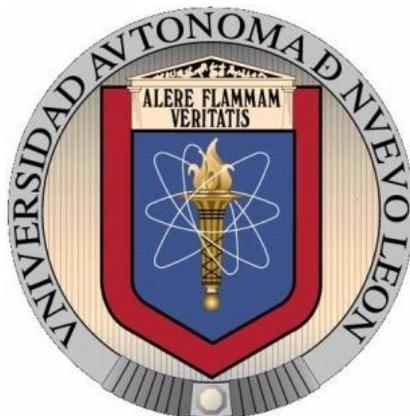


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“INOCUIDAD TISULAR DE LA REUTERINA AISLADA PARCIALMENTE
DE *Lactobacillus reuteri*, EN RATONES C57BL/6”**

POR

SERGIO FRANCISCO DE LA GARZA GUAJARDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ODONTOPEDIATRÍA**

NOVIEMBRE, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“INOCUIDAD TISULAR DE LA REUTERINA AISLADA PARCIALMENTE
DE *Lactobacillus reuteri*, EN RATONES C57BL/6”**

POR

SERGIO FRANCISCO DE LA GARZA GUAJARDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. ERANDI ESCAMILLA GARCÍA**

NOVIEMBRE, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado de Odontología Infantil de la Facultad de Odontología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por brindarme la oportunidad de lograr una formación académica completa en el ámbito clínico y científico.

A las Unidades de: Odontología Integral y Especialidades (UOIE), de Bioimagen (UB), de Modelos Biológicos y de Bioética del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), UANL por brindarme tiempo y dedicación para lograr el desarrollo de este estudio. Especialmente a la Dra. Erandi Escamilla García por el asesoramiento y apoyo en la divulgación de este trabajo, y así mismo al Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez por compartir su experiencia clínica y científica, al MVZ. José Herrera De la Rosa en conjunto con el Dr. Mario A. Guzmán García por su asesoramiento y apoyo en el manejo del modelo biológico y no por menos al Dr. Eloy Cárdenas Estrada que nos brindó hasta el último momento de su tiempo para finalizar este proyecto, descanse en paz. Estamos muy agradecidos con la Dra. Rocío Ortiz López por facilitarnos los ratones C57BL/6 para el desarrollo de este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo de la beca otorgada y al contribuir con el desarrollo académico de estudiantes y universidades que promueven el desarrollo de la ciencia y tecnología en este país.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	I
LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general	
3.1.1 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES.....	15
4.1 Biofármacos: medicamentos de la biotecnología.....	15
4.1.1 Clasificación.....	16
4.1.2 Fármacos utilizados en el área odontológica	19
4.2 Generalidades de los Probióticos.....	21
4.2.1 Metabolismo.....	21
4.2.2 Beneficios de las bacterias lácticas en la salud.....	22
4.2.2.1 Restablecimiento de la flora intestinal.....	22
4.2.2.2 Inhibición de la formación precoz de cáncer de colon.....	24
4.2.2.3 Prevención de enfermedades cardiovasculares.....	24
4.2.2.4 Cavidad oral.....	25
4.2.2.5 Respuesta inmunológica.....	26
4.2.3 Seguridad en el uso y consumo de las bacterias lácticas.....	26
4.3.4 <i>Lactobacillus reuteri</i> : Generalidades.....	27
4.3.5 Reuterina.....	29
4.3 Toxicidad.....	31
4.3.1 Ensayos <i>in vitro</i> en líneas celulares.....	32

4.3.2 Toxicidad Oral Aguda.....	33
4.3.3 Inflamación.....	35
4.4 Ensayos clínicos.....	38
4.4.1 Modelo animal.....	38
4.4.2 Ensayos en humanos.....	39
5. MÉTODOS.....	40
5.1 Cultivo de <i>Lactobacillus reuteri</i> y producción de Reuterina.....	40
5.2 Cuantificación de Reuterina.....	41
5.3 Prueba de toxicidad aguda de la Reuterina por vía oral.....	41
5.3.1 Determinación de toxicidad aguda.....	41
5.4 Estudio in vivo en ratones C57BL/6	43
5.4.1 Manipulación y acondicionamiento.....	43
5.4.2 Administración de la Reuterina.....	43
5.5. Evaluación in vitro de toxicidad aguda de la Reuterina.....	44
5.5.1 Análisis macroscópico de órganos.....	44
5.6 Procesamiento de tejidos y método de tinción.....	45
5.7 Documentación microscópica: Análisis Histopatológico.....	45
5.8 Análisis estadístico.....	46
6. RESULTADOS	46
6.1 Reporte de caso	46
6.2 Toxicidad de la Reuterina.....	48
6.2.1 Análisis cualitativo de órganos.....	48
6.2.2 Morfología microscópica de tejidos	50
6.2.3 Evaluación del daño de inflamación en los órganos.....	52
7. DISCUSIÓN.....	54
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
9. LITERATURA CITADA	60
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	71
APÉNDICES.....	72
PROGRAMA DE CAPTURA DE DATOS.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Clasificación de Productos Biológicos según la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	17
II. Clasificación de fármacos y biofarmacos según su origen (síntesis química, biológica), eficiencia, respuesta inmunológica, efectos secundarios y rendimiento.....	18
III. Fármacos y Biofármacos utilizados en odontología	20
IV. Bacterias probióticas que ayudan al restablecimiento de la flora intestinal durante el tratamiento de diarreas agudas y diarreas asociadas a la administración de antibióticos.....	23
V. Utilización de Probióticos en odontología.....	29
VI. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de la Reuterina.....	30
VII. Revisión de algunas de las aplicaciones de la Reuterina.....	31
VIII. Patrones histológicos de la inflamación que describen los cambios celulares e histológicos en respuesta a una acción física, mecánica o bien a una reacción producida por agentes químicos o biológicos	37
IX. Determinación de la dosis inicial según la guía clínica de Toxicidad Oral Aguda.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Toxicidad Oral Aguda - Fixed Dose Procedure con 1 animal por género y nivel de dosis según la OECD.....	35
2. Graficas que muestran el peso promedio de los ratones (gr) durante el periodo de estudio de 14 días. (A) Grupo control (agua destilada, □): <i>sujetos de estudio</i> SES1, SES2 y SES3. (B) Grupo de estudio (90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL, ▨): SES4, SES5 y SES6. (C) Grupo de control interno (glicerol 250mM, ■): SES7, SES8 y SES9	47
3. Aspecto macroscópico general de los órganos seleccionados: Corazón, Hígado, Riñón y Pulmón del grupo control (Agua destilada), de control interno (Glicerol 250 mM) y de estudio (9 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL), durante la disección tóraco-abdominal	49
4. Análisis histopatológico en microfotografías de luz de Corazón (a, b, c), Hígado (d, e, f), Riñón (g, h, i) y Pulmón (j, k, l), con tinción H y E del grupo control (agua destilada), grupo de control interno (glicerol 250mM) y grupo de estudio (9 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL)	51
5. Puntuación promedio del daño de inflamación, evaluado por tres investigadores independientes, a los ratones de los grupos control (agua destilada), de control interno (glicerol 250 mM) y de estudio (9 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL), en tejido de los órganos de estudio: Corazón (A), Hígado (B), Riñón (C) y Pulmón (D). La calificación máxima asignada es de 20	53

NOMENCLATURA

<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias ácido lácticas
C57BL/6	Ratón negro cepa C57, 6 semanas
μL, mL, L	Microlitros, Mililitro, Litro
N	Muestra total
<i>P</i>	Indica la diferencia significativa
H/E	Tinción Hematoxilina/Eosina
rmp, min, h	Revoluciones por minuto, minuto, hora
NaCl	Cloruro de sodio
MRS, TS	Man Rogosa y Sharpe, Trypticaseína de Soya
mM, g, kg	Milimolar, gramo, kilogramo
DO	Densidad Óptica
nm, μm, cm ²	Nanómetro, Micrómetro, centímetro cuadrado
Ph	Potencial Hidrógeno
Cbp	Excipiente o sustancia inactiva para incorporar el principio activo (Cuanto Basta Para).
±, X ²	Desviación estándar (SD), Distribución de Pearson
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
®	Marca registrada
CHX	Clorhexidina
3-HPA	3-Hidroxi-propionaldehído
°C	Grados Centígrados
H ₂ , CO ₂ , N ₂	Hidrógeno, Bióxido de Carbono, Nitrógeno
w/v	Weight/Volume ratio (relación peso/volumen)
24G	24 Gauges, calibre de longitud para agujas hipodérmicas
40X, 100X, 200X, 400X	Indica las magnificaciones microscópicas
E, LC, CR, SA, C.	Eritrocitos, Laberinto tubular, Corpúsculo renal, Septos alveolares, Capilar
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
UANL / FO	Universidad Autónoma de Nuevo León / Facultad de Odontología

TESISTA: CD. SERGIO FRANCISCO DE LA GARZA GUAJARDO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ERANDI ESCAMILLA GARCÍA

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

ESTUDIO DE INOCUIDAD TISULAR DE LA REUTERINA AISLADA DE
Lactobacillus reuteri, EN RATONES C57BL/6

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Sustancias análogas de las bacterias lácticas y con actividad biológica importante, resultan interesantes y son estudiadas como alternativa de futuros biofármacos.

OBJETIVO: En este estudio, la toxicidad aguda de la reuterina aislada parcialmente de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 por cromatografía en columna es evaluada *in vivo*.

METODOLOGÍA: Una muestra de 9 ratones machos C57BL/6 se dividió en tres grupos. En el grupo de estudio, a dos ratones se les administró una dosis única vía oral por sonda de 9 mg y a un tercero de 60 mg de reuterina/gr peso corporal/mL equivalente a 300 y 2000 mg/kg de peso corporal humano, con 300 µL de excipiente (cbp). Un grupo de control interno fue considerado en la administración de glicerol 250 mM, mientras que al grupo control agua potable. Posterior a 14 días en observación se realizó el diagnóstico clínico. Para la evaluación histopatológica de los órganos diana (corazón, pulmón, hígado y riñón) se prepararon cortes histológicos teñidos con H/E y se analizaron con microscopia de campo claro. Mediante un ensayo doble ciego, se determinó mediante un método semicuantitativo el proceso inflamatorio en los órganos mencionados.

RESULTADOS: La diferencia de pesos corporales entre los tres grupos no fue significativa ($p < 0.05$). Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los órganos estudiados exhibieron un patrón normal correlacionando con las descripciones de órganos sanos en la literatura. Tras la administración de reuterina, el score de inflamación calculado para los tejidos pulmonar 1.33 (± 2.06), hepático 0.44 (± 1.33), cardiaco 0.13 (± 0.35) y renal 0.0, tuvo un índice de concordancia muy alto entre los tres observadores, por tanto, diferencias en el infiltrado celular, hemorragia, necrosis y edema no fueron significativas ($p < 0.05$). En cambio, la administración oral de una solución de glicerol 250 mM, indujo un

proceso inflamatorio mayor en los tejidos pulmonar, hepático y cardiaco cuyas puntuaciones de inflamación calculados fueron 7.13 ± 5.51 , $0.88 (\pm 1.64)$ y $0.33 (\pm 0.01)$ respectivamente. No se observó efecto inflamatorio en el tejido renal. La concordancia entre los tres observadores fue alta.

CONCLUSIONES: Los resultados sugieren que la reuterina es una sustancia segura para su administración al no presentar evidencias de proceso de inflamación en ningún órgano de estudio, lo cual puede traer beneficios potenciales para la salud humana dada su actividad biológica. Estudios de caracterización biológica continúan en curso.

TESISTA: CD. SERGIO FRANCISCO DE LA GARZA GUAJARDO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ERANDI ESCAMILLA GARCÍA

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

STUDY OF TISSUE SAFETY OF THE REUTERINE ISOLATED FROM *Lactobacillus reuteri*, IN MICE C57BL/6

ABSTRACT

INTRODUCTION: Analogous substances of the lactic bacteria and with important biological activity, are interesting and are studied as an alternative of future biopharmaceuticals.

OBJECTIF: In this study, the acute toxicity of reuterin partially isolated from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by chromatography column is evaluated *in vivo*.

METHODS: A sample of 9 male C57BL/6 mice was divided into three groups. In the study group, two mice were administered a single dose orally by a 9 mg tube and a third dose of 60 mg of reuterin / gr body weight / mL equivalent to 300 and 2000 mg/kg of human body weight, with 300 μ L of excipient (cbp). The internal control group was given 250 mM glycerol, while the control group was water. After 14 days of observation, a clinical diagnosis was made. For the histopathological evaluation of the target organs (heart, lung, liver and kidney) histological sections stained with H/E were prepared and analyzed with light field microscopy. By means of a double-blind trial, the inflammatory process in the aforementioned organs was determined semiquantitatively. The morphological characteristics, both macroscopic and microscopic, of the organs studied exhibited a normal pattern correlating with the descriptions of healthy organs in the literature.

RESULTS: The difference in body weights between the three groups was not significant ($p < 0.05$). After the administration of reuterin, the inflammation score calculated for lung tissues 1.33(\pm 2.06), hepatic 0.44(\pm 1.33), cardiac 0.13(\pm 0.35) and renal 0.0, had a high concordance index among the three observers, therefore, differences in cellular infiltrate, hemorrhage, necrosis and edema were not significant ($p < 0.05$). On the other hand, with the

oral administration of a 250 mM glycerol solution, it induced a greater inflammatory process in the pulmonary, hepatic and cardiac tissues whose calculated inflammation scores were $7.13(\pm 5.51)$, $0.88(\pm 1.64)$ and $0.33(\pm 0.01)$ respectively. No inflammatory effect was observed in the renal tissue. Again here the agreement between the three observers was high.

CONCLUSIONS: The results suggest that reuterin is a safe substance for its administration since it does not show evidence of the inflammation process in any organ of study, which can bring potential benefits for human health given its biological activity.

1. INTRODUCCIÓN

Idealmente, se requiere que cualquier agente antimicrobiano o antiséptico utilizado sea capaz de modificar un entorno al ser efectivo contra los patógenos causantes de infecciones localizadas sin alterar la flora normal. En cuanto a la higiene oral respecta, la boca es una de las áreas más difíciles de tratar, especialmente por la estructura y forma de la cavidad oral así como a la distribución de cada una de las piezas dentales. Si a esto le agregamos la utilización temporal o permanente de algún aparato correctivo como los comúnmente prescritos en ortodoncia; la higiene oral se convierte en una tarea más complicada de realizar y menos efectiva por el alcance que tiene la acción mecánica del cepillado o uso de hilo dental.

El paciente adulto como el infantil requiere una orientación del profesional sobre los procedimientos y la selección de los productos de salud oral más adecuados para sus necesidades y edad. Al recomendar un producto de higiene oral, el odontólogo no sólo debe tener en cuenta su eficacia, sino que también debe conocer la composición del producto y los efectos adversos.

El profesional en odontología infantil no prescribe fácilmente algún tipo de agente antibacteriano a su paciente infantil, precisamente por los daños no solo en las mucosas sino en la supresión indiscriminada de la microbiota oral que podría ocasionarle al niño y que no es deseable que ocurra. Ejemplo de algunos productos que contienen clorhexidina (CHX), xilitol e incluso alcohol, como el Perioxidín® que contiene CHX. Sin embargo y a excepción de algún tratamiento, se puede prescribir la utilización puntual de algún producto bajo la supervisión de un adulto.

Las bacterias ácido lácticas o Probióticos en paralelo, son efectivas en la supresión del crecimiento de bacterias nocivas tipo bacteroides y coliformes, modulando así el sistema inmune del huésped además de tener una fácil distribución y absorción en el cuerpo beneficiando la salud del individuo. Estudios *in vitro* han demostrado la eficacia de *Lactobacillus reuteri* en la inhibición de patógenos orales, sino también en la disminución del contenido de colesterol en sangre, e inhibición de *Helicobacter pylori* mediante la regulación de genes. El amplio espectro de actividad biológica de *L. reuteri*, se le atribuye a la reuterina, una sustancia de bajo peso molecular producida durante su metabolismo y con

aplicaciones prometedoras para contrarrestar el desarrollo de patógenos causantes de infecciones e incluso actuando sobre la expresión de genes de virulencia

El tamaño y peso de las moléculas son punto clave para su clasificación dado que ello determinará la solubilidad, disolución, transporte y el grado de reconocimiento por el sistema inmune, sin olvidar su permeabilidad en el tracto intestinal para alcanzar una absorción y biodisponibilidad.

2.- HIPÓTESIS

La reuterina producida por la bacteria probiótica *Lactobacillus reuteri* es una molécula segura de administrarse en dosis única en ratones C57BL/6.

H₀: La administración oral de reuterina presenta niveles de toxicidad aguda en los órganos de estudio.

H_a. La administración oral de reuterina es inocua en los órganos de estudio.

3.-OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Establecer la toxicidad aguda de la reuterina aislada parcialmente de *L. reuteri*, para determinar su seguridad tras la administración oral de una dosis única en ratones C57BL/6.

3.1.1 Objetivos específicos

in vivo

1.- Evaluar clínicamente la toxicidad de la reuterina a través del Formato de Reporte de Caso de cada modelo biológico.

in vitro

Evaluación del efecto toxicológico de la reuterina mediante:

2.- Un análisis anatomopatológico macroscópico de corazón, hígado, riñón y pulmón, utilizando estereomicroscopía.

