

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Reporte de Servicio Social

**Cuantificación de bacterias intestinales en ratones
sometidos a estrés por restricción de movimiento**

Alumno: María Fernanda Martínez Salgado

Matrícula: 2163063761

Fecha inicio: 15 septiembre 2022 - Fecha fin: 15 marzo 2023

Asesoras:

María Elisa Drago S.

Dra. María Elisa Drago Serrano

Nombre y firma de asesor
interno

Fabiola Guzmán Mejía

Dra. Fabiola Guzmán Mejía

Nombre y firma de asesor
externo

ÍNDICE

I. Resumen	3
II. Abstract	4
III. Introducción	5
IV. Antecedentes	5
IV. I Microbiota intestinal	5
IV.II Estrés	7
V. Planteamiento del problema y justificación	8
VI. Objetivo general	8
VI.I. Objetivos específicos	8
VII. Materiales y métodos	9
VII.I Animales	9
VII.II Modelo de estrés	9
VII.III Modelo experimental	9
VII.IV Recolección y procesamiento de muestras	9
VII.V Cultivo de muestras	10
VII.VI Estadística	10
VIII. Resultados	10
VIII.I Cuenta bacteriana de aerobios en medio TSA	11
VIII.II Cuenta bacteriana de lactobacilos en medio MRS	13
VIII.III Cuenta bacteriana de bifidobacterias en medio TOS	15
IX. Análisis de Resultados y Conclusión	18
X. Recomendaciones	18
XI. Referencias	19
XII. Anexo 1	20
XII.I Medios de cultivo	20
XII.I.I Para realizar el medio TSA:	20
XII.I.II Para realizar el medio MRS:	21
XII.I.III Para realizar el medio TOS:	21
XII.II Equipos	22

Resumen

Introducción. El estrés es un estímulo ambiental, percibido como señal de alarma que desencadena un efecto fisiológico de lucha y huida en el organismo. El estrés causa disbiosis de la microbiota intestinal asociada a la inflamación **Justificación.** Este estudio podría ser un referente experimental para evaluar el efecto de fármacos sobre la microbiota intestinal en algunas enfermedades asociadas al estrés **Objetivo.** Evaluar el efecto del estrés por restricción de movimiento sobre la cuenta bacteriana fecal. **Material y Métodos.** Un lote de 12 ratones BALB /c machos de 7 semanas de vida, se dividió en un grupo estresado (n=6) y un grupo control (n=6). Los ratones estresados fueron introducidos en tubos cónicos de 50 mL horadados por periodos de 30 a 120 minutos durante 7, 14 y 22 días. Tras el periodo de estrés, las heces se recolectaron y se prepararon diluciones seriadas en caldo tioglicolato, para el cultivo en agar TSA, MRS y TOS a una temperatura de 37°C. Las placas de TSA se incubaron en aerobiosis por 24 h para el conteo de aerobios. Las placas de MRS se incubaron en anaerobiosis por 48 h para la cuenta de lactobacilos. Las placas de TOS se incubaron por 72 h en anaerobiosis para el conteo de bifidobacterias. Los datos se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) y fueron analizados con la prueba t de Student; las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0.05$ **Resultados.** En comparación con el grupo control, se observó que la cuenta de lactobacilos aumentó significativamente a los 7 días de estrés (dil. 1:250 $p = 0.0419$ y dil. 1:2500 $p = 0.0172$). Sin embargo, no se observaron otras diferencias estadísticamente significativas en los ensayos posteriores. **Conclusión.** Con base en lo anterior se logró el objetivo, no obstante, es importante afinar el modelo para mejorar su reproducibilidad a fin de evaluar a futuro fármacos algunas enfermedades asociadas al estrés.

Palabras clave: microbiota intestinal, estrés, lactobacilos, bifidobacterias, aerobios, disbiosis.

I. Abstract

Introduction. Stress is an environmental stimulus, perceived as an alarm signal that triggers a physiological fight and flight effect in the body. Stress causes dysbiosis of the intestinal microbiota associated with inflammation **Justification.** This study could be an experimental reference to evaluate the effect of drugs on the intestinal microbiota under stress conditions **Aim.** To evaluate the effect of stress due to movement restriction on the fecal bacterial count. **Material and methods.** A batch of twelve 7-week-old male BALB/c mice were divided into a stressed group (n=6) and a control group (n=6). Stressed mice were placed in 50 mL conical tubes perforated for 30 to 120 minutes; stress experiments of 7 and 14 days were accomplished twice, whereas stress of 22 days was carried out in a single trial. After the stress period, the feces were collected and serial dilutions were prepared in thioglycolate broth, for cultivation on TSA, MRS and TOS agar at a temperature of 37°C. The TSA plates were incubated aerobically for 24 h. The MRS plates were incubated anaerobically for 48 h. The TOS plates were incubated for 72 h anaerobically. Total number of colonies were counted and data were expressed in colony-forming units per gram (CFU/g) and analyzed with Student's t-test; the differences were considered significant with values of $p < 0.05$ **Results.** Compared with the control group, it was observed that the lactobacilli count increased significantly after 7 days of stress (dil. 1:250 $p = 0.0419$ and dil. 1:2500 $p = 0.0172$). However, no other statistically significant differences were observed **Conclusion.** Based on the above, the objective was achieved, however, it is important to refine the model to improve its reproducibility in order to evaluate future drugs under stress conditions.

