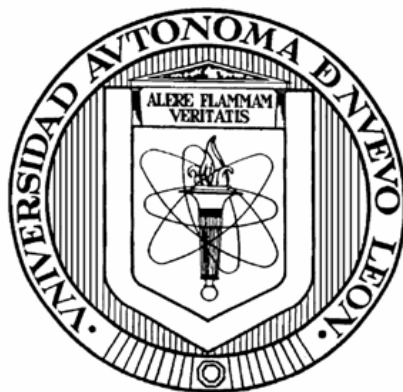


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**“ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTORES DIFUSIBLES DE  
PROBIÓTICOS (FDP) SOBRE *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*  
BAJO CONDICIONES AXÉNICAS *in vitro*”**

**POR**

**Q.B.P. LESLIE HILARY ONTIVEROS MORENO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN JULIO 2011**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTORES DIFUSIBLES DE  
PROBIÓTICOS (FDP) SOBRE *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*  
BAJO CONDICIONES AXÉNICAS *in vitro*”

POR  
Q.B.P. LESLIE HILARY ONTIVEROS MORENO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

COMISIÓN DE TESIS

---

DRA. MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ  
DIRECTOR

---

DR. MARIO RODOLFO MORALES VALLARTA  
SECRETARIO

---

DRA. MARÍA EUFEMIA MORALES RUBIO  
VOCAL

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN.

JULIO DEL 2011

## **ÁREA DE TRABAJO**

Éste trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, dentro de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC) del Cuerpo Académico Consolidado de Biología Celular y Genética: Biología Celular.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	viii
<b>DEDICATORIAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xv
<b>NOMENCLATURAS</b> .....	xix
<b>SÍMBOLOS</b> .....	xxiii
<b>1. RESUMEN</b> .....	xxiv
<b>1. ABTRACT</b> .....	xxv
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2.1. Protozoarios parásitos patógenos.....	1
2.2. Los probióticos.....	2
<b>3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	3
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	4
5.1 Objetivo general.....	4
5.2 Objetivos particulares.....	5
<b>6. ANTECEDENTES</b> .....	6
6.1. Las infecciones por protozoarios parásitos patógenos.....	6
6.1.2. <i>Giardia lamblia</i> .....	7
6.1.2.1. Morfología y biología.....	8
6.1.2.2. Ciclo de vida.....	10
6.1.2.3. Taxonomía.....	11
6.1.2.4. Epidemiología.....	13
6.1.2.5. Control y prevención.....	14
6.1.2.6. Patogenia y fisiopatología.....	15
6.1.2.7. Giardiasis.....	16
6.1.2.7.1. Manifestaciones clínicas en el hombre....	17
6.1.2.7.2. Diagnóstico.....	18
6.1.2.7.3. Tratamiento.....	19
6.1.3. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	22
6.1.3.1. Morfología.....	22
6.1.3.2. Ciclo de vida.....	24
6.1.3.3. Taxonomía.....	26
6.1.3.4. Epidemiología.....	26
6.1.3.5. Control y prevención.....	28

6.1.3.6. Patogenia y fisiopatología.....	28
6.1.3.7. Tricomonosis.....	31
6.1.3.7.1. Manifestaciones clínicas en el humano...	32
6.1.3.7.2. Diagnóstico.....	33
6.1.3.7.3. Tratamiento.....	34
6.2. Probióticos.....	36
6.2.1. El género <i>Lactobacillus</i> .....	37
6.2.2. El género de <i>Bifidobacterium</i> .....	38
6.2.2.1. Principales funciones de bifidobacterias en el hombre.....	40
6.2.2.2. Prevención de infecciones por estímulos de inmunidad.....	41
6.2.3. Importancia de los probióticos.....	42
6.2.3.1. Flora microbiana del tracto gastrointestinal.....	42
6.2.3.2. Efecto protector de la flora intestinal.....	46
6.2.3.3. Efecto protector de la flora vaginal.....	47
6.2.4. Antagonismo microbiano.....	49
6.2.5. Estrategias terapéuticas.....	52
6.2.5.1. Terapias de Interferencia Microbiana (MIT).....	54
<b>7. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>55</b>
7.1. Material.....	55
7.1.1. Material biológico.....	55
7.1.2. Material químico.....	55
7.2. Metodología para preparación de soluciones y medios de cultivo...	56
7.3. Protozoarios.....	57
7.3.1. Preparación de medio de cultivo.....	57
7.3.2. Mantenimiento de cepas.....	57
7.3.3. Cinéticas de crecimiento.....	58
a) <i>G. lamblia</i> .....	58
b) <i>T. vaginalis</i> .....	58
7.4. Probióticos.....	60
7.4.1. Preparación de medio de cultivo.....	60
7.4.2. Preparación de medios para el cultivo de probióticos.....	60
a) Medio MRS-caldo.....	60
b) Medio MRS-agar.....	60
c) Medio M17-caldo.....	61
d) Medio M17-agar.....	61
7.4.3. Mantenimiento.....	61
7.4.4. Cinética de crecimiento.....	62
a) Método de turbidimétrico.....	62
b) Recuento bacteriano en placa de probióticos.....	63
7.4.5. Obtención de medio condicionado de probióticos.....	64
7.5. Bioensayos.....	66
7.5.1. Evaluación de la actividad biológica de	