3.- El estudio histopatológico de los órganos estudiados, utilizando microscopía de campo claro.

4. ANTECEDENTES

4.1 Biofármacos: medicamentos de la biotecnología

La palabra biotecnología tiene su origen etimológico en los términos *bios*, que significa todo lo relacionado con la vida, y *technikos*, que implica el conocimiento y las habilidades humanas. La Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE, 2013) define a la biotecnología como *la aplicación de los principios científicos y de ingeniería para el tratamiento de materiales por agentes biológicos*.

El uso de organismos vivos para producir elementos con actividad biológica puede hacerse mediante levaduras, hongos y bacterias, o bien de sustancias naturales como enzimas, aminoácidos o proteínas producidas en los microorganismos, en lugar de recurrir a la síntesis química tradicional (Kumar and Singh, 2014). De esta manera, la biotecnología permite mediante el uso de sistemas y procesos biológicos y biomoleculares el uso de productos biológicos útiles para mejorar la calidad de vida y la salud de la población (Trosset, Carbonell, 2015). En la actualidad, existen disponibles más de tres mil productos biotecnológicos útiles para la salud humana, entre los que se encuentran antibióticos, vacunas utilizadas en la actualidad, así como también el uso de la tecnología del ADN recombinante (producido en el laboratorio por combinación artificial de secuencias de ADN producidas naturalmente) para el desarrollo fármacos o procedimientos de diagnóstico (Pranchevicius, Vieira 2013; Liu et al., 2016). De aquí es que se pueden ofrecer soluciones terapéuticas y clínicas únicas personalizadas e individualizadas para una gran variedad de enfermedades graves y crónicas que afectan claramente la calidad de vida del paciente y en patologías con terapéutica compleja (Franco and Savio, 2008).

La biotecnología aplicada a la medicina busca opciones terapéuticas y soluciones biotecnológicas aplicadas a la salud individual y colectiva. Actualmente, esta práctica beneficia a más de 350 millones de pacientes en el mundo, mediante el uso de medicamentos biológicos en especial para el cáncer y enfermedades crónicas no transmisibles. También se enfoca en el desarrollo de terapias farmacológicas para enfermedades raras o de baja prevalencia, y se estima que afectan a más de cincuenta millones de personas en el mundo. La biotecnología médica se centra en las causas de las

enfermedades y no en los signos y síntomas aislados, por eso ofrece una alternativa adecuada para tratar las enfermedades de baja prevalencia (Stella P and Gold-von, 2014).

Estos medicamentos representan la frontera de la investigación biofarmacéutica. Los medicamentos biotecnológicos empleados en la actualidad se encuentran: *hormona del crecimiento, eritropoyetina, insulina, factor estimulador de colonias de granulocitos, interferones, anticuerpos monoclonales, bacterias ácido lácticas*, entre otras. Este cambio tecnológico representa el mayor reto para la medicina actual y un cambio en las políticas públicas en el acceso a estos nuevos medicamentos (González-Andrade, 2017).

4.1.1 Clasificación

El último informe de The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America menciona a más de 907 medicamentos biológicos que estaban bajo prueba, y destinados a tratar más de cien enfermedades (PhRMA, 2013). Por ejemplo, desórdenes sanguíneos, tratamiento de cáncer, desórdenes autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, diabetes, desordenes digestivos, condiciones oculares, desordenes genéticos, enfermedades infecciosas, VIH/SIDA, desordenes musculo-esqueléticos, enfermedades neurológicas, respiratorias, de la piel, trasplantes entre otras. Algunos de estos medicamentos biológicos incluyen: anticuerpos monoclonales, vacunas, vacunas terapéuticas, enfermedades de la sangre y productos sanguíneos para transfusión y/o fabricación de otros productos, terapias génicas y celulares (Camacho et al., 2014).

Los medicamentos se encuentran clasificados de acuerdo a sus productos biológicos y diferentes instancias de la salud como la Organización Mundial de la Salud (OMS) **Tabla I**, la Secretaria de Salud en México, y Comités de Ética que regulan la seguridad de los biofármacos y fármacos. Dentro de la misma rama farmacológica los fármacos seguirán siendo utilizados por las ventajas que poseen, teniendo más en cuenta la automedicación demandada por la sociedad. Las ventajas y desventajas se establecen de acuerdo a su síntesis biológica, eficiencia, respuesta inmunológica, efectos secundarios, costos de producción-venta (rendimiento) entre otros **Tabla II**.

Tabla I.
Clasificación de Productos Biológicos según la Organización Mundial de la Salud (OMS)
(OMS 2007)

PRODUCTOS BIOLÓGICOS	
1	Alérgenos
2	Citoquinas y factores de crecimiento
3	Enzimas
4	Derivados de plasma y sangre humana
5	Inmunoglobulinas (incluye anticuerpos monoclonales).
6	Sueros inmunes
7	Vacunas toxoides
8	Productos de la fermentación (incluye aquellos obtenidos por técnicas de ADN recombinante).
9	Oligonucleótidos (5'-3' y 3'-5')

Tabla II.

*Clasificación de fármacos y biofármacos según su origen (síntesis química, biológica),
fuerza, respuesta inmunológica, efectos secundarios y rendimiento
(Gonzalez-Andrade, 2017).*

CARACTERÍSTICAS	CONVENCIONAL	BIOLÓGICO
Producto	Basado en químicos	Basado en proteínas
Tamaño	Tienen una estructura simple y pequeña que se puede caracterizar con facilidad.	Tienen una estructura compleja, que va desde el tamaño intermedio al grande, y que caracteriza con dificultad.
Estructura molecular	Simple.	Compleja.
Caracterización	Puede ser caracterizado totalmente	No puede ser bien caracterizado.
Heterogeneidad	Homogéneos: todas las estructuras son idénticas y bien definidas y tienen una estructura/propiedades químicas predecibles; fáciles de reproducir exactamente	Heterogéneos: estructura mixta, propiedades y estructura biológicas menos predecibles; difíciles de reproducir exactamente.
Proceso de manufactura	Son producidos por un proceso sencillo de síntesis química, se puede producir en pocos días.	Son productos mediante en proceso de síntesis biológica usando células vivas modificadas a través de procesos de fermentación y purificación complejos, tienen ciclos de producción prolongados que duran semanas a meses.
Control de calidad	Se necesitan verificaciones de calidad a lo largo del proceso de fabricación y sobre el desempeño de producto final	Se necesitan verificaciones de calidad a lo largo del proceso de fabricación y sobre el desempeño del producto final.
Estabilidad	Generalmente estables durante periodos prolongados	Menos estables; los cambios en los procesos de fabricación, como temperatura alta o almacenamiento inadecuado, pueda llevar al deterioro del medicamento y afectar la seguridad y/o eficacia.
Almacenamiento y condiciones de manejo	Estable.	Sensible.
Inmunogenicidad	Es improbable que provoque una reacción inmunitaria en el cuerpo por su pequeño tamaño.	Es más probable que provoque una reacción inmunitaria en el cuerpo por su gran tamaño molecular y composición
Prescripción	Usualmente prescrito por el médico de cabecera o un médico de atención primaria.	Usualmente se utilizan para el tratamiento de enfermedades más graves y generalmente los recetan los especialistas.
Automedicación	A menudo se pueden auto administrar en domicilio.	A menudo se administran en el hospital con la ayuda del personal médico o se autoadministran mediante inyecciones subcutáneas
Copias del producto de referencia	Genérico: idéntico al producto de referencia.	Biosimilar: NO idéntico al producto de referencia
Costos de desarrollo estimados en US\$	-Molécula pequeña original (nueva droga): 1.3 billones. -Genérico: 1 a 4 millones.	-Molécula biológica original (droga innovadora): 1.2 billones -biosimilar: 100 a 250 millones

4.1.2 Fármacos utilizados en el área odontológica

La farmacoterapia en el ramo odontológico es muy amplia, y cada una de las especialidades odontológicas recomienda el uso de fármacos específicos que contribuyan a la mejoría del paciente. Existen biofármacos como los factores de coagulación indispensables para realizar un procedimiento quirúrgico en un paciente hemofílico y se utiliza en el área médica y dental, además requiere una intervención de médicos y odontólogos para poder realizar con efectividad el procedimiento.

Dentro de los fármacos comúnmente usados en el área de odontología se encuentran anestésicos, antibióticos, analgésicos esteroideos y no esteroideos, relajantes musculares, antifúngicos, antivirales. Mientras que por el lado de los biofármacos como el factor de coagulación, la hormona de crecimiento, eritropoyetina, insulina, factor estimulador de colonias de granulocitos, interferones y , anticuerpos monoclonales, que mismo si no son prescritas por un odontólogo sino por un especialista médico, son tratamientos que impactarán en el tratamiento dental y viceversa **Tabla III.**

Otra alternativa de biofármacos es la utilización de **bacterias ácido lácticas**, que se están dirigiendo a abordar alternativas de la lucha contra enfermedades infecciosas, con menos efectos colaterales que los fármacos convencionales (Bruno G *et al.*, 2018), y también ayuda en el tratamiento de trastornos que parecen no tener nada que ver con las bacterias, tales como la obesidad o niveles altos de colesterol (Jones *et al.*, 2012). Desde el punto de vista de muchos investigadores nos han demostrado que los probióticos incluyen tratamientos en la prevención y también pueden mejorar el estado de pacientes con trastornos médicos, como diarrea, gastroenteritis, síndrome de intestino corto, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer, estados inmunosupresores, alergias pediátricas, retraso del crecimiento, hiperlipidemia, enfermedades hepáticas, infecciones con *Helicobacter pylori* e infecciones del tracto genitourinario (Bruno G *et al.*, 2018). Durante la última década, el uso de probióticos ha ganado interés dentro de la comunidad odontológica, desarrollando estudios con enfoque en la reducción de la incidencia de caries dental, mejorar el pronóstico de la periodontitis, desaparecer la halitosis e infecciones como la candidiasis oral (Singh *et al.*, 2013).

Tabla III.

Fármacos y Biofármacos utilizados en Odontología (Pediamecum, 2015)

CATEGORÍA	FAMILIA/COMPONENTE ACTIVO/MARCA	EFECTOS ADVERSOS
FÁRMACOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anestésicos Local: <i>Mepivacaina, Scandonest</i> 2. Bactericida: <i>Amoxicilina+AC</i> <i>Amoxiclav</i> 3. Colesterol y Triglicéridos: enzima semisintéticas y sintéticas, <i>Atrovastatina, Cardyl</i> 4. Analgésico No Esteroideo: <i>Ibuprofeno, Motrin</i> 5. Antiviral: <i>Aciclovir, Zorvirax</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hipersensibilidad por IgE 2. Niños que han recibido penicilinas o macrólidos durante el primer año de vida, niños de 3 años presentan o son propensos a tener un alto riesgo de HMI (<i>Wuollet et al., 2016</i>). 3. Trastornos gastrointestinales, del sistema nervioso, Piel y anejos 4. Trombocitopenia y neutropenia, Enterocolitis necrosante, Displasia broncopulmonar y hemorragia pulmonar entre otros. 5. Cefalea, mareo, diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal (oral).
BIOFÁRMACOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Factor de Coagulación IX <i>Christmas factor IX humano purificado de la coagulación, Mononine</i> 2. Probióticos <i>Lactobacillus reuteri</i> (PeriobalanceR) 3. Inmunosupresor <i>Rapamicina, Sirolimus</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. No datos específicos en niños. Entre otros <i>Trastornos vasculares</i>: existe un riesgo potencial de episodios tromboembólicos. 2. No se han mostrado efectos secundarios. 3. Neoplasias benignas, malignas y no especificadas: cáncer de piel. Trastornos de la sangre y del sistema linfático: trombocitopenia, anemia, púrpura Trombocitopénica trombótica/síndrome hemolítico urémico, leucopenia, neutropenia.

4.2 Generalidades de los Probióticos

La Organización Mundial de la Salud define a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, brindan un beneficio a la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2000; Stanton *et al.*, 2001), y están conformados por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados. La energía la obtienen por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal de su metabolismo (Madigan, *et al.*, 2004). Los probióticos del género de bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium* viven en la micro flora de los hospedadores quienes se ven beneficiados al realizar un balance de su flora intestinal suprimiendo el crecimiento de bacterias nocivas de tipo bacteroides y coliformes principalmente (Gibson and Fuller, 2000; Reid and Hammond, 2005). El balance en la flora intestinal es el resultado de uno de los mecanismos de acción con los que cuentan las bacterias probióticas, modulando el sistema inmunológico y mejorando así la respuesta inmune del huésped. Los responsables de mantener el balance o la modulación del sistema inmunológico se atribuyen precisamente a los productos primarios antagónicos con actividad biológica que sintetizan las BAL, en respuesta al metabolismo durante su crecimiento.

Las BAL cuentan con la capacidad de sobrevivencia y estabilidad a factores de acidez o ácidos biliares propios del intestino (Kosin and Rakshit, 2006; Patel *et al.*, 2006), a la termoestabilidad para su procesamiento y conservación sin olvidar la forma y el vehículo de administración (Sanders *et al.*, 2010; Klaenhammer, 1998). Éste último, debe permitir tanto a los probióticos y/o a sus productos; cumplir con la actividad biológica.

4.2.1 Metabolismo

Los ácidos orgánicos como el láctico, ácido cítrico, succínico, acético, glutámico (Zalán *et al.*, 2010; Fernández KJ *et al.*, 2014), son ejemplos de algunos productos sintetizados durante el metabolismo. Algunos otros productos son péptidos, o las denominadas bacteriocinas del tipo polipéptidos o proteínas, que al igual que los ácidos orgánicos cuentan con una actividad antimicrobiana la cual confiere una competencia efectiva hacia la unión y los sitios de colonización de las bacterias patógenas; evitando la

propagación y daño al organismo del huésped (Zacharof and Lovitt, 2012; Singh *et al*, 2013). La acción antimicrobiana ocurre por diversos factores como el efecto antagonista de forma no disociada, viéndose reflejado en la caída del pH, en la disminución del potencial oxido-reductor y por ende, en la inhibición o bloqueo de algunas reacciones enzimáticas propias (fosforilación oxidativa por citar un ejemplo), del desarrollo de microorganismos ácido-sensibles como bacterias de tipo Gram positivo/negativo, como también salmonelas, mohos y levaduras tipo *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y algunas especies de *Bacillus* (Baca-Castañón ML *et al.*, 2015; Jeevaratnam *et al.*, 2005).

4.2.2 Beneficios de las bacterias lácticas en la salud

4.2.2.1 Restablecimiento de la flora intestinal

La microflora gastrointestinal (microbiota) es un ecosistema sumamente complicado que coexiste en el equilibrio con el hospedador. Cuando este equilibrio es afectado, el desequilibrio clínico puede establecer enfermedades gastrointestinales como diarrea, úlceras, inflamación del intestino, colitis mucosa y en su defecto cáncer de colon. La estabilidad y composición de la flora intestinal juega un papel extremadamente importante en la buena salud y el bienestar del ser humano desde el nacimiento. A fin de mejorar el ambiente microbiano intestinal, investigaciones de efectividad de los probióticos en la prevención y el tratamiento de condiciones médicas son realizadas. Ejemplo de ello, la leche materna que proporciona la mejor protección en contra de enfermedades gastrointestinales en infantes. Saran y colaboradores (2002) implementaron un estudio en el cual incluyeron probióticos en leche de vaca para imitar las condiciones en el desarrollo inmunológico como lo hace la leche materna de forma natural, obteniendo una reducción del 50% de diarrea infecciosa aguda, al administrar la leche fermentada durante 6 meses. Otro ejemplo es el uso de leche fortificada con *B. lactis* HN019 que disminuye un 10% de la diarrea contagiosa además incrementar el contenido de hierro en sangre (Sazawal *et al.*, 2004). La efectividad de los probióticos en la prevención de este tipo de infecciones, se ve reflejada en su absorción, disminuyendo así la morbilidad por esta enfermedad. En la actualidad estudios que comprueban el efecto positivo del uso de probióticos para recuperar la flora intestinal en sus numerosas enfermedades **Tabla IV.**

Tabla IV.