Keywords: intestinal microbiota, stress, lactobacilli, bifidobacteria, aerobes, dysbiosis.

II. Introducción

La microbiota intestinal tiene una contribución nutricional al favorecer la degradación de glúcidos de la dieta y al proveer metabolitos esenciales para el hospedero como las vitaminas (Fagundes CT, 2012), otra función clave radica en su capacidad de modular la función de la barrera intestinal (Grenham S., 2011), así como modular la respuesta innata y adaptativa de la inmunidad y en la inflamación intestinal (Fagundes C. T, 2012).

El estrés se define como la respuesta de supervivencia de un organismo vivo. El estrés conlleva la percepción en el cerebro de un evento considerado una señal de alarma que induce una respuesta neuroendocrina (Bathia et al., 2011). El estrés puede alterar a la microbiota que tiene un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal.

En este protocolo muestra los datos sobre el efecto del estrés sobre algunos componentes de la microbiota como las bifidobacterias, lactobacilos y aerobios.

III. Antecedentes

IV. I Microbiota intestinal

El intestino es considerado el mayor reservorio de gérmenes del organismo y constituye la barrera fisiológica entre el medio interno y el externo, además de desempeñar una función protagónica en la nutrición y regulación inmunológica del ser humano (Herguendas, A. J. U., Bartolomé, M. I. U., 2022).

En el intestino se encuentra la microbiota intestinal que es el conjunto de microorganismos, entre los cuales se encuentran los lactobacilos, las bacterias aerobias y las bifidobacterias (Veintimilla D., Frías E., 2020).

La microbiota intestinal se adquiere inmediatamente después del nacimiento y está influida por numerosos factores como el tipo de parto, edad gestacional, alimentación inicial, exposición a antibióticos, etc. (Álvarez, J. et al., 2021) inicialmente diversos géneros de aerobios son los más abundantes en el tubo digestivo y progresivamente se establece un microsistema en el que predominan especies anaerobias obligadas.

De acuerdo con la actividad metabólica, las bacterias presentes en la microbiota intestinal de los adultos se pueden dividir en tres grupos, siendo los siguientes: 1- Bacterias productoras de ácido láctico donde se incluyen los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus*. 2.- Bacterias de putrefacción como *Clostridium prefringens*,

Bacterioides, *E. coli*, etc y 3.- Otros tipos como las *Eubacterium*, *Ruminococcus*, etc. (Gomez, M., Acero, F., 2011)

La abundancia bacteriana y los géneros predominantes varían dependiendo la región del tracto digestivo, por ejemplo, dentro del intestino delgado en los dos tercios superiores (duodeno y yeyuno) predominan las especies Gram positivas como *Lactobacillus*, mientras que en ileon semeja, en su gran mayoría, a la microbiota del colon donde existe una mayor concentración de anaerobios siendo esta de un 99.9% encontrando *Bifidobacterias*, *Clostridios*, *Enterobacterias*, entre otros. (F. Guarner, 2003)

Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, anaeróbicas o aeróbicas facultativas que se ubican generalmente en lugares con grandes fuentes de carbohidratos disponibles; por lo tanto, se encuentran en una variedad de hábitat tales como las membranas de las mucosas de seres humanos y de animales como por ejemplo el intestino. Su principal característica es la producción de bacteriocinas (sustancia antimicrobiana). También producen sustancias tales como aminas, amoníaco, compuestos fenólicos, peróxido de hidrógeno que influyen en el mejoramiento del ambiente intestinal; y las cepas de *L. acidophilus*, produce algunos péptidos que intervienen como inhibidores del crecimiento de otros microorganismos. (Giraldo, D. J, 2009).

Las bifidobacterias son bacterias anaeróbicas Gram positivas. Estas actúan en el proceso de maduración de la composición microbiana intestinal, lo que genera una gran cantidad de beneficios para la salud como limitar la colonización del intestino por microbios patógenos, fortalecer la función de la barrera intestinal, degradar la fibra dietética y proporcionar nutrientes esenciales (Giraldo, D. J, 2009). De igual manera, se ha determinado que las bifidobacterias juegan un papel importante en la salud intestinal ya que el correcto equilibrio de esta cepa puede influir positivamente sobre la perístasis intestinal, la prevención del cáncer, el metabolismo del colesterol y de los carbohidratos en el colon(Hartemink et al, 1999), también ayuda en la prevención de respuestas inflamatorias inadecuadas que pueden favorecer al desarrollo de alergias, diabetes tipo 1 y enfermedades inflamatorias del intestino (Brunser T. O., 2013). En un estudio reciente se demostró que la baja abundancia de esta cepa y su falta de metabolizar oligosacáridos está relacionada con la inflamación intestinal (Andreu Prados, 2022).

La microbiota intestinal tiene una contribución nutricional al favorecer la degradación de glúcidos de la dieta y al proveer metabolitos esenciales para el hospedero como las vitaminas (Fagundes CT, 2012), otra función clave radica en su capacidad de modular la función de la barrera intestinal (Grenham S., 2011), así como modular la respuesta innata y

adaptativa de la inmunidad y en la inflamación intestinal (Fagundes C. T, 2012). En condiciones de eubiosis (crecimiento microbiano balanceado), la microbiota contribuye al antagonismo microbiano que evita la colonización de agentes patógenos y modula la translocación bacteriana intestinal, entendida como la salida extra intestinal de la microbiota. La microbiota contribuye a la adecuada función de la barrera intestinal. La función de barrera intestinal se refiere a la capacidad de permitir el paso de moléculas inocuas e impedir el acceso de moléculas dañinas al medio interno.

