de agosto de 2019, de [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018\\_045.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_045.html)
25. Michel Cuello, C., "Study of Enzymatic Hydrolysis of Fructans from *Agave salmiana* Characterization and Kinetic Assessment." *The Scientific World Journal*. 2012,
26. J. R. Aguirre-Rivera, H. F. Charcas-Salazar, J. L. Flores-Flores, El Maguey Mezcalero Potosino, Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, San Luis Potosí S. L. P., México, 2001, pp.78.
27. Ferrer M, Martins dos Santos VAP, Ott SJ, Moya A. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut microbes*. 2014;5(1):64-70.
28. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*. 2012:gutjnl-2012.
29. Forssten S, Evans M, Wilson D, Ouwehand AC. Influence of a probiotic mixture on antibiotic induced microbiota disturbances. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(33):11878.
30. Hersh AL, Shapiro DJ, Pavia AT, Shah SS. Antibiotic prescribing in ambulatory pediatrics in the United States. *Pediatrics*. 2011;128(6):1053-61.
31. Gerber JS, Ross RK, Bryan M, Localio AR, Szymczak JE, Wasserman R, et al. Association of Broad-vs Narrow-Spectrum Antibiotics With Treatment Failure,

Adverse Events, and Quality of Life in Children With Acute Respiratory Tract Infections. *Jama*. 2017;318(23):2325-36.

32. Hersh AL, Fleming-Dutra KE, Shapiro DJ, Hyun DY, Hicks LA. Frequency of first-line antibiotic selection among US ambulatory care visits for otitis media, sinusitis, and pharyngitis. *JAMA internal medicine*. 2016;176(12):1870-2.

33. Shehab N, Lovegrove MC, Geller AI, Rose KO, Weidle NJ, Budnitz DS. US emergency department visits for outpatient adverse drug events, 2013-2014. *Jama*. 2016;316(20):2115-25.

34. Tähtinen PA, Laine MK, Huovinen P, Jalava J, Ruuskanen O, Ruohola A. A placebo-controlled trial of antimicrobial treatment for acute otitis media. *N Engl J Med*. 2011;2011(364):116-26.

35. Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS. Red Book, (2015): 2015 Report of the Committee on Infectious Diseases: *Am Acad Pediatrics*; 2015.

36 28. Chow AW, Benninger MS, Brook I, Brozek JL, Goldstein EJC, Hicks LA, et al. IDSA clinical practice guideline for acute bacterial rhinosinusitis in children and adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(8):e72-e112.

37. Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2012;5(2):111-25.

39. Graff S, Chaumeil J-C, Boy P, Lai-Kuen R, Charrueau C. Formulations for protecting the probiotic *Saccharomyces boulardii* from degradation in acidic condition. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008;31(2):266-72.

40. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 1995;125(6):1401-12.

41. De Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Food biotechnology*: Springer; 2008. p. 1-66.

42. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(12):7577-87.

43. Peña AS. Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 2007;99(11):653.

44. Elmer GW, Martin SW, Horner KL, McFarland LV, Levy RH. Survival of *Saccharomyces boulardii* in the rat gastrointestinal tract and effects of dietary fiber. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1999;11(1):29-34.
45. Klein SM, Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, Levy RH. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharmaceutical research*. 1993;10(11):1615-9.
46. Davidson MH, Maki KC, Synecki C, Torri SA, Drennan KB. Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutrition Research*. 1998;18(3):503-17.
47. Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?-. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(6):1682S-7S.
48. Reddy BS, Hamid R, Rao CV. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*. 1997;18(7):1371-4.
49. Martinez-Gutierrez F, Ratering S, Juárez-Flores B, Godinez-Hernandez C, Geissler-Plaum R, Prell F, et al. Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *LWT*. 2017;84:151-9.
50. Lohner S, Jakobik V, Mihályi K, Soldi S, Vasileiadis S, Theis S, et al. Inulin-Type Fructan Supplementation of 3-to 6-Year-Old Children Is Associated with Higher Fecal Bifidobacterium Concentrations and Fewer Febrile Episodes Requiring Medical Attention. *The Journal of nutrition*. 2018;148(8):1300-8.
51. Drummey GD, Benson Jr JA, Jones CM. Microscopical examination of the stool for steatorrhea. *New England Journal of Medicine*. 1961;264(2):85-7.
52. Khatri I, Akhtar A, Kaur K, Tomar R, Prasad GS, Ramya TNC, et al. Gleaning evolutionary insights from the genome sequence of a probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Gut pathogens*. 2013;5(1):30.
53. Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry science*. 2004;83(7):1093-8.
54. Hua M-C, Chen C-C, Yao T-C, Tsai M-H, Liao S-L, Lai S-H, et al. Role of maternal allergy on immune markers in colostrum and secretory immunoglobulin A in stools of breastfed infants. *Journal of Human Lactation*. 2016;32(1):160-7.