Bacterias probióticas que ayudan al restablecimiento de la flora intestinal durante el tratamiento de diarreas agudas y diarreas

TRATAMIENTO DE LA DIARREA AGUDA INFANTIL		
Probiótico	Actividad biológica	Referencia
<i>Lactobacillus GG</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> Dosis: 10×10^{12} UFC/día	Acorta la duración de la diarrea en un día (<i>L. reuteri</i> sobre todo en GEA pro-rotavirus).	<i>Guandalini, 2008</i>
Cepa GG de <i>Lactobacillus casei</i> y cepa LAB SF68 de <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus bifidus</i>	Disminuye riesgo de diarrea a los 3 días (RR0,66 con IC95% 0.55-0.77) Disminuye la duración media de la diarrea a 30.48 horas (IC 95% 18.51 a 42.46 horas) Posible efecto adverso: vómitos	<i>Allen, et al., 2010</i>
PREVENCIÓN DE LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> o <i>Saccharomyces boulardii</i> Dosis: $>5 \times 10^9$ UFC/día	Previene la diarrea asociada a antibióticos con NNT 7 (IC95% 6-10)	<i>Johnston, et al., 2011.</i>

RS: Revisión sistemática, EC: Ensayo clínico, GEA: Gastroenteritis aguda, D: Dosis, L: *Lactobacillus*.UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

4.2.1.2 Inhibición de la formación precoz de cáncer de colon

Estudios *in vitro* e *in vivo* que incluyen el uso de probióticos, han mostrado efectos positivos en terapias para tratar el cáncer de colon. Ejemplo de ello es el estudio realizado por Desrouillères y colaboradores (2015), en el cual utilizan una leche fermentada con una mezcla probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2); mostrando la capacidad de la mezcla en la prevención de cáncer colorectal. Otras investigaciones enfocadas en la misma área, atribuyen el efecto antitumoral de las bacterias probióticas antes mencionadas y algunas del género *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis* y *B. brevis*) a actividades metabólicas en la microflora intestinal, de manera que cambian condiciones fisicoquímicas del colon, produciendo genes antimutagénicos o antitumorales que desplazan o remueven a genes carcinógenos, incrementando la inmunidad del hospedador (Thirabunyanon *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010). Cabe precisar que el efecto benéfico de las bacterias probióticas es dependiente de cada cepa.

4.2.1.3 Prevención de enfermedades cardiovasculares

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2011) considera que las enfermedades cardiovasculares son la causa principal a nivel mundial de morbilidad y mortalidad. En los Estados Unidos, una de cada tres muertes ocurre por el resultado de una enfermedad cardiovascular (ECV) y la mitad de estos es debido a las enfermedades de la arteria coronaria (EAC). Los costos estimados relacionados con las ECV y los accidentes cerebrovasculares alcanzaron un costo de casi \$300 mil millones de dólares en el año 2008, y se prevé que para el año 2030 se triplicarán los accidentes de este tipo (Roger *et al.*, 2012). Con lo que a México respecta, enfermedades crónicas en adultos, muestra una alza del 2.4% de pacientes con diagnóstico médico previo de diabetes del año 2006 al 2009 (ENSANUT 2016). Por otro lado, el 44.5% de los adultos reportaron haberse medido los niveles de colesterol en sangre y el 28.0% tener un diagnóstico médico previo de hipercolesterolemia, siendo el grupo más afectado el de adultos de 50 a 79 años de edad. En adolescentes de entre 12 y 19 años la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 72.5% en el año 2016. Las enfermedades cardiovasculares son progresivas comienzan en

la infancia y se manifiestan con el envejecimiento. Existen factores de riesgo que pueden ser modificables; adoptando hábitos alimenticios y de actividad física para una vida saludable y terapéutica (WHO 2007; Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). Dentro de las mismas características de un "estilo de vida saludable", un "estilo de vida dietético terapéutico" también forma parte del consumo de alimentos y suplementos que ayudan a mantener niveles saludables de colesterol y estén dentro del rango normal. Ejemplo de ello, Cardioviva® es una compañía americana, utiliza también una variedad de *L. reuteri* en sus productos (2×10^9 bacterias vivas) destinados a mantener la salud del corazón y evitar riesgo de diabetes.

4.2.1.4 Cavidad oral

La cavidad oral nos proporciona un entorno con una gran variedad de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y virus, y se encuentran asociadas con infecciones orales. Las bacterias son el componente predominante de esta microflora y la diversidad de especies que se encuentran en la cavidad oral reflejan los diferentes tipos de hábitat para su colonización y oportunidad de sobrevivir como biofilm. Sin embargo, el equilibrio entre esta microflora y el huésped puede ser interrumpido, lo que resulta el desarrollo de enfermedades de las estructuras orales produciendo caries dental, gingivitis, periodontitis, entre otras. Existen numerosos estudios clínicos que indican que los probióticos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden ejercer un efecto antagonista sobre el patógeno etiológico en la caries dental *Streptococcus mutans* (Sidhu *et al.*, 2015; Iniesta *et al.*, 2011).

Se han hecho intentos de combinar la limpieza dental profesional y el uso de agentes antibacterianos como el uso de probióticos, con el fin de amplificar el efecto inhibitor de patógenos orales y/o retardar el crecimiento (Baca-Castañón *et al.*, 2015; Allaker and Douglas, 2015). Hedayati-Hajikand y colaboradores (2015), determinaron que el uso de comprimidos masticables con ProBiora3® (combinado probiótico de *S. uberis* KJ2, *S. oralis* KJ3 y *S. rattus* JH145) en conjunto con el uso diario de pasta dental con fluoruro, disminuye la desmineralización temprana del esmalte; sin embargo el efecto en las lesiones

cavidades no fue el esperado. Lo cual sugiere que la aparición de la caries podría reducirse mediante la administración diaria de estos probióticos como adyuvantes del uso diario de pasta dental con fluoruro en niños en edad preescolar. BioGaia® por su parte, es una compañía sueca con productos innovadores que incluyen cepas de *L. reuteri* como suplemento metabólico en el balance de la flora microbiana bucal (Prodentis®). Las bacterias probióticas pueden favorecer la salud periodontal si son capaces de establecerse en el biofilm oral e inhibir el crecimiento de patógenos periodontales y su metabolismo (Allaker and Douglas 2015; Ashwin *et al.*, 2015).

4.2.2.5 Respuesta Inmunológica

El aumento de la población de microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal se debe a la suplementación de probióticos (Faseleh *et al.*, 2016), que gracias a sustancias producidas durante su metabolismo confieren un efecto positivo sobre la función del sistema inmune principalmente induciendo cambios en la expresión de citoquinas, especialmente en las células intestinales. Ejemplo de ello son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que absorbidos del intestino pueden afectar la expresión de los genes responsables de la producción de citocinas en el tejido de destino. Caso particular del butirato, capaz de inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias interferón (IFN)- γ e interleucina (IL)-2, en ganglios linfáticos mesentéricos de rata; de modo que la relación de IFN- γ a IL-10 medida en los ganglios mesentéricos se redujo en presencia de este compuesto (Langen *et al.*, 2009). Las bacterias ácido lácticas (BAL) son efectivas en la supresión del crecimiento de bacterias nocivas tipo bacteroides y coliformes, modulando así el sistema inmune del huésped además de tener una fácil distribución y absorción en el cuerpo beneficiando la salud del huésped (Gibson and Fuller, 2000; Stanton *et al.*, 2001; Reid and Hammond, 2005).

4.2.3. Seguridad en el uso y consumo de las bacterias lácticas

Lactobacillus se refiere al género de bacterias ácido láctica (BAL) Gram-positivo que incluye especies como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri* (Shahani and

Ayebo, 1980) por citar algunos ejemplos. El género *Lactobacillus* es generalmente reconocido como seguro (GRAS) (EFSA Scientific Committee, 2007) sin embargo, existen características que deben de cumplir las BAL para su utilización las cuales no se limitan únicamente a poseer una actividad biológica, sino también una viabilidad al momento de su consumo y la dosis o cantidad mínima suficiente para conferir un efecto benéfico en la salud fisiológica del hospedador humano o animal (Reid and Hammond, 2005). Durante las últimas décadas se han realizado estudios enfocados en el aprovechamiento de las características biológicas de las bacterias ácido lácticas (LAB) o probióticos, que van más allá de mantener el equilibrio en la flora intestinal; además de contar con una aceptación a nivel mundial dada su amplia gama de productos en los que se utilizan como suplementos o componentes de alimentos considerados funcionales (Papadimitriou K, et al., 2015).

4.2.5 *Lactobacillus reuteri*

L. reuteri fue originalmente descrita por Gerhard Reuter en 1980, como una especie heterofermentativa. Se encuentra frecuentemente localizada en el cuerpo de los mamíferos, incluidos el fluido vaginal, el tracto gastrointestinal e incluso en la leche materna (aislada en 1990) (Abrahamsson *et al.*, 2009). Al igual que con otras especies del género *Lactobacillus*, es una bacteria productora de ácido láctico por la conversión de lactosa (Shahani and Ayebo, 1980). *L. reuteri* ATCC 55730 es una bacteria láctica utilizada como probiótico en alimentos de consumo diario como la leche y yogurt (Jones *et al.*, 2009) incluyendo fórmulas infantiles como NAN-AR (<https://nestle-pediatria.cl/formula/nan-ar/16/>). Aunado a lo anterior, se encuentran otras presentaciones como leche líquida fermentada, leche liofilizada, gotas, pastillas masticables, chicles, enjuagues, además de encontrarlos en alimentos de consumo frecuente como quesos, carnes y pescados (Indrio *et al.*, 2014). *L. reuteri* forma parte de los microorganismos utilizados como probióticos no sólo en el área de alimentos sino también en el área médica, debido a que posee propiedades antimicrobianas de amplio espectro entre otras. Entre algunos beneficios se encuentran el mantenimiento de los niveles de colesterol, la reducción de niveles de *Helicobacter pylori* (la bacteria patógena que contribuye a las úlceras), disminución del desarrollo de bacterias odontopatógenas (Baca Castañón *et al.*, 2015), del tracto urinario femenino, en la salud vaginal y la salud gastrointestinal infantil (Reuter G, 2001).

Actualmente el interés creciente en el uso de los probióticos, confieren un beneficio de salud en el hospedador a realizar funciones metabólicas, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, específicamente relacionados con la hiper-colesterolemia. Algunos suplementos alimenticios como **LRC™ y Cardioviva** (Jones ML et al., 2012a; Jones ML *et al.*, 2012b) contienen cepas de *L. reuteri* capaces de interactuar y alterar benéficamente la flora gastrointestinal; así como también liberar moléculas que incluyen enzimas las cuales pueden mejorar la digestión, el metabolismo, e influir positivamente en el funcionamiento del sistema inmunológico (Sanders *et al.*, 2013). Recientemente, se demostró que *L. reuteri* (**Periobalance®**) disminuye el recuento de patógenos periodontales como *Aggregatibacter actinomycetem comitans*, *Campylobacter rectus* y de especies de *Capnocytophaga* y *Tannerella forsythia*, produciendo una reducción en los niveles de placa y de inflamación gingival en sujetos con gingivitis moderada a severa. La modulación inmune del huésped podría ser una posible explicación para su acción en la mejora del estado periodontal, puesto que no se han observado cambios en la microbiota oral o las propiedades de adhesión de la placa. Por otro lado, el consumo de *L. reuteri* reduce las citoquinas pro-inflamatorias en el fluido crevicular de adultos con inflamación gingival (Sidhu *et al.*, 2015 Allaker and Douglas 2015, Ashwin *et al.*, 2015; Madhwani and McBain 2011). En la Tabla V, se muestran algunos resultados encontrados en la literatura referente a la actividad in vivo e in vitro de bacterias probióticas que revierten o previenen alguna descompensación en el microambiente de la cavidad oral, impactando a su vez en una mejora de la salud del huésped **Tabla V**.

Tabla V.

Utilización de probióticos en odontología

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	PROBIÓTICO	REFERENCIA
Aumenta significativamente el pH salival.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Srivastava, et al., 2016.</i>
1. Reduce de forma significativa los niveles de <i>Streptococcus mutans</i> en la saliva. 2. Impacta en la incidencia de nuevas lesiones de caries.	<i>L. acidophilus, L. reuteri, L. rhamnosus L. rhamnosus</i> LRH08, <i>L. paracasei</i> cepas SD1 y DSMZ 16671 <i>L. paracasei</i> subespecie <i>casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> : combinación de cepas probióticas en el yogurt Laive	<i>Srivastava, et al., 2016; Iniesta, et al., 2011; Hedayati-Hajikand, et al., 2015; Schwendicke, et al., 2014; Holz, et al., 2013.</i>
Adhesión a perlas de hidroxiapatita (Competencia por un sitio en el esmalte con el <i>Streptococcus sobrinus</i>).	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Srivastava, et al., 2016.</i>

4.2.5.1 Reuterina

El 3-hidroxi propionaldehído mejor conocido como reuterina, es una pequeña molécula producida por *Lactobacillus reuteri*, cuenta con propiedades antimicrobianas, producida durante la fermentación anaeróbica del glicerol (Cleusix *et al.*, 2007), hidrosoluble, se encuentra activa en un amplio espectro de pH, **Tabla VI**. Por otra parte, es resistente a las enzimas proteolíticas y lipolíticas, siendo un compuesto adecuado para la biopreservación de alimentos. La reuteriniclina es un antibiótico producido a partir de *L. reuteri*, se trata de un ácido tetrámico cíclico (Höltzel *et al.*, 2000), es activo principalmente en la membrana bacteriana de organismos Gram-positivo (Cherian PT *et al.*, 2014). Según la estructura es la respuesta de la actividad biológica. A pesar de que se conoce esta

sustancia, aún no es aplicada comercialmente sin embargo se realizan estudios *in vitro* para caracterizar su actividad biológica y posibles aplicaciones. Se ha demostrado que la reuterina producida y aislada de *L. reuteri* ATCC 55730, tiene un efecto en la expresión de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* un agente infeccioso gastrointestinal (Baca-Urrutia *et al.*, 2017), entre otras actividades estudiadas *in vitro* y mencionadas en la **Tabla VII**.

Tabla VI.

Propiedades fisicoquímicas y biológicas de la reuterina

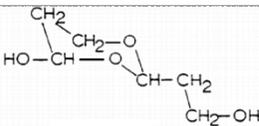
ESPECIFICIDAD	CARACTERÍSTICA	REFERENCIA
Nombre	3-Hydroxy-propionaldehyde (3-HPA) – Reuterina	<i>Talarico and Dobrogosz, 1989.</i>
Producido por	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Axelsson et al., 1989; Gänzle 2004.</i>
Estructura		<i>Vollenweider et al., 2004.</i>
Color	Amarillo traslucido	<i>Baca-Castañón, 2016.</i>
pH	4.1	<i>Vollenweider et al., 2003.</i>
Peso molecular (bajo)	74 gr/mol (forma monomérica). <200 gr/mol	<i>Talarico and Dobrogosz, 1989; Axelsson et al., 1989.</i>
Temperatura	100 °C por 10 minutos	<i>Dobrogosz and Lindgren 1995.</i>
Solubilidad	Hidrosoluble	<i>Davidson et al., 2005</i>
Actividad	Antimicrobiana: Bactericida, Antiviral, antifúngico, patógenos orales, Genes de virulencia	<i>Axelsson et al., 1989; De Vuyst and Leroy 2007; Ruiz-Moyano et al., 2009; Baca-Castañón et al., 2015; Urrutia-Baca et al., 2018.</i>
Amplio Espectro de inhibición Actividad antimicrobiana	<i>Listeria innocua, S. aureus, E. faecium, E. coli, S. mutans</i>	<i>Axelsson et al, 1989; Gänzle MG, 2004.</i>
Reacciona con	Grupos tiol y aminas primarias	<i>Vollenweider and Lacroix, 2004; Schaefer et al., 2010</i>

Tabla VII.
Revisión de algunas aplicaciones de la reuterina

PRODUCTO	PATÓGENOS	REFERENCIA
Quesos	<i>Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimorium</i>	<i>Mohamadi-Sani, et al., 2005.</i>
Leche	<i>Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella enterica, Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophil, Campylobacter jejuni</i>	<i>Arqués, et al., 2011.</i>
Leche	<i>Salmonella enterica, Campylobacter jejuni, Aeromonas hydrophila, Yersinia enterocolitica.</i>	<i>Arqués, et al., 2008.</i>
Salmón	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Montiel, et al., 2014.</i>
Alimentos elaborados	<i>Escherichia coli, Salmonella entérica, Serovar typhimurium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus</i>	<i>Lei Bian, et al., 2011.</i>
Carne	<i>Escherichia coli, Listeria monocytogenes</i>	<i>El Ziney, et al., 1999.</i>
Microorganismos patógenos intestinales	<i>Escherichia coli, Bacteroides vulgatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides fragilis, Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescents, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Eubacterium biforme, Eubacterium eligens, Colinsella aerofaciens, Enterococcus faecium, Clostridium difficile, Clostridium clostridioforme, Ruminococcus productus, Listeria innocua, Listeria ivanovii</i>	<i>Cleusix, et al., 2007.</i>

4.3 Toxicidad

La gran cantidad de nuevas entidades químicas en la industria farmacéutica humana- veterinaria, ha llevado a una mayor demanda de exámenes de seguridad para garantizar el desarrollo exitoso de medicamentos. El proceso de selección de nuevos compuestos, incluye la determinación de toxicidad mediante la aplicación de pruebas

toxicológicas *in vivo* y/o *in vitro* reconocidas internacionalmente. La importancia de dichas pruebas es fundamental, ya que muchos agentes farmacéuticos, productos químicos industriales y productos agroquímicos (ahora biotecnológicos) deben evaluarse por su seguridad, antes de que estén disponibles para uso general. Además, en algunos casos, la investigación básica puede producir datos que conducen a la prohibición de productos que no sean seguros (Sachana, Hargreaves, 2018). El cumplimiento de las normas debe apegarse a lo establecido por las instancias regulatorias y encargadas de avalar los ensayos clínicos y de protección de los seres humanos; así como a los principios de Calidad farmacéutica / Prácticas de fabricación (Pharmaceutical Quality/Manufacturing Practices CGMP). Lo anterior incluye también para el uso de una sustancia en alimentos para uso humano o animal, si no está sujeta a los requisitos de aprobación previa a la comercialización de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (Ley FD&C); dado que la sustancia es generalmente reconocida como segura por sus siglas (GRAS; generally recognized as safe) bajo las condiciones de uso previsto. Lo antes citado, aplica a nivel laboratorio en la realización de ensayos *in vitro* sobre la actividad biológica de las BAL y/o compuestos análogos, para descartar cualquier efecto tóxico y así asegurar el beneficio, e incluso de cualquier otra sustancia, molécula o fármaco en cuestión; descartando las limitaciones para su posible aplicación en el área de alimentos o en el área médica; dando certeza a una segura aplicación. Esto se ve sustentado mediante la utilización de líneas celulares de neuronas, musculares, del miocardio, líneas celulares relacionadas con enfermedades, tamizaje, mecanismos de toxicidad celular (Allen *et al.*, 2005).