Existen factores como el estrés que pueden causar disbiosis (desequilibrio en crecimiento) al alterar la colonización normal de componentes de la microbiota intestinal (Gritsenko V.A., 2000) El impacto del estrés sobre la alteración de la microbiota puede modificar la función de la barrera intestinal (Muraoka M, et al., 2005).

IV.II Estrés

El estrés se define como la captación sensorial y cognitiva de un estímulo ambiental (estresor), percibida como señal de alarma por el sistema nervioso central (percepción) que desencadena a su vez, un efecto fisiológico de lucha y huida en el organismo (respuesta) (Brzozowski et al., 2016). En otras palabras, el estrés se entiende como un sistema de alerta biológico activado para la supervivencia, al ser un conjunto de reacciones, éstas desencadenan consecuencias que pueden llegar a afectar distintos órganos del cuerpo. Dependiendo de su frecuencia se puede clasificar en estrés agudo o crónico. En el estrés agudo ocurre un único evento de exposición en tanto que el estrés crónico consiste en eventos repetidos de exposición. La duración de la exposición del estresor en el estrés agudo puede ser de minutos u horas mientras que en el estrés crónico también puede ser de días (Dhabhar FS, 2009).

Mecanísticamente, algunos modelos experimentales demuestran que el estrés modifica la proliferación de la microbiota intestinal asociada a la reducción de tránsito y movilidad intestinal.

IV. Planteamiento del problema y justificación

El planteamiento de este reporte reside en que un número limitado de estudios se han enfocado a evaluar el efecto del estrés sobre los componentes de la microbiota que tienen un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. La justificación de este protocolo radica en que podría ser un referente experimental para evaluar los efectos sobre la proliferación de bacterias intestinales en condiciones de estrés como ocurre en algunos padecimientos humanos como colitis ulcerativa, gastritis y el síndrome de intestino irritable. La originalidad de este estudio se basa en que es la primera vez que se evalúa la restricción de movimiento sobre la cuenta de lactobacilos, bifidobacterias y aerobios.

V. Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés por restricción de movimiento durante 7, 14 y 22 días sobre la cuenta bacteriana en heces de ratones BALB/c.

VI.I. Objetivos específicos

En heces de ratones sometidos a estrés por restricción de movimiento cuantificar:

Bifidobacterias, lactobacilos y aerobios totales.

VI. Materiales y métodos

VII.I Animales

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la UAM-Xochimilco (UPEAL, Protocolo no. 229, aprobado el 30 de junio 2022 con 5 años de vigencia DCBS.CICUAL.005.22). Los ratones se dejaron aclimatar a temperatura de 20°C, con humedad relativa de 55% y ciclo de luz/oscuridad 12/12 h con luz encendida de 7:00 am a 7:00 pm. Los ratones fueron provistos con alimento comercial (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet Saint Louis, MO, USA) y agua a libre demanda durante el periodo de adaptación (1 semana). Al final la intervención experimental se aplicó en la semana 7 de vida.

VII.II Modelo de estrés

Los ratones se introdujeron orientados hacia el fondo en tubos cónicos de 50 mL con perforaciones para permitir la ventilación, así mismo se hizo una perforación en la tapa del tubo con el objetivo de sacar la cola del ratón durante el proceso. Una vez introducidos en los tubos se pusieron unos tapones de espuma de 5 cm de largo en la parte trasera, junto a la tapa para lograr la inmovilización de los ratones.

Una vez dentro de los tubos, los ratones se colocaron en una caja con encamado para evitar que los tubos se rodaran. Además, para evitar el contacto visual entre los ratones se colocaron separaciones.

Durante el proceso de estrés, se estuvieron vigilando los ratones constantemente para verificar que los tubos no se rodaran y checar el comportamiento de éstos.

VII.III Modelo experimental

Un lote de 12 ratones se dividió en un grupo control (n=6) y un grupo estrés (n=6). Los ratones del grupo estrés fueron introducidos en tubos cónicos de 30 minutos a 2 horas, en horarios diferentes durante 7, 14 y 22 días, mientras que a los ratones del grupo control, al iniciar el modelo se colocaron en una caja limpia donde se les retiró alimento y agua.

VII.IV Recolección y procesamiento de muestras

1. Las muestras de heces fueron recolectadas en tubos de 2.0 mL adicionados con 500 µL de caldo tioglicolato previamente pesado. Para la preparación de las muestras se realizaron diluciones seriadas en caldo tioglicolato de las muestras de heces

2. La primera dilución se realizó agregando 40 μL de las muestras en tubos de 2.0 mL adicionados con 960 μL de caldo tioglicolato para obtener la dilución 1:25, una vez agregados se procedió a agitar con ayuda de un vortex.

3. Una vez agitada la dilución 1:25, se tomaron 100 μL con una micropipeta y se añadieron a un tubo de 2 mL adicionados con 900 μL de caldo para conseguir la dilución 1:250, una vez agregados procedió agitar nuevamente.