55. Godínez-Hernández CI, Aguirre-Rivera JR, Juárez-Flores BI, Ortiz-Pérez MD, Becerra-Jiménez J. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2016;22(1).
56. Moreno-Vilet, L., Michel-Cuello, C., Mota-Santillán, A., González-Chávez, M. M., Grajales-Lagunes, A., & Ruiz-Cabrera, M. A. (2010). Obtention of a powder with high fructan content from *Agave salmiana*. In *Innovations in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries* (pp. 291-310). Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos AC, México.
57. Trigueros, D. E. G., Fiorese, M. L., Kroumov, A. D., Hinterholz, C. L., Nadai, B. L., & Assunção, G. M. (2016). Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*. *Biochemical engineering journal*, 110, 71-83.
58. J.M. Gancedo, M.J. Mazon, C. Gancedo, Kinetic differences between twointerconvertible forms of fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Biochem. Biophys.* 218 (2) (1982) 478–482.
59. J.M. Gancedo, C. Gancedo, Concentrations of intermediary metabolites in yeast, *Biochimie* 55 (2) (1973) 205–211.
60. Mousa, A. H., Wang, G., & Zhang, H. (2019). Production of lactic and acetic acids during fermentation of milk fortified with kiwi juice using *Saccharomyces boulardii* and *lactobacilli*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(4), 681-687.
61. Sanz Y, Collado MC, Haros M, Dalmau J. Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp.* 2004; 62:520-6.
62. Schneider SM, Girard-Pipau F, Filippi J, et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World J Gastroenterol.* 2005;11(39):6165–6169
63. Lohner, S., Jakobik, V., Mihályi, K., Soldi, S., Vasileiadis, S., Theis, S., ... & Decsi, T. (2018). Inulin-Type Fructan Supplementation of 3-to 6-Year-Old Children

- Is Associated with Higher Fecal Bifidobacterium Concentrations and Fewer Febrile Episodes Requiring Medical Attention. *The Journal of nutrition*, 148(8), 1300-1308.
64. Blehaut, H., Massot, J., Elmer, G. W., & Levy, R. H. (1989). Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 10(4), 353-364.
65. Elmer, G. W., Martin, S. W., Horner, K. L., Mcfarland, L. V., & Levy, R. H. (1999). Survival of *Saccharomyces boulardii* in the rat gastrointestinal tract and effects of dietary fiber. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1), 29-34.
66. Kabbani, T. A., Pallav, K., Dowd, S. E., Villafuerte-Galvez, J., Vanga, R. R., Castillo, N. E., ... & Kelly, C. P. (2017). Prospective randomized controlled study on the effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and amoxicillin-clavulanate or the combination on the gut microbiota of healthy volunteers. *Gut microbes*, 8(1), 17-32.
67. S. J. Lewis & K. W. Heaton (1997) Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32:9, 920-924
68. Closa-Monasterolo, R., Ferré, N., Castillejo-DeVillasante, G., Luque, V., Gispert-Llaurado, M., Zaragoza-jordana, M., ... & Escribano, J. (2017). The use of inulin-type fructans improves stool consistency in constipated children. A randomised clinical trial: pilot study. *International journal of food sciences and nutrition*, 68(5), 587-594.
69. Boddy AV, Elmer GW, McFarland LV, Levy RH. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. *Pharm Res* 1991; 8: 796–800.
70. Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270.
71. Langdon, A., Crook, N., & Dantas, G. (2016). The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome medicine*, 8(1), 39.
72. Iizumi, T., Taniguchi, T., Yamazaki, W., Vilmen, G., Alekseyenko, A. V., Gao, Z., ... & Blaser, M. J. (2016). Effect of antibiotic pre-treatment and pathogen challenge on the intestinal microbiota in mice. *Gut pathogens*, 8(1), 60.