4.3.1 Ensayos *in vitro* en líneas celulares

Los modelos de tejidos celulares utilizados para estudios *in vitro* son relativamente baratos, fáciles de mantener y manipular en comparación con los modelos animales (*in vivo*). Los ensayos *in vitro* permiten indagar los efectos que tienen las toxinas en células o tejidos específicos, dentro de un ambiente controlado. Sin embargo, la principal desventaja de los sistemas *in vitro*, sobre el modelo animal, son los efectos sistémicos observados en estos últimos, como un equilibrio apropiado del suministro de factores de crecimiento, un sistema de metabolismo xenobiótico y eliminación de toxinas, principalmente. El primero

se puede abordar al menos parcialmente añadiendo factores de crecimiento apropiados y el último mediante el uso de sistemas de activación metabólicos tales como la inclusión del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), activado por hidrógeno microsomas o una línea celular hepática en un cultivo celular equipado con un inserto de filtro (Sachana and Hargreaves, 2018). Otra desventaja es que muchos sistemas celulares carecen de la complejidad de las interacciones célula-célula presentes en el tejido, aunque esto puede abordarse en diversos grados utilizando sistemas de co-cultivo, un cultivo celular tridimensional o un cultivo de tejido/corte histológico (Sachana and Hargreaves, 2018).

4.3.2 Toxicidad Oral Aguda

El uso de animales en los estudios de toxicidad tuvo sus inicios en 1920, cuando Trevan JW, propuso el uso de la prueba de dosis letal del 50% (DL₅₀) para determinar la dosis letal de sustancias químicas individuales. Después de la introducción de la DL₅₀, un científico de la FDA John Draize, desarrolló un método para evaluar la irritación de los ojos y la piel recurriendo a la utilización de conejos. De manera que este método fue ampliamente aceptado para evaluar en ojos y en piel los efectos de productos químicos y farmacéuticos. Más tarde, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, EUA), desarrolló una prueba para identificar sustancias químicas cancerígenas a través de la dosificación diaria en ratas y ratones durante 2 años. A principios de la década de 1960, miles de bebés nacieron con defectos causados por la talidomida (Vargesson, 2018). Después de esto, todas las agencias reguladoras se concentraron en determinar los perfiles de toxicidad de la totalidad de las sustancias farmacéuticas disponibles para el uso regular de los pacientes; obligando a presentar los perfiles de toxicidad de los nuevos fármacos en investigación. A fines de los años ochenta, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, siglas en inglés) y la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) presentaron los protocolos para las pruebas de toxicidad de las sustancias farmacéuticas (Parasuraman, 2011). El Programa entre Organizaciones para la Gestión Racional de los Productos Químicos, un Acuerdo de Cooperación (IOMC) a través del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), la Organización Internacional del Trabajo (ILO), la Organización de las Naciones Unidas para la

Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud (WHO), la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO), el Instituto de las Naciones Unidas para la Formación y la Investigación (UNITAR), y la OECD; han colaborado a lo largo de la historia con la creación de reglas y guías para el desarrollo y cuidado de sustancias químicas. Las cuales incluyen Pruebas y Evaluación, Buenas Prácticas de Laboratorio y Monitoreo del Cumplimiento, Plaguicidas y Biocidas, Gestión de riesgos, Armonización de la supervisión reglamentaria en biotecnología, Seguridad de alimentos y alimentación, Accidentes Químicos, Registros de emisiones y transferencias de contaminantes; Emisión de documentos y la Seguridad de los Nanomateriales Manufacturados de estas. En 1993 la OECD (OECD, ENV/JM/MONO (2009)28), crea una serie de Guías Clínicas para la prueba de químicos con actualización hasta el 2006, en donde los ensayos clásicos para la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal 50 (DL_{50}), han quedado sustituidos por métodos alternativos cuyo objetivo común es reducir el número de animales empleados y minimizar el sufrimiento de éstos. Dichos métodos comprenden el ensayo test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases de Toxicidad No. 423 (Toxic Class Method, TCM) (Diener and Schlede, 1999; OECD No.423, 2000), el Método de Arriba-Abajo No. 425 (Up-and-Down Method, UDP) y el Procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP). Éste último fue adoptado en la Guía No. 420 de la OECD como alternativa a la prueba clásica aguda (OCDE No. 420, 2001). El procedimiento se basa en la evaluación de dosis previamente fijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado (SGA) (ENV/JM/MONO (2009)28). La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, no corrosiva, ni severamente irritante. Estos métodos reducen entre un 40% y 90% de animales. La fiabilidad de la dosis con respecto a la clasificación de toxicidad, está en el mismo orden de magnitud o incluso mejor en comparación con los ensayos clásicos de la DL_{50} (Diener y Schlede, 1999); en donde la muerte retardada significará que, si el animal no muere ni parece moribundo en un plazo de 48 horas, posiblemente morirá durante el periodo de observación de 14 días. Posteriormente se analizarán los datos de toxicidad en base al protocolo donde se determina el grado de toxicidad de la sustancia; en categoría 1, 2, 3, 4 o 5 (ENV/JM/MONO (2009)28), **Figura 1.**

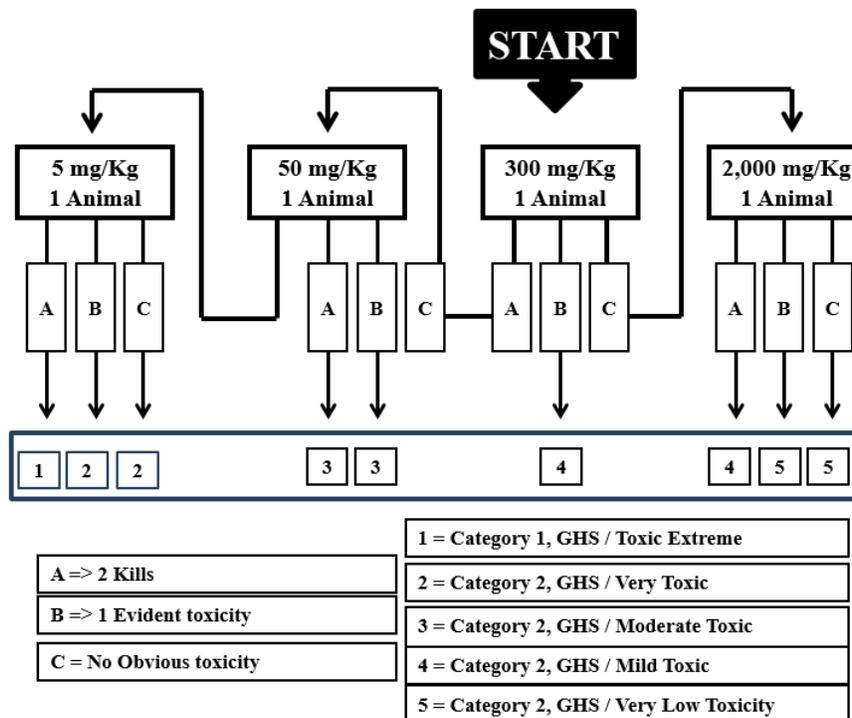


Figura 1. Toxicidad Oral Aguda - Fixed Dose Procedure con 1 animal por género y nivel de dosis según la OECD (2001). **mg/kg:** se refiere a los miligramos de sustancia (reuterina) en relación al peso del modelo animal expresado en kilogramos. **GHS:** Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. **Category:** se refiere al grado de toxicidad de la molécula o fármaco en estudio según la GHS

4.3.3 Inflamación

La respuesta inflamatoria protege al cuerpo contra infecciones y lesiones, pero el huésped puede tener consecuencias al no presentarse la respuesta (Serhan *et al.*, 2007). Estos procesos implican la activación de células específicas del sistema inmune incluyendo neutrófilos, basófilos, mastocitos, células T, células B, por citar algunos ejemplos. Sin embargo, una serie de lesiones inflamatorias demuestra la presencia de leucocitos específicos en cualquier lesión dada (Punchard *et al.*, 2004), siendo éstos componentes celulares necesarios para su resolución. La *inflamación aguda* se caracteriza por la acumulación extravascular de neutrófilos (PMN) y la formación de edema temprano en la respuesta. Más tarde durante la respuesta, las células mononucleares y los macrófagos se acumulan y ayudan a preparar el tejido para una resolución completa que conducirá a una

reestructuración del tejido inflamado y una mejora fisiológica. Durante la *inflamación crónica*, el foco inflamatorio es dominado por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con variaciones morfológicas. Los macrófagos y otras células inflamatorias generan gran cantidad de factores de crecimiento, citoquinas, liberan radicales de oxígeno y nitrógeno (Balkwill and Mantovani, 2001), pudiendo contribuir al deterioro posterior del tejido y presentarse otra patología. Los cambios morfológicos más comunes durante el proceso de inflamación se describen en la **Tabla VIII**.

Tabla VIII

Patrones histológicos de la inflamación que describen los cambios celulares e histológicos en respuesta a una acción física, mecánica o bien a una reacción producida por agentes químicos o biológicos (Spormann *et al.*, 1989).

MORFOLOGÍA DE LA LESIÓN CELULAR		
Morfología de lesión celular	Característica Histológica	Referencia
<i>Infiltrado celular</i> El infiltrado inflamatorio varía según la fase del proceso, y la predominancia de fenómenos agudos o crónicos	Mayormente neutrófilos polimorfo-nucleares (aguda) Monocitos, macrófagos y linfocitos, células plasmáticas (crónica)	<i>Finck et al., 1997.</i>
<i>Edema</i> Extravasación de líquido acuoso de los vasos hacia el espacio intersticial.	Aumento de tamaño celular; presencia de espacios vacíos intracelulares y otros elementos; líquido acuoso acidófilo en espacios intersticiales	<i>O'Brien et al., 2005.</i>
<i>Hemorragia</i> Extravasación de eritrocitos a partir de vasos sanguíneos o del corazón durante la inflamación	Extravasación de eritrocitos en espacios intersticiales células bi-lobuladas de color rojo	<i>Straat et al., 2012.</i>
<i>Necrosis</i> Muerte celular no controlada que promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y puede favorecer la diseminación de patógenos en un hospedero susceptible	Desnaturalización de proteínas y digestión enzimática, células eosinofílicas por la unión más fuerte de la eosina con las proteínas citoplasmáticas desnaturalizadas y por la pérdida de la basofilia del citoplasma debida a los ácidos nucleicos	<i>Cotran et al., 2000; Ramírez-Aguedo and Rojas-López, 2010. Golstein and Kroemer, 2007.</i>

4.4. Ensayos clínicos

4.4.1 Modelo animal

Los estudios en animales y los modelos validados *in vitro* se utilizan ampliamente para el estudio de agentes biológicos naturales o sintéticos, teniendo como finalidad la identificación y el poder predecir los posibles efectos nocivos para los seres humanos, los animales domésticos y aquellos de granja. Aunque la detección de los efectos adversos para la salud de los xenobióticos (sustancia química que se encuentra dentro de un organismo que no se produce naturalmente o se espera que no esté presente dentro del organismo), es el principal objetivo de las pruebas de toxicidad, se puede complementar con pruebas biomoleculares más sofisticados con el objetivo de comprender los mecanismos de acción de ciertos productos químicos o bioquímicos (Sachana and Hargreaves 2018). Las ratas y en menor medida los ratones, son la especie de elección en las pruebas toxicológicas reproductivas porque se consideran de bajo costo en comparación con los mamíferos más grandes y la reacción al mecanismo de acción de cualquier sustancia, es similar a la de los humanos (EPA 2000; OECD 2001a; OECD 2012; OECD 2016a-b).

Un problema importante que enfrenta la ciencia en cuanto a la toxicidad de las moléculas respecta, es cómo traducir datos experimentales de modelos *in vivo* e *in vitro*, en conocimiento sobre los mecanismos moleculares de toxicidad y niveles de seguridad en la exposición de los agentes probados. Varios modelos animales que se han utilizado durante muchos años para fines de estudio, se han ido perfeccionando gradualmente con un énfasis creciente en el diseño experimental mejorado, el bienestar de los animales y el uso reducido de los mismos. Desarrollos más recientes en pruebas de toxicidad *in vitro*, han contribuido significativamente a la reducción gradual en el uso de animales para el estudio de toxicidad ayudando así a mejorar el conocimiento relacionado con los mecanismos de toxicidad celular o toxicidad en órganos específicos. De manera que, hoy en día es posible eliminar compuestos que exhiben altos niveles de toxicidad basal en varios tipos de células y reducir el sufrimiento innecesario en los animales (Sachana and Hargreaves 2018).

4.4.2 Ensayos en humanos

La *investigación preclínica* no es un sustituto de los estudios que se realizan para conocer como el medicamento interactuará en el cuerpo humano; sino que responde preguntas básicas sobre la seguridad de un medicamento. Por lo que a la *investigación clínica* se refiere, se trata de estudios o ensayos realizados directamente en las personas. A medida que se desarrollan estudios clínicos, se consideran los logros a obtener para cada una de las diferentes Fases de Investigación Clínica, y se da inicio a un proceso de Investigación de Nuevas Drogas (IND), un proceso relevante previo a realizar la investigación clínica. Si bien los ensayos clínicos brindan información importante sobre la eficacia y seguridad de un medicamento, es imposible obtener información completa sobre la seguridad de un medicamento al momento de la aprobación (FDA, 2006). A pesar de los pasos rigurosos en el proceso de desarrollo de medicamentos, existen limitaciones; por ejemplo, la imagen real de la seguridad de un producto evoluciona a lo largo de los meses e incluso puede durar años, para conformar la vida útil de un producto en el mercado, la FDA revisa los informes de problemas con los medicamentos recetados y de venta libre, teniendo la mediación de agregar precauciones a la información de dosis y/o uso, así como otras medidas tratándose de problemas más graves.

5. MÉTODOS

5.1 Cultivo de *Lactobacillus reuteri* y producción de reuterina

Lactobacillus reuteri ATCC55730 se utilizó como materia prima de producción de reuterina. Su cultivo se apegó a los requisitos indicados por la American Type Culture Collection (ATCC).

L. reuteri anaerobia heterofermentativa, se activó en 55 g/L de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, BD Difco™, France), 37°C de incubación (Thermo Scientific Lab-Line Incubator, USA) por 24 h. El precultivo se realizó en 63 g/L de agar MRS (AppliChem GmbH, Germany) a 37°C por 48-63 h. La incubación se efectuó en presencia de atmósfera anaeróbica controlada basada en una mezcla de gas (H₂: 20.13%, CO₂: 10.13% y N₂: 69.74%; Praxair, Mexico). La activación y la manipulación se efectuó en una cámara de anaerobiosis (Plas-Labs, USA) previamente desinfectada.

1x10⁹ células/mL equivalente a una Densidad Óptica de 0.2 en la escala de McFarland, fueron recuperadas del precultivo para inocular en 100 mL de caldo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, obteniendo una biomasa de *L. reuteri* en fase exponencial alrededor de las 18 h (Baca-Castañón *et al.*, 2015). Previo a la inoculación en caldo, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm, 5 min, 27°C y lavadas dos veces con agua fisiológica estéril al 0.9% (w/v de NaCl).

El paquete celular fue resuspendido en una solución de glicerol 250 mM e incubado a 37°C por no más de 4 horas, para estimular la producción de reuterina (Talarico and Dobrogosz, 1989); finalmente el paquete fue recuperado por centrifugación. Posterior a ello, la reuterina se purificó parcialmente por cromatografía en columna de intercambio iónico empacada con 8% cross-linked, 400-mesh resin (no. AG50-W, BioRad), (Talarico y Dobrogosz, 1989). El eluyente se concentró por liofilización a -40°C, 0.133 milibares, 8 h (Labconco Corp, KC) y fue conservado a -20°C al abrigo de la luz siguiendo las recomendaciones de Cleusix *et al.*, (2007). Los medios de cultivo y el material fueron previamente esterilizados 15 min a 120°C a 15 libras de presión (All-American, USA).

5.2 Cuantificación de reuterina

La detección de la reuterina se realizó mediante un método colorimétrico reportado por Circle *et al.*, (1945). Para las curvas de calibración, se tomaron de 0-6 μM de Acroleína dietil acetal al 96% (A24001, Sigma-Aldrich, Alemania) y fueron adicionados a 6 mL de agua destilada estéril, seguido por la adición de 4.5 mL de solución de DL-triptofano (solución 0.01 M en 0.05 M de HCl) y 18 mL de HCl al 37%. Para la cuantificación, 1 mL de reuterina fue mezclada con 0.75 mL de DL-triptofano y 3 mL de HCl al 37%. Las muestras con reuterina y los estándares fueron incubados a 37°C durante 20 min en un baño de agua, se midió la Densidad Óptica a una longitud de onda de 560 nm para asegurar un final $<1 \text{ OD}_{560}$, (Cleusix *et al.*, 2007).