4. Al terminar la agitación, se tomaron nuevamente 100 μL de la dilución 1:250 y se agregaron a un tubo de 2 mL adicionado con 900 μL de caldo para conseguir la última dilución que fue 1:2500.

VII.V Cultivo de muestras

1. Para realizar la siembra de las 3 diluciones en una misma placa, se hicieron 3 divisiones en las cajas de Petri y fueron marcadas de acuerdo a la dilución.

2. Una vez divididas las cajas Petri se prosiguió a realizar el sembrado tomando 10 μL de las diluciones y colocando al centro del área marcada. Esto se hizo en orden de menor concentración a mayor concentración.

3. Las placas de agar TSA se incubaron a 37 °C en condiciones de aerobiosis por 24 horas para llevar a cabo la cuenta de aerobios totales. Las placas de agar MRS se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 48 horas para realizar la cuenta de lactobacilos totales. Las placas de agar TOS se incubaron 37 °C por 72 horas para realizar la cuenta de bifidobacterias totales.

Se realizó el conteo de colonias y los datos se reportaron como unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g).

VII.VI Estadística

Se hicieron por duplicado los ensayos de 7 y 14 días de estrés, para 22 días se realizó solamente 1 ensayo.

Los resultados obtenidos del grupo control sin estrés y el grupo sometido a estrés fueron comparados y el análisis estadístico se realizó usando la prueba paramétrica de t de Student. Las diferencias significativas fueron consideradas con un valor de $p < 0.05$.

VII. Resultados

VIII.I Cuenta bacteriana de aerobios en medio TSA

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de aerobios en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 7 días de estrés se muestran en la **Tabla 1**.

UFC/g 7 días aerobios			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
57947	20040	0	100200
275673	81227	484007	90253
88183	553435	132275	620229
26155	352250	43592	782779
124894	131910	127011	565327
49063	48611	89206	138889
20695	70140	41391	100200
2104	180505	126263	90253
61728	128817	132275	95420
13078	195695	21796	146771
33870	150754	63506	188442
55754	62500	200714	69444

Tabla 1. Se muestran los datos de UFC/g de bacterias aerobias sembradas en TSA obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 7 días.

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de aerobios en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 14 días de estrés se muestran en la **Tabla 2**.

UFC/g 14 días aerobios			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
877997	2277563	952045	4352031
0	474768	0	564409
1081378	1024590	1282991	2493169
775656	874126	894988	3758741
43103	467332	1005747	839383
707031	667727	1171875	675676
115639	95199	220264	248344
86705	5171	96339	25853
124000	63830	80000	106383
10232	120293	0	261506
46053	256623	65789	289735
137931	4333	49261	0

Tabla 2. Se muestran los datos de UFC/g de bacterias aerobias sembradas en TSA obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 14 días.

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de aerobios en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 22 días de estrés se muestran en la **Tabla 3**.

UFC/g 22 días aerobios			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
71542	8475	119237	42373
18610	7174	124069	35868
811632	26042	694444	26042
42835	0	38941	0
47578	0	0	0
133657	11013	182260	36711

Tabla 3. Se muestran los datos de UFC/g de bacterias aerobias sembradas en TSA obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 22 días.

Los datos correspondientes a la dilución 1:250 y 1:2500 se presentan en la **Figura 1 A** y **1 B** respectivamente. En la **Figura 1 A** se puede observar que en comparación con el grupo control, el estrés durante 7 y 14 días incrementó la cuenta bacteriana, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo. En tanto que 22 días de estrés causaron una disminución en la cuenta bacteriana de aerobios respecto al grupo control, sin mostrar significancia estadística. Estos resultados tuvieron el mismo comportamiento en la dilución 1:2500 (**Figura 1 B**). Los valores de p obtenidos en el análisis estadístico se muestran en la **Tabla 4**.