73. Moreno-Vilet, L., Garcia-Hernandez, M. H., Delgado-Portales, R. E., Corral-Fernandez, N. E., Cortez-Espinosa, N., Ruiz-Cabrera, M. A., & Portales-Perez, D. P. (2014). In vitro assessment of *Agave* fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *International journal of biological macromolecules*, 63, 181-187.
74. Castagliuolo I, LaMont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun*. 1996;64(12):5225–5232.
75. Hudson, L. E., McDermott, C. D., Stewart, T. P., Hudson, W. H., Rios, D., Fasken, M. B., ... & Lamb, T. J. (2016). Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PloS one*, 11(4), e0153351.
76. Breves G, Faul K, Schroder B, Holst H, Caspary WF, Stein J. Application of the colon-simulation technique for studying the effects of *Saccharomyces boulardii* on basic parameters of porcine cecal microbial metabolism disturbed by clindamycin. *Digestion*. 2000; 61(3):193–200.
77. More, M. I., & Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and experimental gastroenterology*, 8, 237.
78. Cáceres, P., Montes, S., Vega, N., Cruchet, S., Brunser, O., & Gotteland, M. (2010). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on acute respiratory infections and intestinal secretory IgA in children. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 5(04), 353-362.
79. Walton, G. E., Lu, C., Trogh, I., Arnaut, F., & Gibson, G. R. (2012). A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutrition journal*, 11(1), 36.
80. Bienes Y Servicios. Método Para La Cuenta De Bacterias Aerobias En Placa. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 12 de diciembre de 1995.

81. Bienes Y Servicios. Método Para La Cuenta De Mohos Y Levaduras En Alimentos. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 10 de mayo de 1995.

82. Bienes Y Servicios. Método Para La Determinación De Salmonella En Alimentos Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 22 de septiembre de 1995.

83. Bienes Y Servicios. Método Para La Cuenta De Microorganismos Coliformes Totales Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 10 de mayo de 1995.

## 10.2 ANEXO 3. Consentimiento informado.



### CONSENTIMIENTO INFORMADO

FOLIO: \_\_\_\_\_

#### .IDENTIFICACION DEL PROTOCOLO

Título del proyecto: "Evaluación del efecto sinbiótico de la cepa *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 con *A. salmiana* sobre la microbiota intestinal de niños con y sin Amoxicilina-clavulanato."

Investigador responsable: Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Alumno de maestría: Miguel Ángel Álvarez Zapata

Teléfono: 826 24 40 ext 6591, Celular: 444 444 09 19

Celular: 444 329 29 63

#### I. INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos de amplio espectro afecta el tipo de microorganismos del tracto gastrointestinal, alterando los beneficios de los microorganismos que habitan en nuestro intestino. El uso de probióticos, microorganismos buenos que en concentraciones adecuadas generan beneficios y prebióticos, tales como la fibra, es una alternativa para mantener el equilibrio de los microorganismos y estimular la generación de algunos beneficios como aumento de las defensas.

#### II. OBJETIVO

Evaluar los cambios en la microbiota intestinal y respuesta inmune en niños que acuden a consulta médica, a los cuales se les dará seguimiento con y sin antibiótico Amoxicilina-clavulanato y el uso de un sinbiótico conformado por: *S. boulardii* y *A. salmiana*, según el manejo clínico de su estado de salud.

Yo (padre o tutor) \_\_\_\_\_ voluntariamente acepto que mi hijo (a nombre) \_\_\_\_\_ participe en el estudio, cuyo propósito es estudiar tres muestras de heces (antes y después de tres semanas de ingerir el sinbiótico).

#### V. PROCEDIMIENTOS

La intervención consistirá en la realización de una encuesta al padre o tutor para recolectar información general. Se integrarán 4 grupos de estudio según el manejo clínico de sus estado de salud, la asignación del grupo será decisión del médico, lo cual no afectará en la evolución y manejo del paciente. Para la evaluación de los efectos se requerirá una muestra no invasiva de heces fecales, el material e implementos se proporcionarán al inicio del estudio, la muestra se recolectará los días 0 (día de la intervención), 7 y 21 días después de la intervención. Dicha muestra se llevará a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí en donde se realizarán, estudios específicos, los resultados de dichos estudios se entregarán sin costo alguno al familiar del paciente al término del proyecto. Toda esta información será resguardada por el responsable del proyecto.