5.3 Prueba de toxicidad aguda de la reuterina por vía oral

Principio de la prueba

Esta prueba se utiliza principalmente en situaciones en las que el experimentador tiene información indicadora del material de ensayo el cual es probable que sea no tóxico; es decir, tiene toxicidad sólo por encima de una dosis límite regulatoria. Información sobre la toxicidad de una proteína puede ser adquirida a partir del conocimiento acerca de Pruebas de Toxicidad Aguda en proteínas similares; se tomará en consideración el organismo fuente y las circunstancias dadas en ese ensayo (OECD 2000a).

5.3.1 Determinación de toxicidad aguda

Dosis únicas de una sustancia o dosis múltiples prefijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) administradas dentro de las primeras 24 horas, son esenciales e indicadoras de que ocurran efectos adversos pudiendo ocasionar la muerte de uno o varios animales en estudio que hayan ingerido la sustancia en cuestión (reuterina). La dosis alta inicial, fue determinada conforme al Protocolo de Dosis Fija según la Guía para el Ensayo de Productos Químicos de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD No 33, 2001b and OECD No 39, 2009). Según lo establecido en la guía, se indica que la cantidad del fármaco a administrar en humanos sea de 300 y 2000 mg por kg de peso corporal (mg/kg). Este dato fue referencia en la concentración ponderada de reuterina a

administrar equivalente a 9 y 60 mg por gr de peso corporal del ratón de estudio (**Tabla IX**); y se traduce en peso de la reuterina por unidad de peso del animal (mg/kg).

Tabla IX.

Determinación de la dosis inicial según la guía clínica de Toxicidad Oral Aguda (OECD 2001a; OECD 2009).

1 PERSONA	1 RATÓN	cbp (300 µL)
2000 mg/kg	60 mg/gr	6,21 µL reuterina
300 mg/kg	9 mg/gr	0.93 µL reuterina

cbp: Cuanto Basta Para (*volumen necesario de la molécula a administrar, según la dosis establecida, expresado en microlitros*). **mg/kg:** miligramos de la molécula necesarios por cada kilogramo de peso de una persona expresado en kilogramos. **mg/gr:** miligramos de la molécula necesarios por cada kilogramo de peso del modelo animal expresado en gramos.

Si en 48 h no se manifiestan signos clínicos observables en el ratón, se interpretará que el daño no es tan agresivo y que probablemente se puede observar algún daño en los próximos 14 días de estudio. El grado de toxicidad oral aguda fueron analizados en base al protocolo (OECD No 39, 2009), donde se establece una categoría del 1 al 5, **Figura 1**. 300 µL fueron utilizados como referencia de excipiente líquido para ajustar la cantidad del inactivo de agua potable que basta para (cbp) completar la cantidad de reuterina a administrar como principio activo en la concentración establecida. A su vez, la dosis a administrar se calculó previamente conforme al peso del ratón. **Tabla IX**. Considerando la guía clínica de Toxicidad Oral Aguda, el volumen en roedores no debe exceder de 10 mL/kg de peso corporal, sin embargo, tratándose de soluciones acuosas, un volumen de 20-25 mL/kg (OCDE No 420, 2000a) es válido como se muestra en la **Tabla IX**.

5.4 Estudio *in vivo* en ratones C57BL/6

5.4.1 Manipulación y acondicionamiento

Para el estudio de toxicidad aguda se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6, no manipulados genéticamente y adquiridos de Charles River Laboratories International, Inc., (EUA). El estudio consistió en tres grupos conformado por 3 ratones, teniendo una muestra total de 9 animales seleccionados aleatoriamente con 8 meses de edad. El cuidado se efectuó dentro de jaulas individuales de 365x207x140 mm con superficie de 530 cm² (1284L, Eurostandard Type II L, USA) y en condiciones controladas al interior de un cuarto con 45-60% de humedad, 22-24°C de temperatura y ciclos de luz/obscuridad de 12 horas. Cada 24 horas se realizó un cambio de cama (Premium-Crigamex, México). Previo a la manipulación e inicio del estudio se requirió un tiempo mínimo de adaptación a su entorno de alrededor 10-14 días (Safety Data Sheet-00118), periodo durante el cual cada ratón fue pesado diariamente. Una dieta estándar se administró a los ratones, la cual incluía alimento tipo croqueta (30-40 gr, Rodent Laboratory Chow 5001, USA) y agua potable consumidos por semana, ambos en *Ad Libitum*. Este estudio fue previamente revisado y aprobado por el Comité de Bioética y el Comité de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); y desarrollado de acuerdo a los estándares de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

5.4.2 Administración de la reuterina

8 horas previas al inicio del procedimiento, se hizo el ayuno correspondiente. Los grupos debidamente identificados se clasificaron en: a) *grupo de estudio*, en donde la reuterina como sustancia biológica de principio activo fue administrada vía oral a dos ratones en una concentración de 9 mg de reuterina por peso corporal (expresado en gramos); mientras que al tercer ratón se le administró 60 mg utilizando agua destilada estéril como vehículo de administración. b) *Grupo de control interno*, se le administró la solución de glicerol 250 mM, sea 93 µL en 300 µL de agua destilada estéril, dado que este compuesto orgánico interviene en la producción de la reuterina, y un c) *Grupo control*, al cual se le administró únicamente agua potable en el volumen establecido (cbp) para los otros dos grupos. La administración de las sustancias se realizó con un catéter de calibre

24G (0.7mmx19mm, Introcan) introducido a través de la cavidad oral hacia el tracto gastrointestinal alto.

Posterior a la administración, los ratones se mantuvieron en observación por 4 h, con el objetivo de evaluar algún signo clínico patológico observable. Transcurrido este tiempo se reanudó la dieta estándar. Se realizaron observaciones y cuidados durante 14 días posteriores al procedimiento. En este periodo se efectuó un registro de la salud y el peso para cada animal.

5.5 Evaluación *in vitro* de toxicidad oral aguda de la reuterina

Existen signos vitales y características físicas que se establecen como indicadores que describen el grado de toxicidad aguda como: cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas, la actividad locomotriz, el patrón de comportamiento, temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia, cambios en la marcha y la mortalidad (OECD 2008). Las observaciones se realizaron de forma continua durante las primeras 4 horas de haberse administrado la sustancia en cuestión posteriormente las observaciones fueron realizadas una vez cada 24 horas durante 14 días. Todos los especímenes se pesaron el día 1 de tratamiento, el día 7 y el día 14 en el cual culminó el estudio. **Figura 2.** El conjunto de signos vitales y peso evaluados fueron estrictamente registrados en un Formato de Reporte de Caso (OCDE, 2008), APENDICE 1.

5.5.1 Análisis macroscópico de órganos

El día 15, los ratones de los tres grupos fueron sacrificados por dislocación, extrayendo posteriormente los órganos de estudio en el siguiente orden: corazón, pulmón, hígado y riñón (Krinke and Weber, 2012). Cada órgano fue lavado cuidadosamente con solución PBS 1X estéril con ayuda de una jeringa para eliminar excedentes de sangre. Una descripción macroscópica fue realizada mediante esteromicroscopía (Stemi Carl Zeiss), a una magnificación de 40X. La fotodocumentación se realizó con una cámara digital (Canon Rebel T5). **Figura 3.** Los tiempos límites de isquemia fría para la preservación de órganos, mediante conservación hipotérmica, son periodos cortos que van de 4-8 horas para el corazón y 6 horas límite (empírico) para el pulmón. Mientras que el límite de isquemia para el hígado es de 12-18 con un límite de hasta 30 horas, y para el riñón es de 18-36 horas

pudiendo almacenarse con seguridad por 40-50 horas. Se recomienda respetar los tiempos más cortos (Escalante y Del Río, 2009; Sanjee y Arenas 2009; Torras y Grinyó, 2005) para asegurar el mínimo cambio morfológico e histológico en la interpretación de los tejidos.

Posteriormente a la fotodocumentación macroscópica, los órganos fueron colocados cuidadosamente en casetes de trabajo (Histosette® I 45, Simport, Canada) y fijados por inmersión en formaldehído amortiguado al 10% en PBS por 48 horas.

5.6 Procesamiento de tejidos y método de tinción

Las biopsias de los órganos fueron procesadas, previa deshidratación, durante 16 h en un procesador automático de tejidos (Excelsior AS, Thermo Scientific), mismas que se embebieron en parafina utilizando el Centro de Inclusión (HistoStar, Thermo Scientific). Cortes histológicos de 5µm de espesor fueron obtenidos con un Microtomo (Microm HM 355S, Thermo Scientific) los cuales se recuperaron en laminillas silanizadas y se adhirieron por convección en un horno a 60°C por 1 h (Horno Drying Oven DVS402C, Yamato). La desparafinización se realizó mediante soluciones de xilol y etanol a concentraciones descendentes. Los cortes fueron teñidos por la técnica de hematoxilina y eosina en un teñidor automático (Varistain Gemini Es, Thermo Scientific) (Thompson y Hunt 1966). El montaje y fijación se realizó con resina (Entellan, Merck Millipore) y fueron finalmente analizados en un microscopio de campo claro (Axioobserver, Carl Zeiss) y fotodocumentados para su análisis morfológico e interpretación.

5.7 Documentación microscópica: Análisis Histopatológico

La fotodocumentación de los cortes se realizó mediante una cámara de alta definición (HMRC3, Carl Zeiss). Se obtuvieron microfotografías de 3 campos seleccionados aleatoriamente a magnificaciones de 100X, 200X y 400X. En la magnificación más elevada se buscaron signos histológicos sugestivos de daño tisular. La magnitud del proceso de inflamación se calificó por tres observadores independientes en ensayo doble ciego. Se empleó una rejilla morfológica para identificar y cuantificar los focos inflamatorios presentes en el tejido de interés (edema, hemorragia, infiltrado celular y necrosis). Con las observaciones de cada individuo, se generó una base de datos y se integraron los scores de inflamación (Spormann *et al.*, 1989). El grado de daño se estableció mediante la sumatoria

de las calificaciones obtenidas para cada parámetro individual, en donde la calificación del mayor daño corresponde a 20 puntos (Ning *et al.*, 2013), ver **Tabla X**. El promedio y la desviación estándar fueron calculados. Se comparó en nivel de concordancia entre los scores integrados de los tres observadores mediante la prueba del índice de *Kappa*.

5.7 Análisis estadístico

El promedio de los resultados y la Desviación Estándar (SD) de la puntuación de inflamación integrado por los observadores del ensayo triple ciego fueron determinados y posteriormente comparados con la prueba de concordancia (*Kappa*). La distribución de Pearson o X^2 fue empleada para determinar la diferencia significativa con $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Reporte de caso

Las variaciones registradas en los 9 ratones C57BL/6 durante las primeras 4 h de haberse administrado la reuterina como sustancia de estudio, el glicerol 250 mM (control interno) y el agua potable (control); fueron los bigotes erizados y variación del peso corporal (**Figura 2**) por ingesta de agua y comida, acompañados de estrés producido por el procedimiento mismo. Esto se presentó principalmente en el grupo de estudio y el grupo control. Transcurridos los 14 días de observación, los ratones del grupo de estudio manifestaron condiciones corporales normales y estados de conservación normal en piel y mucosas hidratadas. Para los tres grupos la actividad locomotriz no se encontró desviada, ni se observaron alteraciones patológicas en el patrón de comportamiento ni signos clínicos de temblores o convulsiones.

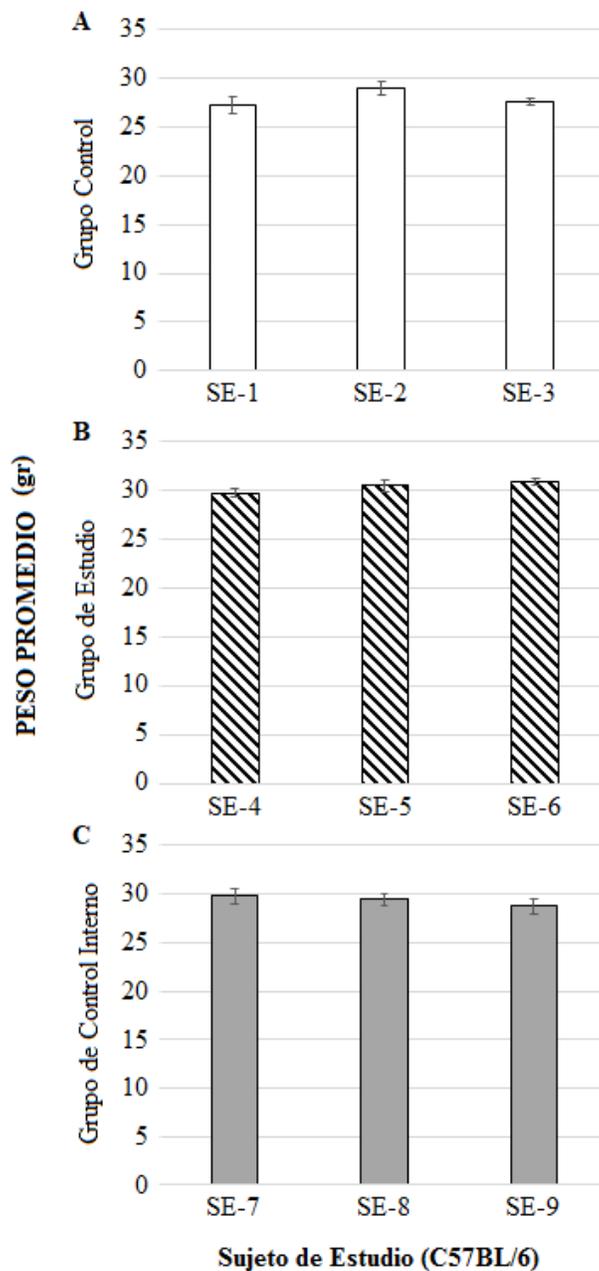


Figura 2. Graficas que muestran el peso promedio de los ratones (gr) durante el periodo de estudio de 14 días. **(A)** Grupo control (agua destilada, □): *sujetos de estudio* SES1, SES2 y SES3. **(B)** Grupo de estudio (90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL, ▨): SES4, SES5 y SES6. **(C)** Grupo de control interno (glicerol 250mM, ■): SES7, SES8 y SES9. La diferencia de pesos entre los ratones del mismo, y entre aquellos de los tres grupos (estudio, control y de control interno), es clínicamente irrelevante y por tanto no existe diferencia significativa, $p \leq 0.05$.

6.2 Toxicidad de la reuterina

6.2.1 Análisis anatomopatológico de los órganos

En la **Figura 3** se muestran las imágenes macroscópicas de los órganos estudiados (corazón, hígado, riñón y pulmón) tomadas en un estéreo-microscopio. Las características de los órganos sanos, representados por el grupo control que se les administró agua potable, fueron identificadas y tomadas como referencia para discriminar los cambios anatomopatológicos en los órganos del grupo de control interno (glicerol 250 mM) y del grupo de estudio.

El corazón extraído del grupo control se observó de un tamaño normal, con forma piramidal y leve aplanamiento dorso-ventral; color rojo y superficie lisa brillante, bordes romos, consistencia firme y peso en promedio de 0.151 gr. En lo que respecta al hígado, este presentó superficie lisa, bordes agudos, parénquima de color rojo brillante, bordes ligeramente pálidos, lóbulos conservados; de forma convexa anterior y cóncava posterior, el órgano se encontró constituido por 6 lóbulos: lateral derecho, medial derecho, cuadrado, medial izquierdo, lateral izquierdo y caudado; el peso del órgano en promedio fue de 1.271gr; todas estas corresponden a las características de un órgano sano. Los riñones presentaron tamaño ligeramente más grande en el izquierdo que el derecho, peso de 0.142 gr y 0.149 gr respectivamente; con forma de habichuela aplanada en eje dorso-ventral, con bordes convexo lateral extenso y cóncavo corto el medial; superficie de color rojo claro brillante y consistencia renitente; todas estas características propias de un órgano sano. Por último, los pulmones exhibieron forma conservada, cubiertos por una membrana serosa, y de color blanco a rosa. Estas mismas características fueron observadas en los órganos correspondientes tanto en aquellos extraídos de los animales del grupo control positivo toxico, como en aquellos que conformaron el grupo en estudio (experimental).