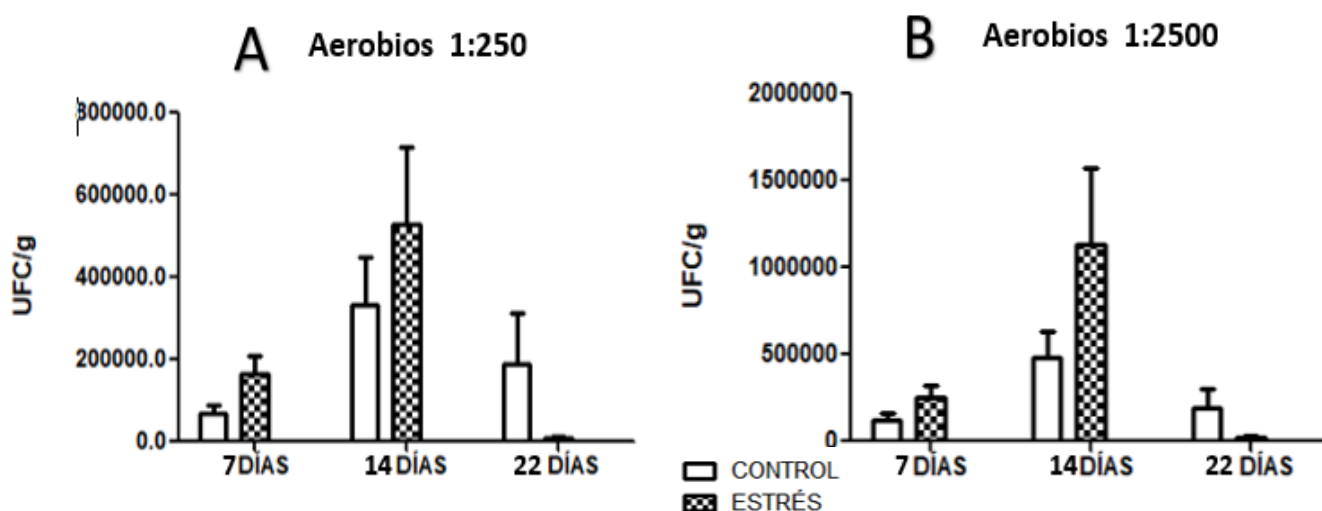


Figura 1. La figura presenta las UFC/g de muestra a los 7, 14 y 22 días en ratones control y ratones estrés en el medio de cultivo TSA. A) Dilución 1:250 y B) dilución 1:2500.

Aerobios			
Días de estrés	Dilución	Valor p	Diferencia significativa
7 días estrés	1:250	0.0575	No
	1:2500	0.1334	No
14 días estrés	1:250	0.3885	No
	1:2500	0.1762	No
22 días estrés	1:250	0.1858	No
	1:2500	0.1339	No

Tabla 4. Presenta los valores de p obtenidos en la cuenta de aerobios en medio TSA en las diluciones 1:250 y 1:2500.

VIII.II Cuenta bacteriana de lactobacilos en medio MRS

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de lactobacilos en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 7 días de estrés se muestran en la **Tabla 5**.

UFC/g 7 días lactobacilos			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
82781	45090	0	50100
214646	72202	273569	45126
52910	562977	44092	572519
320401	371820	0	293542
139712	131910	105843	125628
73595	104167	44603	138889
33113	70140	41391	50100
33670	252708	21044	225632
39683	190840	132275	238550
26155	239726	21796	391389
14818	257538	42337	62814
40143	97222	89206	208333

Tabla 5. Se muestran los datos de UFC/g de lactobacilos cultivados en MRS obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 7 días.

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de lactobacilos en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 14 días de estrés se muestran en la **Tabla 6**.

UFC/g 14 días lactobacilos			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
81100	623791	81100	773694
5637	59761	5637	33201
164956	348361	164956	204918
83532	268065	83532	349650
409483	124773	409483	362976
101563	143084	101563	397456
121145	91060	55066	41391
110790	0	144509	0
156000	159574	80000	319149
0	141213	0	156904
105263	273179	65789	413907
172414	8666	172414	0

Tabla 6. Se muestran los datos de UFC/g de lactobacilos cultivados en MRS obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 14 días

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de lactobacilos en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 22 días de estrés se muestran en la **Tabla 7**.

UFC/g 22 días lactobacilos			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
67568	50847	119237	0
173697	28694	0	35868
759549	145833	1215278	0
58411	13417	38941	0
47578	4065	43253	0
218712	18355	273390	36711

Tabla 7. Se muestran los datos de UFC/g de lactobacilos cultivados en MRS obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 22 días.

Los datos correspondientes a la dilución 1:250 y 1:2500 se presentan en la **Figura 2 A y 2 B** respectivamente. En la **Figura 2 A** se observa que en comparación con el grupo control, en el grupo estrés durante los días 7 y 14 incrementó la cuenta bacteriana, dicho incremento fue significativamente diferente a los 7 días de estrés, mientras que a los 14 días el estrés no generó cambios significativos en la cuenta bacteriana. Por otra parte, se observó que el estrés durante 22 causó una disminución en la cuenta bacteriana de lactobacilos comparado al grupo control sin mostrar significancia estadística. Estos resultados tuvieron el mismo

comportamiento en la dilución 1:2500 (**Figura 2 B**). Los valores de p obtenidos en el análisis estadístico se muestran en la **Tabla 8**.