#### I. RIESGOS

En el proyecto existen riesgos mínimos en los participantes. El material biológico será una muestra de heces fecales, la cual se coleccionará en el momento que los familiares considere adecuado. La recolección de la muestra no se realizará bajo ningún estímulo de la evacuación ni procedimientos invasivos. En caso de que sus hijos presenten diarrea secundaria al consumo del sinbiótico deberá suspender de inmediato y notificar para informar cómo proceder.

#### II. ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si usted decide no participar en el estudio, el seguimiento el trato de su hijo(a) por parte del médico tratante será el mismo, en cumplimiento al artículo 20 de la Ley General de Salud en materia de investigación.

#### III. CONFIDENCIALIDAD.

Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre ni el de mi hijo(a) serán mencionados en el reporte del estudio.

#### IV. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

Los resultados de los estudios realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP serán entregados sin costo alguno al familiar del paciente al término del proyecto.

#### X. DERECHO A ABANDONAR EL ESTUDIO

El familiar o tutor puede decidir en cualquier momento abandonar el estudio sin que esto signifique una disminución en la calidad de la atención que recibirá.

#### C. COSTOS PARA EL PACIENTE/REEMBOLSO DE GASTOS

El proyecto se desarrollará con recursos independientes por lo que el material y equipo necesario para dicho proyecto no generará gasto alguno para familiares o instituciones participantes.

Este proyecto está en cumplimiento a los **artículos 20 y 21 de la Ley General de Salud en materia de investigación.**

#### VI. LUGAR, FECHA Y FIRMAS

San Luis Potosí, S.L.P. a \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año 2018.

Padre o tutor del Escolar

Testigo 1

Testigo 2

### 10.3 ANEXO 4. Asentimiento informado.



FOLIO: \_\_\_\_\_

#### ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES

ola mi nombre es Fidel Martínez y trabajo en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí en la ciudad de San Luis Potosí.

amos a realizar un estudio que se llama: **“Evaluación del efecto sinbiótico de la cepa *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 con *Agave salmiana* sobre la microbiota intestinal de niños con y sin Amoxicilina-avulanato.”** Para saber cuántos niños/as que después de tomar su medicamento para la garganta, tienen problemas en su pancita.

ara ello necesitamos, conocer los bichitos que se tiene tu popo, para poderle decir a tus papás o Doctor, y de esta forma evitar que el malestar en tu pancita se vuelva a repetir después de que tomes tu medicina. Por ese motivo quiero saber si te gustaría participar en este estudio. Una vez que tú aceptes participar, se invertirá con tus papás o apoderados para que ellos sepan de este estudio.

o tienes que contestar ahora lo puedes hablar con tus padres y si no entiendes algo puedes preguntar cualquier cosa las veces que quieras y yo te explicaré lo que necesites.

decides no participar en el estudio no pasara nada y nadie se enojará. Tampoco será motivo para que no tomes la medicina que te receto el Doctor.

decides participar:

- Le pediremos a tu mamá o a la persona que te cuida que cuando vayas al baño guarde un poco de tu caca en unos frasquitos que yo les daré, esto no te causará ningún dolor ni molestia.
- Las muestras las llevaremos a la Universidad para estudiarlas, no usaremos tu nombre ni datos personales, es decir, nadie más que nosotros sabrá de quienes son las muestras. Tampoco le diremos a nadie que estas participando en este estudio.
- Los resultados de los bichitos en tu popo, se los daremos a tus padres o apoderados en un sobre cerrado nadie más sabrá el resultado de estos.
- Si quieres participar, haz un círculo o una marca al dibujo del dedo apuntando hacia arriba y si no quieres, haz la marca en el dedito apuntando para abajo. Con esos bastará para que nosotros sepamos tu referencia.

o: \_\_\_\_\_

SI quiero participar



NO quiero participar



firma del Investigador Responsable: \_\_\_\_\_

r. Fidel Martínez Gutiérrez

#### 10.4 ANEXO 5. Modelo de Biorreactor anóxico utilizado.