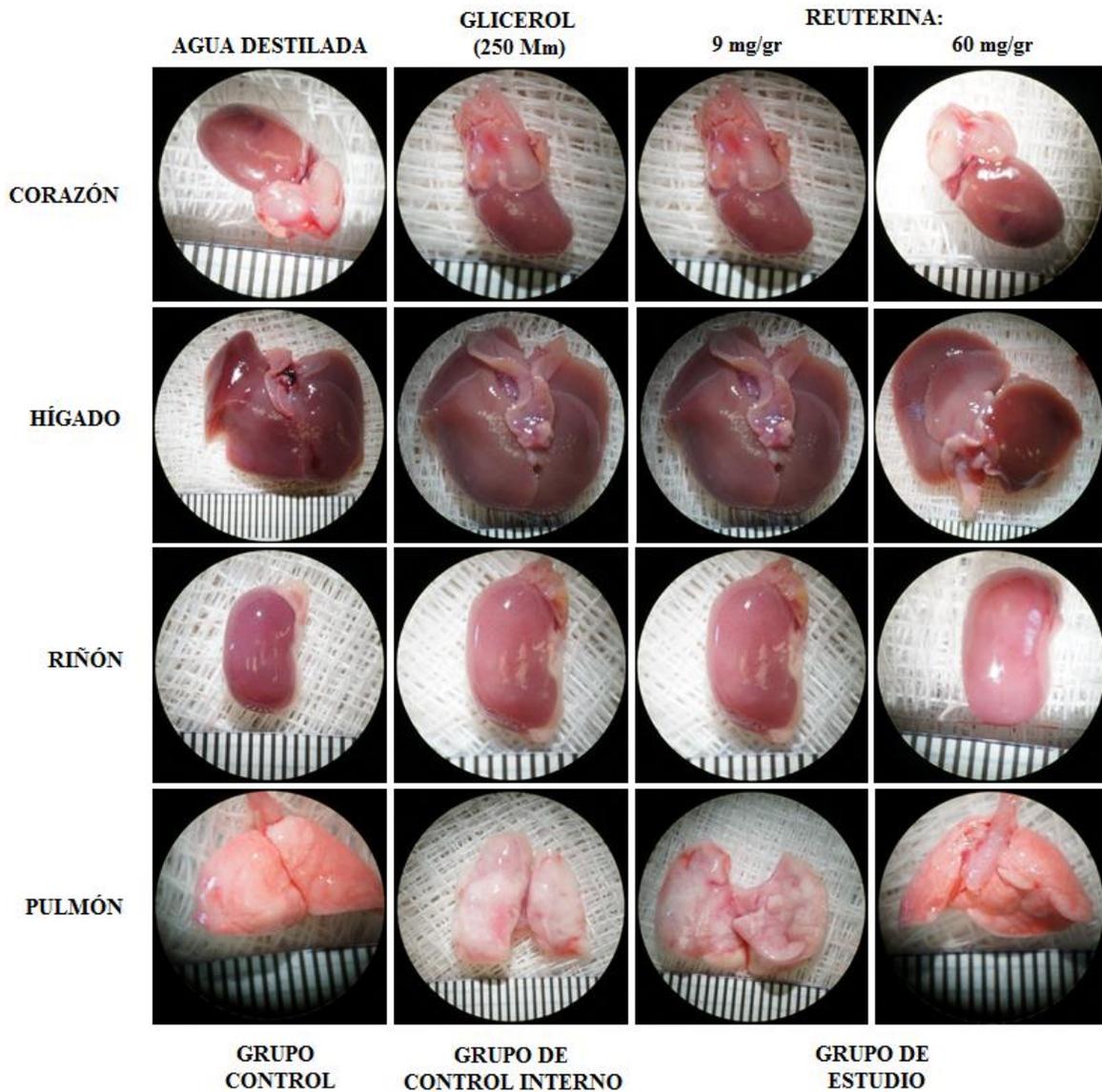


Figura 3. Aspecto macroscópico general de los órganos seleccionados: Corazón, Hígado, Riñón y Pulmón del grupo control (Agua destilada), de control interno (Glicerol 250mM) y de estudio (90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL), durante la disección toraco-abdominal. Se aprecian órganos en condiciones normales sin datos clínicos patológicos en los grupos experimentales (control interno y de estudio), respecto al grupo control. Estereomicroscopio (Carl Zeiss®, modelo stemi, Germany).

6.2.2 Morfología microscópica de tejidos

El efecto toxicológico de la reuterina como sustancia de estudio en las dos concentraciones administradas (30 y 60 mg/gr) en los órganos de estudio y el respectivo análisis de cortes histológicos se muestra en la **Figura 4**. En el análisis histopatológico de corazón correspondiente al grupo control (**Fig. 4a**) se aprecian fibras musculares en disposición longitudinal, de trayecto ligeramente ondulante y aspecto estriado. Presentan líneas claras perpendiculares al eje de la fibra (discos intercalares) y bifurcaciones periódicas, así como citoplasma de color rosado y núcleo elipsoidal de posición central. El espacio intersticial presenta escaso tejido conectivo laxo y abundantes capilares, todas estas características están dentro de lo normal. En los grupos de control interno (**Fig. 4b**) y el de estudio (**Fig. 4c**), no se manifestaron cambios histopatológicos distintos a los ya descritos para el grupo control.

En cuanto al tejido hepático del grupo control (**Fig. 4d**), se aprecia el parénquima con cordones hepáticos radiales, anastomosados entre sí, los hepatocitos polihédricos con citoplasma granular, de color rosado y núcleo violáceo, redondo y de posición central. Lo anterior forma parte de las características normales. En el grupo de control interno (**Fig. 4e**) la congestión fue moderada, presentando un conglomerado celular y extravasación de eritrocitos (*E*); mientras que en el grupo de estudio con reuterina (**Fig. 4f**), el aspecto histológico, salvo una discreta congestión sinusoidal, fue similar al del grupo control.

En el análisis histopatológico de la zona cortical del riñón del grupo control (**Fig. 4g**), se aprecia el laberinto tubular (*LC*) revestido por epitelio cuboidal simple, citoplasma rosado homogéneo, incluye núcleos de color violeta, redondos, regulares y de posición central. En el intersticio escaso tejido conjuntivo laxo y finalmente acompañando a los túbulos, se pueden ver los corpúsculos renales (*CR*) en una disposición uniforme, redondeados, sus capilares ligeramente congestivos, células mesangiales con citoplasma rosado y núcleos violáceos, todas esas características correspondientes al tejido renal cortical normal. El tejido renal del grupo de control interno (**Fig. 4h**) mostró así mismo, congestión de capilares glomerulares. En el grupo de estudio (**Fig. 4i**) las características fueron similares al del grupo control. Por último, el análisis de tejido pulmonar del grupo control (**Fig. 4j**), el parénquima pulmonar mostró alveolos circulares, irregulares, coalescentes con septos alveolares (*SA*) delgados conformados por pneumocitos tipo I y II en proporción y

disposición normal, acompañados por capilares pequeños (C), constituidos por epitelio plano simple ocupados por eritrocitos intravasculares. En el grupo de control interno (**Fig. 4k**), en cambio, resalta la presencia de septos de mayor grosor, cuyos capilares congestivos se acompañan de aumento del espacio intersticial de los tabiques interalveolares, que corresponde a edema. Finalmente, en el grupo de estudio (**Fig. 4l**), el aspecto del parénquima pulmonar se asemeja a aquel del grupo control.

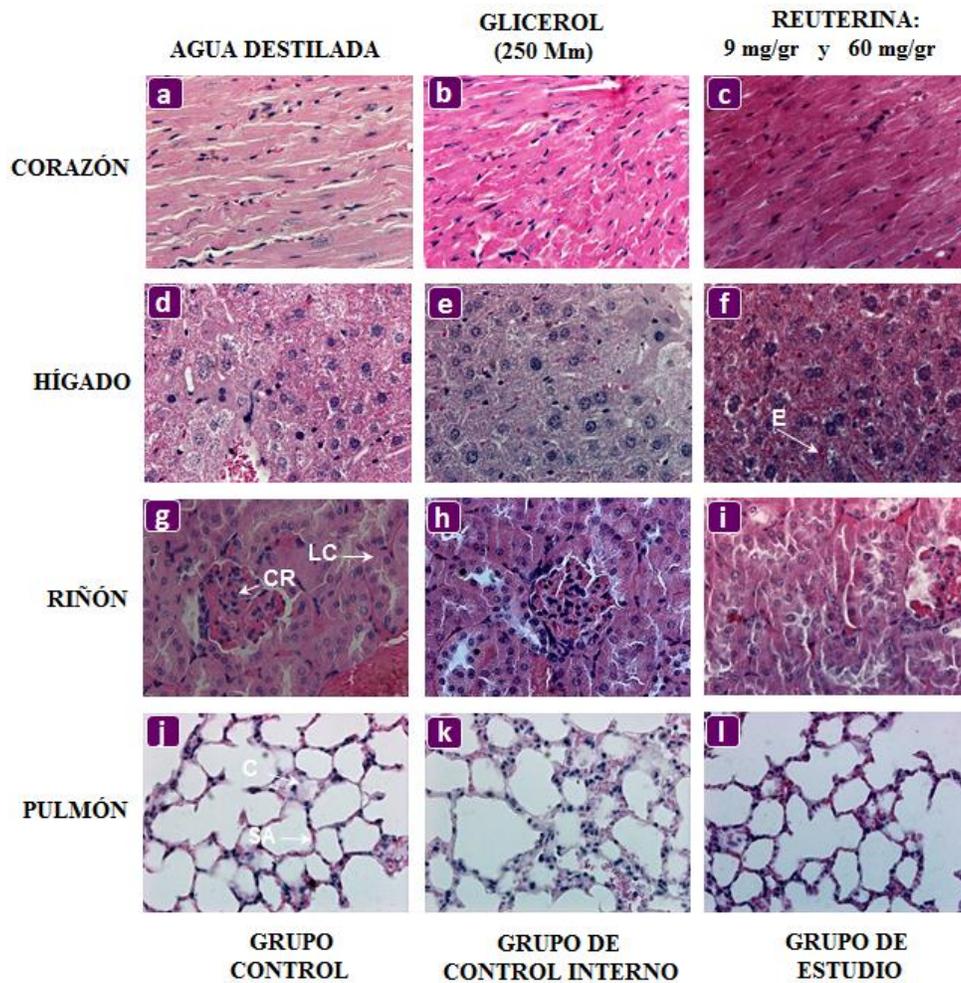


Figura 4. Análisis histopatológico en microfotografías de luz de Corazón (**a, b, c**), Hígado (**d, e, f**), Riñón (**g, h, i**) y Pulmón (**j, k, l**), con tinción H y E del grupo control (agua destilada), grupo de control interno (glicerol 250mM) y grupo de estudio (90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL). **Núcleos** (color azul a oscuro), **Citoplasma, tejido fibroso o fondo de los componentes tisulares** (color rosa pálido a rosa intenso)

anaranjado o en tonos rojizos). Microscopio de campo claro (Axioobserver, Carl Zeiss) con cámara HMRC3 (Carl Zeiss), 400X. **E:** Extravasación de eritrocitos. **LC:** Laberinto cortical. **CR:** Corpúsculo renal. **SA:** Septo alveolar. **C:** Capilar.

6.2.3 Evaluación del daño de inflamación en los órganos

Los resultados de toxicidad aguda se muestran en la **Figura 5**. El proceso de inflamación se analizó e interpretó como el índice de concordancia a través de una plantilla de calificaciones. Su descripción e interpretación se realizó considerando los signos clínicos del estudio histológico por los observadores A, B y C. La puntuación o calificación promedio presentada en el órgano del corazón (**Fig. 5a**) fue de 0.67 (± 1.32) para el grupo control, mientras que en el grupo de control interno se percibió un valor de inflamación de 0.13 (± 0.35) y para el grupo de estudio tratado con reuterina el promedio de la puntuación fue de 0.33 (± 1.0). El daño de inflamación evaluado en el tejido hepático (**Fig. 5b**) fue nulo en lo que al grupo control respecta; y de 0.88 (± 1.64) y 0.44 (± 1.33) para el grupo de control interno y el tratado con reuterina respectivamente. La evaluación de la inflamación promedio en el tejido renal (**Fig. 5c**) presentó una puntuación de 1.75 (± 3.28) para el grupo control mientras que el daño de inflamación tanto para el grupo de control interno como para el de la reuterina fue nulo 0.0 (± 0.0). Finalmente, las observaciones en el parénquima pulmonar (**Fig. 5d**) arrojaron el siguiente un daño de inflamación equivalente a 0.33 (± 1.0) en el grupo control, 7.13 (± 5.51) en el grupo de control interno y 1.33 (± 2.06) en el grupo de reuterina.

La desviación estándar calculada y al índice de concordancia ayudaron a delimitar la diferencia significativa ($p \leq 0.05$) según la distribución (X^2) de las observaciones entre los investigadores A-B, A-C y B-C; así como respecto a los grupos de control interno, control y de estudio aquí presentados. Para el grupo de control interno, existe una diferencia significativa entre los investigadores A y B en la evaluación de la inflamación por administración de glicerol, con una X^2 de 11.64, ($p > 0.05$). El investigador A difiere del B en la evaluación de hemorragia ($X^2=11.47$) y necrosis ($X^2=6.12$); mientras que los investigadores A y C difieren en la necrosis ($X^2=6.12$); los 3 investigadores, muestran un índice de *kappa* alto. En lo que al grupo de estudio respecta, la puntuación de inflamación por administración de reuterina no presentó diferencia estadística significativa entre los tres

observadores ($p \leq 0.05$). Este mismo resultado y también esperado lo fue para los ratones a los cuales se les administró agua potable (grupo control).

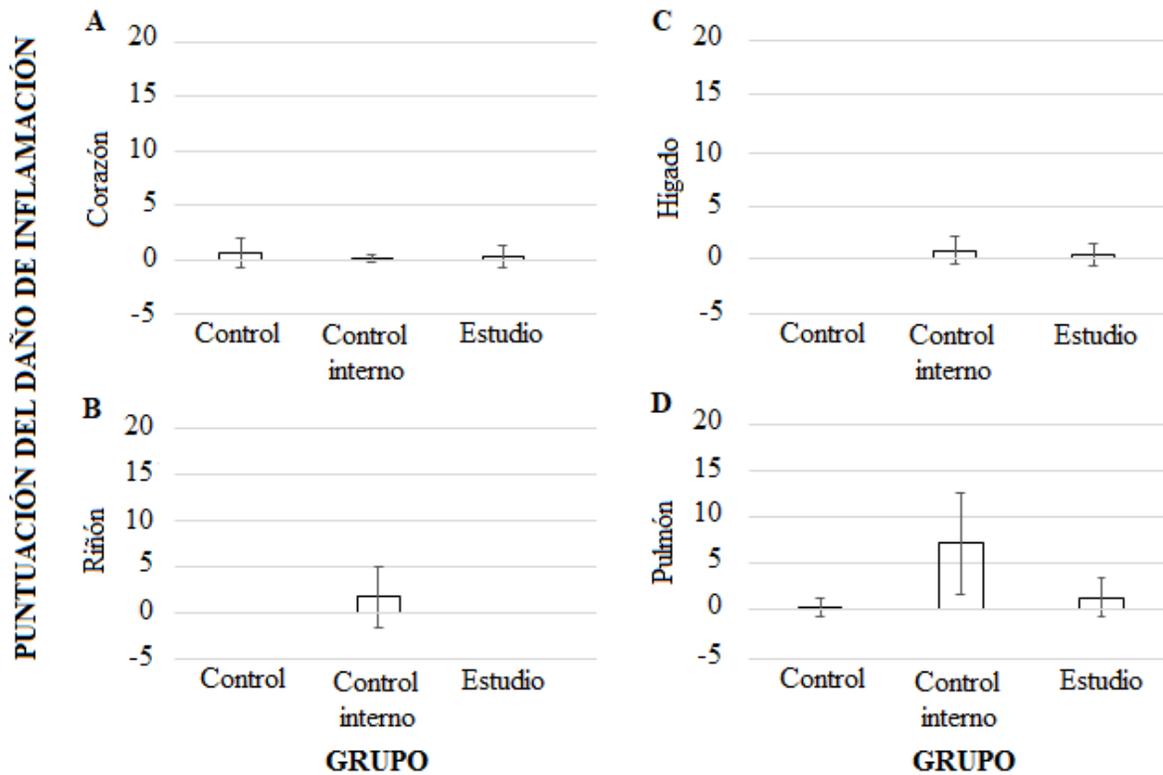


Figura 5. Puntuación promedio del daño de inflamación evaluado por tres investigadores independientes a los ratones de los grupos control (agua destilada), de control interno (glicerol 250mM) y de estudio (90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL), en tejido de los órganos de estudio: Corazón (A), Hígado (B), Riñón (C) y Pulmón (D). La calificación máxima asignada es de 20. Existe una concordancia muy alta entre los tres investigadores en las evaluaciones para los tejidos de los grupos de estudio y control; no hay diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$). Para el grupo de control interno, hay discrepancia en la evaluación de inflamación respecto a la hemorragia y necrosis con una diferencia significativa ($p > 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Una de las preocupaciones en el ámbito médico, científico y biotecnológico, es el uso desmedido de fármacos y antibióticos ocasionando efectos secundarios muy agresivos, siendo éste el motor principal en la búsqueda de alternativas para reducir la dosis administrada y el daño al consumidor. Lo anterior ha permitido estudiar péptidos producidos no solo por organismos pluricelulares (Ahmad *et al.*, 2012), sino también unicelulares y es el caso bacterias probióticas quienes cuentan con un potencial biológico importante y benéfico para la salud; además de ser consideradas seguras y eficaces para su consumo (GRAS), (EFSA Scientific Committee, 2007). Paralelo a ello, se encuentran estudios documentados que abordan la producción, aislamiento y caracterización de las sustancias producidas por algunas BAL, siendo éstas las responsables de atribuir la actividad biológica (Singh *et al.*, 2013; Abid *et al.*, 2017; Urrutia-Baca *et al.*, 2017). Sin embargo, no existen reportes publicados sobre su seguridad y eficacia o toxicidad en el huésped, pues cuando las sustancias o metabolitos son aislados de su nicho y concentrados, podría verse incrementada la actividad biológica y por ende ser tóxico en su consumo o administración. La reuterina es un péptido producido por *L. reuteri* resultado de la biotransformación de glicerol, tiene un amplio espectro antimicrobiano (**Tabla VII**), pero no existen reportes de su toxicidad aguda oral, razón por la cual fue utilizada en este estudio, y administrada a ratones de la cepa C57BL/6. Éste tipo de modelo murino es considerado un modelo de propósito general que cumple con las especificaciones necesarias para pruebas toxicológicas, dadas sus semejanzas con el perfil de condiciones humanas.