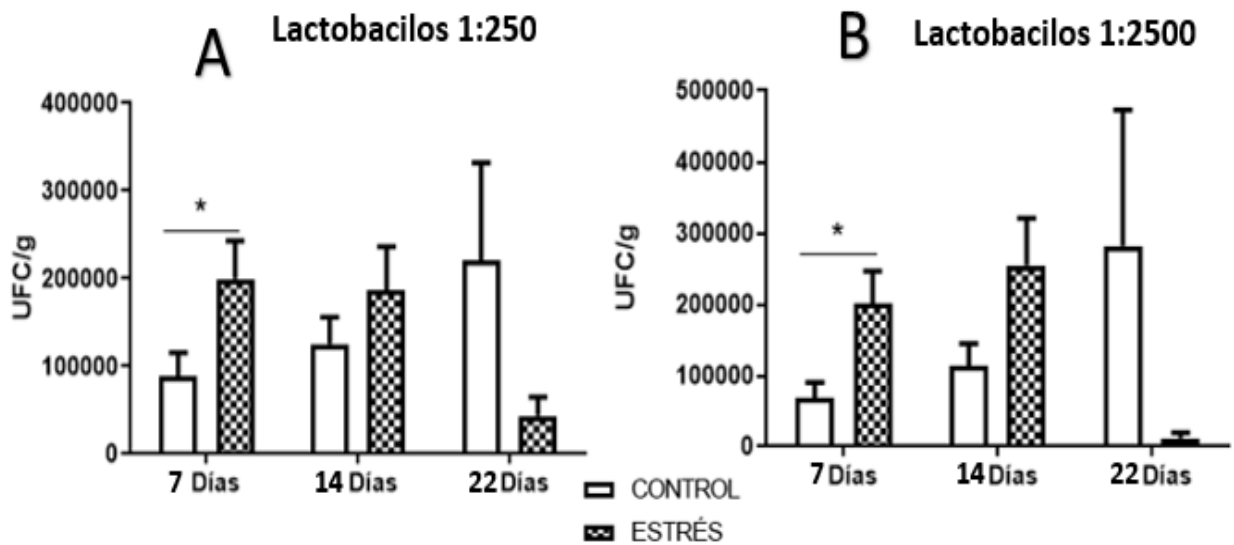


Figura 2. Presenta las UFC/g a los 7, 14 y 22 días en ratones control y ratones estrés de lactobacilos en el medio de cultivo MRS. A) Dilución 1:250 y B) dilución 1:2500.

Lactobacilos			
Días de estrés	Dilución	Valor p	Diferencia significativa
7 días estrés	1:250	0.0419	Si
	1:2500	0.0172	Si
14 días estrés	1:250	0.3101	No
	1:2500	0.067	No
22 días estrés	1:250	0.149	No
	1:2500	0.1886	No

Tabla 8. Presenta los valores de p obtenidos en la cuenta de lactobacilos en medio MRS en las diluciones 1:250 y 1:2500.

VIII.III Cuenta bacteriana de bifidobacterias en medio TOS

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de bifidobacterias en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 7 días de estrés se muestran en la **Tabla 9**.

UFC/g 7 días bifidobacterias			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
343543	415832	3435430	4158317
18939	419675	189394	4196751
771605	1431298	7716049	14312980
653880	1663405	6538797	16634050
586367	471106	5863675	4711055
187333	1986111	1873327	19861110
0	50100	0	0
14731	90253	21044	45126
4409	90649	0	47710
6539	107632	0	0
29636	169598	0	502513
51293	145833	22302	902778

Tabla 9. Se muestran los datos de UFC/g de bifidobacterias sembradas en TOS obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 7 días.

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de bifidobacterias en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 14 días de estrés se muestran en la **Tabla 10**.

UFC/g 14 días bifidobacterias			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
98731	101547	0	48356
11274	26560	0	0
150293	382514	146628	341530
38783	262238	0	203963
959052	77132	646552	90744
74219	55644	78125	119237
5507	12417	0	0
67437	0	48169.56	0
28000	10638	0	0
20464	15690	0	0
0	45530	0	124172.2
7389	0	49261.08	0

Tabla 10. Se muestran los datos de UFC/g de bifidobacterias sembradas en TOS obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 14 días.

Los resultados obtenidos de la cuenta en placa de bifidobacterias en UFC/g de las muestras de heces obtenidas durante 22 días de estrés se muestran en la **Tabla 11**.

UFC/g 22 días bifidobacterias			
1:250		1:2500	
Control	Estrés	Control	Estrés
47695	12712	119236.9	0
12407	32281	62034.74	35868
169271	18229	43402.78	26041.67
31153	4472	0	0
30277	0	43252.59	0
69866	22026	0	36710.72

Tabla 11. Se muestran los datos de UFC/g de bifidobacterias sembradas en TOS obtenidos de las muestras de heces de ratones sometidos a estrés durante 22 días.

Los datos correspondientes a la dilución 1:250 y 1:2500 se presentan en la **Figura 3 A y 3 B** respectivamente. En la **Figura 3 A** se observa que, en comparación con el grupo control, el estrés durante 7 días incrementó la cuenta bacteriana sin ser estadísticamente diferente. En los 14 y 22 días de estrés se observó una disminución en la cuenta bacteriana de bifidobacterias al ser comparado con el grupo control, sin embargo, dicha disminución no fue significativamente diferente. Estos resultados tuvieron el mismo comportamiento en la dilución 1:2500 (**Figura 3 B**). Los valores de p obtenidos en el análisis estadístico se muestran en la **Tabla 8**.

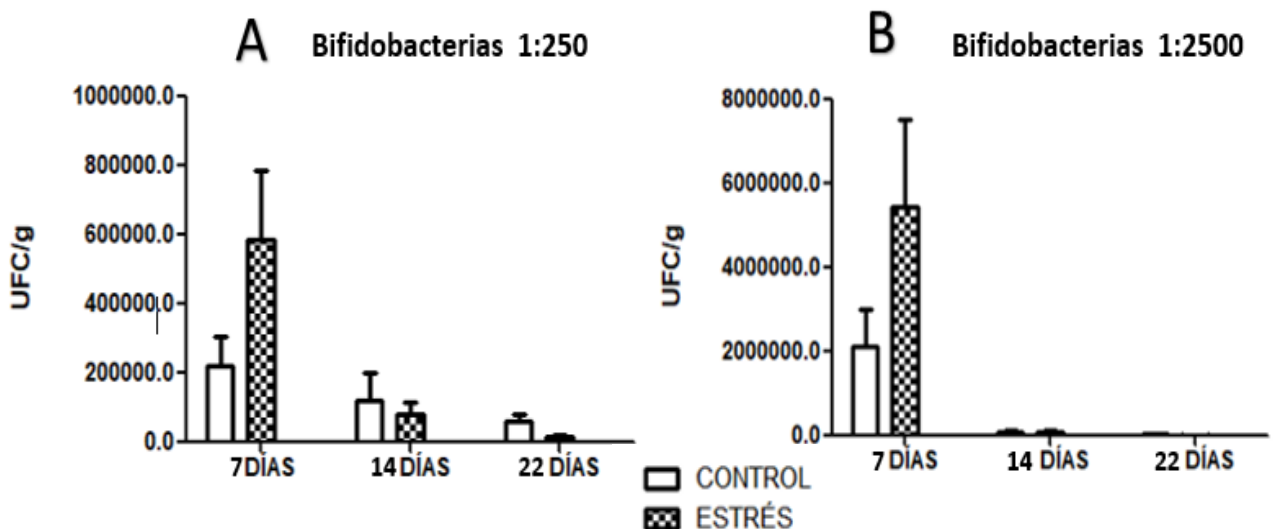


Figura 3. Presenta las unidades formadoras de colonias sobre gramo de muestra (UFC/g) a los 7, 14 y 21 días en ratones control y ratones estrés de bifidobacterias en el medio de cultivo TOS. A) Dilución 1:250 y B) dilución 1:2500.

Bifidobacterias			
Días de estrés	Dilución	Valor p	Diferencia significativa
7 días estrés	1:250	0.1071	No
	1:2500	0.1575	No
14 días estrés	1:250	0.6468	No
	1:2500	0.9565	No
22 días estrés	1:250	0.086	No
	1:2500	0.1809	No

Tabla 12. Presenta los valores de p obtenidos en la cuenta de bifidobacterias en medio TOS en las diluciones 1:250 y 1:2500.

VIII. Análisis de Resultados y Conclusión

En este trabajo se logró cuantificar las bacterias en heces y se observó que el estrés durante 7 días incrementó de manera significativa la cuenta bacteriana de lactobacilos, pero no causó cambios durante los 14 y 22 días. Sin embargo, en aerobios y bifidobacterias el estrés durante 7, 14 y 22 días no tuvo ningún efecto.

El modelo de estrés utilizado en este estudio no generó cambios contundentes sobre las bacterias evaluadas, posiblemente si se incrementa el periodo de estrés podría afectar la microbiota intestinal generando alteraciones sobre la homeostasis.

IX. Recomendaciones

Es importante la estandarización de este modelo a fin de evaluar a futuro fármacos para restablecer microbiota en situaciones en las que el estrés cause alteraciones en la misma.

X. Referencias

- Álvarez, J. Fernández Real, J.M, Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J.M., Saenz de Pipaon, M., Sanz, Y. (2021) Gastroenterología y hepatología, 44, 519-535.
- Bhatia, N., Partha, P. M., Abhinit, C., Atul, T., Daljit, M., Mohd, M., Uzzaman, K., Tasneem, A., Amteshwar, S.J. (2011). Animal models in the study of stress: A review. *NSHM Journal of Pharmacy & Healthcare Management*; 2:42-50
- Brunser T, O. (2013). El Papel de las bifidobacterias en el Funcionamiento del Organismo Humano. *Revista chilena de nutrición*; 40: 303-308.
- Brzozowski, B., Mazur-Bialy, A., Pajdo, R., Kwiecien, S., Bilski, J., Zwolinska-Wcislo, M., Mach, T., & Brzozowski, T. (2016). Mechanisms by which Stress Affects the Experimental and Clinical Inflammatory Bowel Disease (IBD): Role of Brain-Gut Axis. *Current neuropharmacology*, 14(8), 892–900.
- Dhabhar F. S. (2009) Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology; 16(5): 300-17.
- Fagundes CT, Amaral FA, Teixeira AL, Souza DG, Teixeira M. M. (2012). Adapting to environmental stresses: the role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses; 245(1): 250-64.
- Giraldo, D. J. (2009). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de lactobacillus y bifidobacterias. Universidad de los Andes.
- Gomez M., Acero, F. (2011) Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal; 20: 74-82.
- Gritsenko V. A, Brudastov I. A, Zhurlov O.S., Chertkobv K. L. (2000) The properties of Escherichia isolated from the bodies of mice in bacterial translocation after immobilization stress; 1: 37-41.
- Herguendas, A. J. U., Bartolomé, M. I. U. (2022). Manejo de la microbiota intestinal en la prevención y tratamiento de las enfermedades de la civilización. *Medicina naturista*; 16: 9-14.
- Muraoka M, Mine K, Kubo C. A study of intestinal dysfunction induced by restraint stress in rats (1998); 33(8): 806-10.
- Prados, A. (2022, junio). ¿Cuál es el papel de las bifidobacterias en el establecimiento de un microbioma intestinal y un sistema inmunológico saludables para los bebés?; 77: 21-34.
- Veintimilla, D., Frías, E. (2020). Microbiota intestinal y cáncer; 4: 94-102.

XI. Anexo 1

XII.I Medios de cultivo

Para poder realizar la cuenta bacteriana correspondiente a cada grupo de bacterias, se realizaron 3 medios de cultivo diferentes los cuales fueron: agar tripticaseina de soya (TSA), agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y en agar TOS-propionato adicionado con mupirocina de litio (TOS).