La administración oral de 90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal del ratón/mL, y de los controles (glicerol 240 mM y agua potable) en las dosis indicadas para este estudio, provocó una reacción de estrés en los modelos biológicos la cual se consideró no patológica y la esperada de acuerdo al procedimiento aquí utilizado, dado que todas las sustancias fueron introducidas por medio de una sonda en el tracto gastrointestinal alto. Cualquier material extraño que se introduzca en el cuerpo del huésped ocasiona que el sistema nervioso central (SNC) y periférico reaccionen de forma innata y como mecanismo de defensa propia a tal estímulo. Esto explica el estrés los ratones en todos los grupos durante

las primeras 4 horas posteriores a la administración de la sustancia en cuestión. La posible inapetencia de los ratones a los que se les administró la solución de glicerol en tanto que sustancia de control interno, puede explicarse además del estrés, considerando que se trata de un ácido orgánico con efecto anorexigénico, es decir, estimula la gluconeogénesis hepática convirtiéndose en glucosa, incrementando así los nutrientes circulantes relacionados con la absorción intestinal y señales de saciedad al SNC son entonces transmitidas (Andrade *et al.*, 2015; Hartmann *et al.*, 2010). Fuera de este evento se excluyó cualquier evidencia de toxicidad aguda, además de no haber presentado mortalidad, alteraciones patológicas en el patrón de comportamiento ni tampoco signos clínicos de náuseas, vómito o inapetencia, temblores o convulsiones durante los 14 días de estudio. Aunado a ello, en los datos asentados en el reporte de caso para cada grupo, no se considera significativa la diferencia de pesos de los modelos biológicos y las diferencias entre grupos son consideradas clínicamente irrelevantes **Figura 2**. La ingesta normal de la dieta administrada a los ratones a lo largo del estudio, fue un indicador importante de la ausencia de efectos adversos durante el protocolo, manteniendo así mismo un promedio en el peso corporal. Esta sobrevivencia se ha manifestado en otros protocolos semejantes al nuestro utilizando ratones albinos para determinar el efecto del vigabatrin un inhibidor del γ -aminobutyric acid (GABA)-transaminase (Raza *et al.*, 2002) e incluso, en ratas como modelo para determinar la seguridad en el consumo humano de dos cepas de *Lactobacillus* (Shokryazdan *et al.*, 2016). Ambos estudios coinciden en que los animales que sobreviven a los protocolos con duración entre 7 a 28 días, se mantienen en un 90% de su peso inicial.

En la evaluación específica de la seguridad de algunas bacterias lácticas incluyendo *L. reuteri* por diversos autores, e incluso casas comerciales que manejan productos con ésta bacteria láctica como principio por su actividad antimicrobiana eficaz en la inhibición del desarrollo de patógenos en alimentos, en el intestino y en la cavidad oral confiriendo un beneficio a la salud (Cleusix *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2013; Montiel *et al.*, 2014; Baca-Castañón *et al.*, 2015), no se encuentra evidencia alguna del uso de la reuterina como péptido o sustancia activa. Ejemplo de ello son las evidencias documentadas en la evaluación específica *in vivo* e *in vitro* de la seguridad y toxicología oral de 5×10^{10} cel/mL de *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en yogurt, administrado a humanos (Jones *et al.*, 2012) y efectivo en la disminución de los niveles de colesterol. En esta misma línea,

Baca-Castañón *et al.*, (2015), utilizaron *L. reuteri* en estudios *in vitro* demostrando la efectividad antimicrobiana en patógenos orales de caries y enfermedad periodontal (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii* y *Tannerella forsythia*). BioGaia® por su parte, es una compañía sueca con productos innovadores que incluyen cepas de *L. reuteri* como suplemento metabólico en la prevención de cólicos en infantes (Protectis®), en la digestión en adultos (Gastrus®, Protectis®) e incluso en el balance de la flora microbiana bucal (Prodentis®). Cardioviva® es una compañía americana, utiliza también una variedad de *L. reuteri* en sus productos (2×10^9 bacterias vivas) destinados a mantener la salud del corazón y evitar riesgo de diabetes. Los usos de las cepas de ambas compañías en tanto que suplementos metabólicos alimenticios han sido avalados no solo por investigaciones clínicas o de laboratorio, sino también por la Food & Drug Administration (FDA-USA), la European Food Safety Administration (EFSA) y la Therapeutic Goods Administration (TGA) de Australia; reconociendo que se trata de una bacteria probiótica inofensiva y con efecto terapéutico para el consumo humano.

Recientemente Urrutia-Baca *et al.*, (2018) demostraron que la reuterina aislada de *L. reuteri* ATCC 55730 tiene un efecto en la expresión de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* un agente infeccioso gastro-intestinal. Con algunos estudios encontrados en la literatura que externan un interés semejante al de la investigación aquí presentada (Gänzle 2004). Es decir, la caracterización y seguridad de bactericinas o péptidos de amplio espectro producidos por el metabolismo de bacterias ácido lácticas, contribuyen al conocimiento de los procesos microbianos, y también a visualizar aplicaciones en el área de los alimentos o terapéuticas en la salud.

Para el grupo de estudio la administración de 90 y 60 mg de reuterina/gr de peso corporal/mL (equivalente a 300 y 2000 mg/kg de peso corporal humano), el análisis histopatológico de los daños tisulares realizado por los tres observadores en la determinación de edema, infiltrado celular linfocitario, hemorragia y necrosis celular; no hubo diferencia estadística significativa. Todas las observaciones recayeron en los mismos valores paramétricos lo cual explica el nivel alto de concordancia entre los observadores. Lo anterior se traduce en que la reuterina aislada de un cultivo de *L. reuteri* ATCC 55730, semipurificada y concentrada por liofilización, y administrada en dosis altas y únicas para este estudio, no manifestó toxicidad aguda oral. La respuesta inflamatoria es una reacción

de protección al cuerpo contra infecciones y lesiones, pero el huésped puede presentar consecuencias al ser desregulado (Serhan *et al.*, 2007), lo cual no fue el caso mismo si las dosis administradas de reuterina fueron elevadas.

Shigemori *et al.*, (2015) realizaron un estudio en ratones induciendo colitis aguda y a los cuales se les administró vía oral *Lactococcus lactis* NZ9000, una bacteria láctica que secreta la hemo-oxigenasa-1, una molécula con efecto antiinflamatorio. Observaron una disminución en la expresión de citosinas pro-inflamatorias respecto al control al mismo tiempo que proponen al *L. lactis* como un posible agente terapéutico mucosal. En otro estudio con modelo murino similar al nuestro (Dias-Paiva *et al.*, 2013), se utilizó la Bovicina HC5 un péptido antimicrobiano con amplio espectro producido por *Streptococcus bovis* HC5. El péptido se administró inicialmente vía subcutánea para sensibilizar a los ratones, seguido de administraciones por vía oral durante 30 días (4 µg/gr peso del animal/día o aproximadamente 70 µg por animal), siendo una dosis menor que la utilizada en nuestro estudio con la reuterina. Los autores demostraron que la bovicina HC5 tiene la capacidad de modular el sistema inmunológico, mismo si tiene efectos mínimos en la permeabilidad intestinal y su toxicidad *in vivo* esta es baja. Un segundo estudio también similar pero realizado por Chon *et al.*, (2009) encontraron que subproductos del metabolismo de *L. plantarum* KFCC11389P pueden influir en la actividad inmunomoduladora impactando sobre la respuesta inflamatoria.

En el estudio aquí presentado con la reuterina, no hubo toxicidad y la permeabilidad en los órganos de estudio fue buena, mismos resultados que fueron respaldados por un análisis de varianza y donde se acepta la hipótesis establecida de este estudio. Lo anterior significa que la reuterina después de su administración oral tuvo una interacción a su paso por distintos órganos; ejemplo de ello el hígado la absorbió adecuadamente permitiendo una posterior distribución en la sangre, para finalmente ser excretada por el riñón sin acumularse en otros órganos. Al no manifestarse cambios en el tejido pulmonar significa que la reuterina no tiene la capacidad de causar una afección en este órgano sin ser el blanco terapéutico, cómo lo hacen algunos fármacos dependientes de la dosis y tipo (Schwaiblmair *et al.*, 2012).

Finalmente, y no menos importante, en el grupo de ratones al que se le administró el glicerol 250 mM en tanto que sustancia de control interno, no hubo formación de edemas ni infiltrado celular en los tejidos utilizados en este estudio, únicamente hemorragia y necrosis celular. Aquí, se encontraron diferencias significativas en las especificaciones de los observadores que participaron en el análisis de daños tisulares. Lo anterior significa que el glicerol tiene una toxicidad *in vivo* leve. El glicerol es considerado de baja toxicidad y con un control límite de exposición para humanos de 10 mg/m³; mientras que la DL50 oral en rata es de 12600 mg/kg, y conforme a las especificaciones del proveedor. En el estudio aquí presentado como en el de Andrade *et al.*, (2015), los espacios libres de en las células hepáticas podría explicarse con una presencia de ATP en demanda de nutrientes causada por el glicerol. Sin embargo, esto no fue motivo para cambiar significativamente el aumento del peso de los ratones. Estos resultados confirman el estatus de GRAS otorgado al glicerol (FDA, 2006), al menos para la especie de ratones C57BL/6, en la dosis y durante el periodo utilizado en este estudio.

El poder avalar la seguridad de los péptidos y bacteriocinas que producen las bacterias probióticas, significa un reto en el desarrollo de técnicas de identificación, producción y aislamiento para enseguida poder caracterizarlas respecto al espectro de actividad biológica fuera de su nicho productor. Así como también, precisar datos como el rendimiento en su producción y con una aplicación segura en el área farmacéutica (uso tópico, administración oral e incluso intravenosa) e incluso de los alimentos. Así pues, el peso molecular de la reuterina <200 g/mol, la importancia de su actividad biológica y la no toxicidad aguda oral en ratones, podría asemejarse al ácido acetil salicílico, un ingrediente activo pequeño y de peso molecular 180 g/mol, con biodisponibilidad rápida y completa en el cuerpo del huésped (Bayer Pharma 2014; Krishna and Nadler 2016).

8. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados evidenciaron el nulo efecto inflamatorio por infiltrado celular, hemorragia o necrosis en los órganos de estudio (corazón, hígado, riñón y pulmón) por ingesta de reuterina a dosis elevadas de 300 y 2000 mg/kg de peso corporal y por tiempo

prolongado en los ratones C57BL/6. Se concluye por vez primera que la reuterina aislada parcialmente y concentrada por liofilización; es segura de ser administrada *in vivo* en dosis elevadas sin asociarse con algún signo de toxicidad en los órganos. Este resultado le da un valor agregado a la importancia de aislar sustancias análogas de bacterias probióticas para mejor entender su mecanismo de acción y absorción. Este estudio es una contribución a la caracterización de toxicidad aguda de la reuterina, lo cual da pauta a investigaciones subsecuentes orientadas hacia estudios pre-clínicos que permitan precisar no tan solo la farmacodinámica, sino también su biodisponibilidad y bioequivalencia para en algún momento ayudar a prevenir o tratar enfermedades infecciosas localizadas. *Lactobacillus reuteri* como productor de la reuterina tiene grandes beneficios para la salud bucal, intestinal, inmunológica y mismo en la conservación de alimentos; ahora bien, el uso de la reuterina puede resultar una buena opción desde su producción, conservación y administración terapéutica o como suplemento alimenticio. Este estudio ayuda a ampliar el conocimiento sobre los procesos microbianos con valor agregado.

RECOMENDACIONES:

Adicionalmente, se podría incluir en los protocolos de toxicidad oral aguda, una plantilla de calificaciones para obtener un resultado y cuantificar un valor de perspectiva visual, como es la inflamación; y así poder emplear y cuantificar una dosis terapéutica para dicho resultado de inflamación. Los resultados obtenidos de este estudio son datos que están evolucionando los planes de tratamiento contra diversas enfermedades crónicas, degenerativas, adquiridas entre otras. El enfoque terapéutico de muchos medicamentos actuales en el mercado podrá revolucionar su fórmula terapéutica para mejorar la calidad de tratamiento. Alternativas de biofarmacos que no son tóxicos como los probióticos no contribuyen a un proceso clínico de inflamación, toxicidad y/o degeneración de los órganos esenciales que contribuyen al metabolismo y síntesis de excreción de medicamentos sintéticos.

9. LITERATURA CITADA

1. **Abid Y**, Casillo A, Gharsallaha H, Joulaka I, Lanzetta R, Corsaro MM, Attiaa H, Azaboua S (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *Int J Biol Macromol*. 108(1): 719-128.
2. **Abrahamsson TR**, Sinkiewicz G, Jakobsson T, Fredrikson M, Björkstén B (2009). Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 49(3): 349-354.
3. **Ahmad A**, Ahmad E, Rabbani G, Haque S, Arshad Md, Hasan Khan RH (2012). Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Current Protein Peptide Sci*. 13(3): 211-223.
4. **Allaker R** and Douglas CW (2015). Non-conventional therapeutics for oral infections. *Virulence*. 6(3):196-207
5. **Allen DD**, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA (2005). Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm*. 31(8): 757-68.
6. **Allen SJ**, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 11
7. **Andrade EF**, Vieira-Lobato R, Vasques-de Araujo T, Ribeiro-Orlando D, Vicente-da Costa D, de Oliveira-Silva V, Puggina-Rogatto G, Zangeronimo MG, Vieira-Rosa P, Pereira LJ (2015). Adaptation to physical training in rats orally supplemented with glycerol. *Can J Physiol Pharmacol*. 93(1): 63-69.
8. **Arqués JL**, Rodríguez E, Nuñez M, Medina M (2011). Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control*. 22 (3-4): 457-61.
9. **Ashwin D**, Ke V, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A and Sarpangala M (2015). Effect probiotic containing ice-cream on salivary *Mutans streptococci* (SMS) levels in children of 6-12 years of age: a randomized controlled double blind study with six-months follow up. *J Clin Diagn Res*. 9(2):ZC06-ZC09.
10. **Axelsson LT**, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis*. 2:131-136.

11. **Baca-Castañón ML**, De la Garza-Ramos MA, Alcázar Pizaña AG, Grondin Y et al, (2015). Antimicrobial effect of lactobacillus reuteri on Cariogenic Bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 7:1-8.
12. **Baca-Castañón ML** (2016). Reducción de *Streptococcus mutans* con reuterina producida por *Lactobacillus reuteri*: estudio *in vitro* con cultivo puro e *in vivo* con niños de 6 y 7 años de edad, mediante la ingesta de un alimento gelificado. *Tesis. Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría*. Pp:119.
13. **Bayer Pharma** (2014). From Molecules to Medicines, published by *Bayer AG, Communications & Health Policy*, Berlin, Germany.
14. **Bruno G**, Rocco G, Zaccari P, Porowska B, Mascellino MT, Severi C (2018). *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Dysbiosis: Can Probiotics Administration Be Useful to Treat This Condition? *Can J Infect Dis Med Microbiol*.
15. **Camacho LH**, Frost CP, Abella E, Morrow PK, Whittaker S (2014). Biosimilars 101: considerations for U.S. oncologists in clinical practice. *Cancer Med*. 3(4): 889-99.
16. **Cherian PT**, Wu X, Maddox MM, Singh AP, Lee RE, Hurdle JG (2014). Chemical modulation of the biological activity of reutericyclin: a membrane-active antibiotic from *Lactobacillus reuteri*. *Sci Rep*. 17(4):4721.
17. **Chon H**, Choi B, Lee E, Lee S, Jeong G (2009). Immunomodulatory effects of specific bacterial components of *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P on the murine macrophage cell line RAW 264-267. *J Appl Microbiol*. 107(2009): 1588-1597.
18. **Circle SJ**, Stone L, Boruff CS (1945). Acrolein determination by means of tryptophane: a colorimetric micromethod. *Ind Eng Chem*. 17(4): 259-262.
19. **Cleusix V**, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol*. 7(101): 1-9.
20. **Cotran RS**, Kumar V, Robbins SL (2000). Robbins Patología Estructural y Funcional, 6ª ed. Madrid: McGrawHill Interamericana. 5-45
21. **Davidson PM**, Sofos JN and Branen AL (2005). Antimicrobials in food. Taylor and Francis, New York.