- Agar Tripticaseina de soya (TSA) cat. no. 1025-E Dibico Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
- Agar De Man Rogosa y Sharpe (MRS) cat. no. 1267-E Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
- Agar Base TOS-Propionato cat. no. 1.00043.0500 Millipore Darmstadt Germany.
- Caldo Tioglicolato (NIH) cat. no. 211721 Cuautitlán Izcalli, Estado de México • Sistema de contenedor anaerobio GasPak, Becton Dickinson (BD) cat. no. 260678, U.S.A.
- Suplemento Litio Mupirocina (MUP) cat. no. 1.00045.0010 Millipore Darmstadt Germany.
- Sistema de contenedor anaerobio GasPak, Becton Dickinson (BD) cat. No. 271051 Sonora México.

XII.I.I Para realizar el medio TSA:

1. Pesar en una báscula 10 g de medio agar soya tripticaseina, adicionarlo en un matraz Erlenmeyer con 250 mL de agua destilada y tapar.
2. Agitar ligeramente el matraz para disolver el medio y con ayuda de una parrilla eléctrica calentar con agitación hasta disolución totalmente.
3. Preparar la autoclave para esterilizar adicionando agua hasta la marca y colocar dentro el matraz etiquetado con una cinta testigo.
4. Cerrar y asegurar la tapa de la autoclave para proceder a elevar la temperatura.
5. Una vez transcurrido el tiempo de esterilización en autoclave, sacar el matraz Erlenmeyer y preparar 12 cajas de Petri bajo la campana de extracción.
6. Encender la campaña de extracción y proceder a vaciar en ellas el medio evitando la formación de burbujas en cada placa de Petri sin rebasar el límite marcado. En caso de tener burbujas utilizar un encendedor para pasar la flama sobre la caja y deshacer las burbujas formadas.
7. Esperar que el medio solidifique para proceder a tapar las cajas y colocarlas boca abajo.
8. Proceder a rotular las cajas con las divisiones establecidas para realizar el sembrado de las 3 diluciones realizadas.

9. Mantener las placas de Petri en refrigeración hasta su utilización.

XII.I.II Para realizar el medio MRS:

1. Pesar 16.75 g de medio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) y vaciar cuidadosamente en un matraz Erlenmeyer con 250 ml de agua destilada y tapar.
2. Calentar en la parrilla y agitar hasta disolución total.
3. Introducir el matraz etiquetado con cinta testigo en la autoclave y esterilizar durante 15 minutos.
4. Una vez acomodado el material a esterilizar, cerrar y asegurar la tapa de la autoclave.
5. Al terminar el tiempo de esterilización, sacar el matraz de la autoclave y colocarlo en la campana de extracción.
6. Proceder a encender la campana de extracción y colocar 12 cajas de Petri dentro. Comenzar a plaquear con el medio MRS y esperar a que solidifique por aproximadamente 10 minutos. En caso de tener burbujas utilizar un encendedor para pasar la flama sobre la caja y deshacer las burbujas formadas
7. Tapar cuidadosamente las placas de Petri.
8. Proceder a rotular las cajas con las divisiones establecidas para realizar el sembrado de las 3 diluciones realizadas.
9. Mantener las placas de Petri en refrigeración hasta su utilización.

XII.I.III Para realizar el medio TOS:

1. Disolver 16.44 g de medio TOS-Propionato en un matraz Erlenmeyer con 250 mL de agua destilada para preparar 12 placas de Petri y calentar hasta disolución total del agar.
2. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos.
3. Transcurrido el tiempo, retirar de la autoclave y dejar enfriar hasta que la apariencia del medio sea ligeramente amarillo transparente.
4. Mientras el medio se deja enfriar un poco, se procede a preparar el suplemento selectivo de mupirocina. En medio estéril se agregan 25 mL de agua destilada estéril al vial del suplemento para disolver totalmente.
5. Al notar que la temperatura del medio disminuye, se añaden 12.5 mL del suplemento MUP al medio TOS-Propionato a 250 mL y agitar suavemente.
6. Preparar las 12 placas de Petri en la campaña de extracción y plaquear con el medio TOS-MUP, evitando la formación de burbujas en cada placa de Petri sin rebasar el límite marcado. En caso de tener burbujas utilizar un encendedor para pasar la flama sobre la caja y deshacer las burbujas formadas. Esperar a que el medio solidifique y cerrar cuidadosamente las placas.

7. Colocar las placas boca abajo.
8. Proceder a rotular las cajas con las divisiones establecidas para realizar el sembrado de las 3 diluciones realizadas.
9. Mantener las placas de Petri en refrigeración hasta su utilización

XII.II Equipos

- Pipeta 200 μ L Gilson, Sarcelles France
- Pipeta 1000 μ L Gilson, Sarcelles France
- Pipeta 5000 μ L Gilson, Sarcelles France
- Micropipeta 20 μ L Gilson, Sarcelles France
- Autoclave AESA Mod. CV 250, Los Reyes Acozac Estado de México
- Microcentrifuga Corning | LSE MOD. LSE 6765-H5, New York U.S.A.
- Vortex mixter MRC, Mod. no. VM-2000, Jolón Israel
- Campana de flujo laminar ECO Mod. VT-300-ECO Minnesota U.S.A.
- Balanza Analítica CESLAB Mod. CE-FA2204N, Jalisco México