22. **De Vuyst L** and Leroy F (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 13(4):194-199.
23. **Desrouillères K**, Millette M, DangVu K, Touja R, Lacroix M (2015). Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *J Functional Foods*. 17(1): 816-827.
24. **Dias-Paiva A**, Fernandes KM, Dias RS, dos Santos-Rocha A, Licursi-de Oliveira L, Neves CA, Oliveira-de Paula S, Mantovani, HC (2013). Safety evaluation of the antimicrobial peptide bovicin HC5 orally administered to a murine model. *BMC Microbiol*. 13(1): 1471-2180.
25. **Diener W**, Schlede E. Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC so Tests (1999). *ALTEX*. 16:3; 129-134
26. **Dobrogosz WJ** and Lindgren SE (1995). Stockholm, Sweden Patent No. 5413960 U. S. Patent.
27. **EFSA Scientific Committee** (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA J.587 GRAS.1-16.
28. **El-Ziney MG**, van den Tempel T, Debevere J, Jakobsen M (1999). Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *J Food Prot*. 62(3):257-61.
29. **ENSANUT** (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino) 2016.
30. **EPA** (Environmental Protection Agency) (2000). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3550 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. EPA 712-C-00-367.
31. **Escalante JL** and Del Rio F (2009). Puesta al día en medicina intensiva: Trasplantes. *Med intensiva*. 33(6):282-292.
32. **FAO/WHO** (2000). Guidelines for the evaluation of probiotics in food report. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
33. **FDA**, Food and Drug Administration (2006). Code of Federal Regulations, 21CFR582.1320, Title 21, Vol. 6, 21CFR582.1320.

34. **Finck C**, Meguid M, Numann PJ, Oler A. (1997). Periareolar Breast Abscess: Redefining the Disease and Its Treatment. *Medscape Womens Health*. 2(12):2.
35. **Franco Fraguas ML**, Savio Quevedo E (2008). Medicamentos Biotecnológicos. *Tendencias en Medicina*. 5-12.
36. **Gänzle MG** (2004). Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64(3): 326-332.
37. **Gibson GR** and Fuller R (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr*. 130(2): 391S-395S
38. **Golstein P** and Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 32(1):37-43.
39. **González-Andrade Fabricio** (2017). Medicamentos biológicos: presente y futuro de la terapéutica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
40. **Guandalini S** (2008). Probiotics for children with diarrhea. An Update. *J Clin Gastroenterol*; 42: 53-7.
41. **Hartmann EM**, García RF, Gazola VA, Barrena HC, Bazotte RB (2010). Investigation of glycemia recovery with oral administration of glycerol, pyruvate, and L-lactate during long-term, insulin-induced hypoglycemia. *J Diabetes Complications*. 24(5): 301-305.
42. **Hedayati-Hajikand T**, Lundberg U, Eldh C, Twetman S (2015). Effect of probiotic chewing tablets on early childhood caries - a randomized controlled trial. *BMC Oral Health*. 24.15(1):112
43. **Höltzel A**, Gänzle MG, Nicholson GJ, Hammes WP, Jung G (2000). The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl*. 4;39 (15):2766-2768.
44. **Holz C**, Alexander C, Balcke C, Moré M, Auinger A, Bauer M, Junker L, Grünwald J, Lang C, Pompejus M (2013). *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671 reduces *Mutans streptococci*: a short-term pilot study. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 5:259-263.
45. <https://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/default.htm>

46. **Indrio F**, Di Mauro A, Riezzo G (2014). Prophylactic use of a probiotic in the prevention of colic, regurgitation, and functional constipation a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr.* 168(3):228–233
47. **Iniesta M**, Zurbriggen M, Montero E, Herrera D (2011). Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. *Periodoncia y Osteointegración.* 21(3):171-179.
48. **Faseleh JM**, Wesam AY, Shokryazdan P, Ebrahimi R, Ebrahimi M, Idrus Z, Goh YM, Tufarelli V, Liang JB (2016). Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *Int J Biometeorol.* 60:1099.
49. **Jeevaratnam K**, Jamuna M and Bawa S (2005). Biological preservation of foods– Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J Biotechnol.* 4:446-454.
50. **Johnston B**, Goldenberg J, Vandvik P, Sun X, Guyatt G (2011). Probióticos para la prevención de la diarrea asociada con antibióticos en niños. *Cochrane Database of Systematic Reviews.*
51. **Jones ML**, Martoni CJ, Parent M, Prakash S (2012a). Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB-30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *British J Nutr.* 107(10):1505-1503.
52. **Jones ML**, Martoni CJ, Prakash S (2012b). Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 66(11):1234-41.
53. **Klaenhammer TR** (1988). Funcional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *Int Dairy J.* 8(5-6):497-505.
54. **Kosin B** and Rakshit SK (2006). Criteria for production of probiotics. *Food Technol. Biotechnol.* 44(3): 371-379.
55. **Krinke GJ** and Weber K. Histology (2012). In the laboratory mouse. Editor Hedrich H, Second Edition, *Academic Press Elsevier.* Pag. 161-192.
56. **Krishna M** and Nadler SG (2016). Immunogenicity to biotherapeutics - the role of anti-drug immune complexes. *Front. Immunol.* 7(21): 1-13.
57. **Kumar M**, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr.* 61:473–496 tesis

58. **Kumar R**, Singh J (2014). Biosimilar drugs: Current status. *Int J Appl Basic Med Res.* 4 (2): 63-6.
59. **Langen LV**, Mirjam A, Dieleman LA (2009). Prebiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 15:454–462
60. **Liu S**, Wang S, Lu S (2016). DNA immunization as a technology platform for monoclonal antibody induction. *Emerg Microbes Infect.* 6; 5: e33
61. **Madhwani T** and McBain AJ (2011). Bacteriological effects of a *Lactobacillus reuteri* probiotic on in vitro oral biofilms. *Arch Oral Biol.* 56(11):1264-73
62. **Madigan MT**, Martinko JM, Parker J (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10^a Ed. Ed. *Prentice Hall*. Madrid, España. pp. 122, 352, 400-402, 991
63. **Michel P**, Vial R, Rodriguez C, Ferrera R (2002). A comparative study of the most widely used solutions for cardiac graft preservation during hypothermia. *J Heart Lung Transplant.* 21(9): 1030-1039.
64. **Mohamadi-Sani MR**, Ehsani M, Mazaheri A (2005). Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 to inhibit some food-borne pathogens in UF-Feta-cheese. 9th International Conference on Agricultural Biotechnology; Ten years after International Consortium on Agricultural Biotechnology Research (ICABR), Ravello, Italia. Julio 6-10.
65. **Montiel R**, Martín-Cabrejas I, Gaya P, Medina M (2014). Reuterin and high hydrostatic pressure treatments on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and effect on the characteristics of cold-smoked salmon. *Food Bioprocess Tech.* 7(8): 2319-2329.
66. **Ning W**, Wang Y, Zhang F, Wang H, Wang F, Wang X, Liu Z (2013). Beneficial effects of trypsin inhibitors derived from a spider venom peptide in L-arginine-induced severe acute pancreatitis in Mice. *PLoS One.* 8(4): e61049.
67. **O'Brien JG**, Chennubhotla SA, Chennubhotla RV (2005). Treatment of edema. *Am Fam Physician.* 71(11):2111-2117.
68. **OECD** (2000). Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity-fixed dose procedure. 1-14. 420 Adopted 17th December 2001.
69. **OECD** (2000). Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 423, 2000.

70. **OECD** (2000a). Organisation for Economic Co-operation and Development (Paris 2000). Guidelines for testing of chemicals. Number 420. Acute oral toxicity-fixed dose procedure 1-14.
71. **OECD** (2001a). Organisation for Economic Cooperation and Development. Two-Generation Reproduction Toxicity Study. OECD guidance 416 adopted 22-01-2001.
72. **OECD** (2001b). Organisation for Economic Co-operation and Development (Paris 2001). Guidelines for testing of chemicals. Number 33. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures.
73. **OECD** (2008). Organisation for Economic Co-operation and Development (Paris 2008). Guidelines for testing of chemicals: repeated dose 28-day oral toxicity in rodents. Acute oral safety limit study in rats and mice procedure 1-11.
74. **OECD** (2009). (Organisation for Economic Cooperation and Development), ENV/JM/MONO (2009)28) Guidance document on acute inhalation toxicity testing. guidance 39 adopted 21-07-2009.
75. **OECD** (2012). Organisation for Economic Cooperation and Development. Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. *OECD guidance* 443 adopted 02-10-2012.
76. **OECD** (2013). Toward New Models for Innovative Governance of Biomedicine and Health Technologies, OECD Science, Technology and Industry Policy Papers, No. 11, OECD 2013.
77. **OECD** (2016a). (Organisation for Economic Cooperation and Development). Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. *OECD guidance* 421 adopted 29-7-2016.
78. **OECD** (2016b). (Organisation for Economic Cooperation and Development). Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. *OECD guidance* 422 adopted 29-7-2016.
79. **Papadimitriou K**, Zoumpopoulou G, Foligné B, Alexandraki V, KazouM, Pot B and Tsakalidou E (2015). Discovering probiotics microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front Microbiol.* 6(58):1-28.

80. **Parasuraman S** (2011). Toxicological screening. *J Pharmacol Pharmacother.* 2(2), 74–79.
81. **Patel MA**, Ou MS, Harbrucker R, Aldrich HC, Buszko ML, Ingram LO, Shanmugam KT (2006). Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl Environ Microbiol.* 72(5): 3228-3235.
82. **Pediamécum** (2015). Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Edición 2015. ISSN 2531-2464. <http://pediamecum.es/aciclovir/>
83. **PhRMA** (2013). The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. Medicines in Development Biologics presented. 2013 Report. <http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/biologics2013.pdf>
84. **Pranchevicius MC**, Vieira TR (2013). Production of recombinant immune therapeutics for anticancer treatment: the role of bioengineering. *Bioengineered.* 4 (5):305-12.
85. **Punchard NA**, Whelan CJ, Adcock I (2004). The Journal of Inflammation. *Journal of Inflammation.* 1:1.
86. **Ramírez-Agudelo M** and Rojas-López M (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23 (2), 166-177.
87. **Raza M**, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA (2002). Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Sci Pharm.* 70(2): 135-45.
88. **Reid G** and Hammond JA (2005). Probiotics. Some evidence of their effectiveness. *Canadian Family Physician.* 51(11):1487-1493.
89. **Reuter G.** (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2(2):43-53.
90. **Roger VL** et al. (2012). Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics. Update. *Circulation.*125: 188-197.
91. **Ruiz-Moyano S**, Martín A, Benito MJ, Casquete R, Serradilla MJ, Córdoba M de G (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 83(3): 460-7.

92. **Sachana M** and Hargreaves AJ (2018). Toxicological testing: *In vivo* and *In vitro* models. *Veterinary Toxicology (Third Edition) Basic and Clinical Principles*. (9):145-161.
93. **Sanders ME**, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 1(3): 164-85.
94. **Sanders ME**, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley E, Sartor RB, Sherman P, Mayer EA (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut Microbes*. 62: 787-796.
95. **Saran S**, Gopalan S, Krishna TP (2002). Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutr*.18:393-396
96. **Sazawal S**, Dhingra U, Hiremath G, Sarkar A, Dhingra P, Dutta A, MenonVP, Black RE (2004). Efficacy of milk fortified with a probiotic *Bifidobacterium lactis* (DR-10TM) and prebiotic galacto-oligosaccharides in prevention of morbidity and on nutritional status. *Asia Pac J Clin Nutr*.13:S28.
97. **Singh VP**, Sharma J, Babu S, Rizwanulla and Singla A (2013). Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc*. 63(2):253-7
98. **Schaefer L**, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiol*. 156(Pt6): 1589-1599.
99. **Shokryazdan P**, Faseleh JM, Liang J B, Kalavathy R, Sieo CC and Ho YW (2016). Safety assessment of two new *Lactobacillus* strains as probiotic for human using a rat model. *PloS One*. 11(7), e0159851.
100. **Schwaiblmair M**, Behr W, Haeckel T, Märkl B, Foerg W, Berghaus T (2012). Drug induced interstitial lung disease. *The Open Resp Med J*. 6: 63-74.
101. **Serhan CN**, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LAJ, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB J*. 21(2): 325-332.
102. **Shahani KM** and Ayebo AD. (1980). Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr*. 33(11):2448-57.

103. **Shigemori S**, Watanabe T, Kudoh K, Ihara *et al* (2015). Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice. *Microb Cell Fact.* 14(189): 112-189.
104. **Shokryazdan P**, Faseleh-Jahromi M, Liang JB, Kalavathy R, Sieo CC and Ho YW (2016). Safety assessment of two new *Lactobacillus Strains* as probiotic for human using a rat model. *PloS One*, 11(7).
105. **Sidhu GK**, Mantha S, Murthi S, Sura H, Kadaru P and Ingra JK (2015). Evaluation of *Lactobacillus* and *Streptococcus mutans* by addition of probiotics in the form of curd in the diet. *J Int Oral Health.* 7(7):85-9.
106. **Spormann H**, Sokolowski A, Letko G (1989). Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Path Res Pract.* 184(5): 507-513.
107. **Srivastava S**, Saha S, Kumari M and Mohd S (2016). Effect of probiotic curd on salivary pH and *Streptococcus mutans*: a double blind parallel randomized controlled trial. *J Clin Diag Res. JCDR*, 10(2), ZC13-6.
108. **Stanton C**, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, Ross RP (2001). Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr.* 73(2 Suppl): 476S-483S.
109. **Stella P**, Gold-von Simson G. (2014). Pharmaceutical pricing, cost containment and new treatments for rare diseases in children. *Orphanet J Rare Dis.* 28; 9:152.
110. **Straat M**, van Bruggen R, de Korte D, Juffermans NP (2012). Red Blood Cell Clearance in Inflammation. *Transfus Med Hemother.* 39(5): 353-361.
111. **Talarico TL** and Dobrogosz WJ (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chem.* 33(5): 674-679.
112. **Thirabunyanon M**, Boonprasom P, Niamsup P (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett.* 31:571–576.
113. **Thompson SW** and Hunt RD (1966). Selected histochemical and histopathological methods. *Charles C Thomas Publisher, Ltd.*, P.O. Box 9568, Springfield, IL.
114. **Torras J**, Grinyó JM (2005). Líquidos y técnicas de preservación de órganos. En: Valero R, Páez G, editores. Manual de coordinación de trasplantes. Barcelona: TPM-Les Heures-Universitat de Barcelona. Pp. 185-202.

115. **Trosset JY**, Carbonell P (2015). Synthetic biology for pharmaceutical drug discovery. *Drug Des Devel Ther.* 3; 9: 6285-302.
116. **Urrutia-Baca V**, Escamilla-García E, De la Garza-Ramos MA, Taméz-Guerra P, Flores-Gómez R, Cynthia Urbina-Ríos (2017). *In vitro* antimicrobial activity and downregulation of virulence gene expression on *Helicobacter pylori* by reuterin. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 1-8.
117. **Vargesson N** (2018). The teratogenic effects of thalidomide on limbs. *J Hand Surg-Eur Vol.*
118. **Vollenweider S** and Lacroix C (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(1): 16-27.
119. **World Health Organization**. World Human Organization Committee Report on Biological Standardization, Technical Report Serie 926, Edition 53, 2007, (www.who.int/biologicals/en)
120. **World Health Organization (2011)**. HO. Medis, S., Puska, P. and B. Norving, eds. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.
121. **Wuollet E**, Laisi S, Salmela E, Ess A, Alaluusua S (2016). Molar-incisor hypomineralization and the association with childhood illnesses and antibiotics in a group of Finnish children. *Acta Odontol Scand.* 74(5):416-22.
122. **Zacharof MP** and Lovitt R (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *Procedia APCBEE.* 2(2012): 50-56.
123. **Zalán Z**, Hudáček J, Štětina J, Chumchalová J, Halász A (2010). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur Food Res Technol.* 230(3): 395-404.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Sergio Francisco De la Garza Guajardo

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Tesis: ESTUDIO DE INOCUIDAD TISULAR DE LA REUTERINA AISLADA DE *Lactobacillus reuteri*, EN RATONES C57BL/6

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas / Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Sabinas, Coahuila el 25 de Febrero de 1987, hijo de Sergio Francisco de la Garza Guajardo y Blanca Margarita Guajardo Valdez originarios de Sabinas, Coahuila.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista.

Experiencia Profesional: Becario del departamento de Anestesiología, Servicio Social en el Hospital Regional Materno Infantil de alta Especialidad Guadalupe, Nuevo León. Residente rotatorio Hospital Infantil de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas, Miembro oficial Academia de Odontología Pediátrica y Practica privada del 2011 a la fecha.

APÉNDICE

Formato de Reporte de Casos FCR



Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL
Unidad de Ensayos Clínicos



FORMATO DE REPORTE DE CASO FRC (CASE REPORT FORMAT – CRF)

	Día 02	Día 03	Día 04	Día 05	Día 06	Día 07	Día 08
01	SI No						
02	SI No						
03	SI No						
04	SI No						
05	SI No						
06	SI No						
07	SI No						
08	SI No						
09	SI No						
10	SI No						
11	SI No						
12	SI No						
13	SI No						



PROGRAMA DE CAPTURA DE DATOS

- Microsoft Excel, office 2010.
- Software de Estadística STATA-13.