factores difusibles de probióticos (FDP) sobre el crecimiento axénico <i>in vitro</i> de <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	66
<b>7.6.</b> Análisis Estadístico.....	67
<b>7.7.</b> Determinación de la CI <sub>50</sub> de los FDP sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> .....	68
<b>8. RESULTADOS</b> .....	69
<b>8.1.</b> Protozoarios	
<b>8.1.1.</b> Cinética de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i> IMSS 0889....	69
<b>8.1.2.</b> Cinética de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	70
<b>8.2.</b> Probióticos	
<b>8.2.1.</b> Cinética de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría empleando el medio MRS-caldo.....	71
<b>8.2.2.</b> Cinética de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría empleando el medio M17-caldo.....	73
<b>8.2.3.</b> Cinética de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría empleando el medio MPT-caldo.....	75
<b>8.2.4.</b> Cinética de crecimiento de <i>B. longum</i> en presencia de CO <sub>2</sub> empleando el medio MPT-caldo.....	77
<b>8.2.5.</b> Cinética comparativas de crecimiento de los probióticos en los medios MRS, M17 y MPT.....	78
<b>8.3.</b> Determinación del rendimiento celular mediante el Recuento Bacteriano en Placa (RBP).....	82
<b>8.4.</b> Bioensayos.....	84
<b>8.4.1.</b> Evaluación de la actividad biológica de los factores difusibles de probióticos (FDP) sobre cultivo axénico <i>in vitro</i> de <i>G. lamblia</i> . y <i>T. vaginalis</i> .....	84
<b>8.4.2.</b> Determinación de la CI <sub>50</sub> de los FDP sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> bajo condiciones axénico <i>in vitro</i> .....	100
<b>9. DISCUSIONES</b> .....	103
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	110
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	112
<b>12. LITERATURA CITADA</b> .....	114
<b>13. ANEXOS</b> .....	147

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios, bajo el convenio de UANL-CONACYT, con el No de registro 298078.

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios: Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me ha enseñado a valorarte cada día más. Por darme vida, salud, amor, sabiduría y fuerzas para seguir adelante para lograr mis objetivos. Gracias por todas las bendiciones que me das a mí a mis seres queridos y a toda la gente hermosa que me rodea.*

*A mis padres: Porque gracias a su, cariño, comprensión, guía, tolerancia y apoyo he llegado a realizar de los anhelos más grandes de mi vida. Por el inmenso amor y confianza que en mí se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales; por lo cual les viviré eternamente agradecida, con mucho amor admiración y respeto. Porque, aunque no lo sepan, ustedes son el motivo que me impulsa a seguir adelante y tener ese gran amor a la vida y esos grandes valores que me inculcaron desde pequeña. ¡Gracias papis por darme la vida, los amo mucho!*

*A mi Director de tesis: De manera muy especial y con profundo cariño dedico esta tesis a la persona más importante en la realización de éste proyecto de investigación, y a quien le agradezco inmensamente por ser el pilar y mi ejemplo a seguir adelante, persona que me inició y dirigió en el camino de la investigación científica, Dra. María Porfiria Barrón González, muchas gracias por su asesoramiento científico, estímulo para seguir creciendo intelectualmente, por su predisposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas en cada momento de la realización de éste proyecto de investigación, el apoyo en cada bioensayo y por sus substanciales sugerencias y observaciones durante la investigación y redacción de la Tesis, por su amistad y su cariño, muchísimas gracias.*

*¡Muchas gracias Dra. Mary! ¡La quiero y aprecio muchísimo! ☺*

*Dr. Mario R. Morales por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y permitirme realizar éste trabajo de tesis en su Laboratorio de Biología Celular y en el Departamento de Biología Celular y Genética. Muchas gracias por todos sus consejos y el gran apoyo que me brindo durante la realización de éste trabajo de investigación.*

*A mi comisión de tesis: Dra. María Porfiria, Dr. Mario R., Dra. Eufemia, por sus sugerencias que enriquecieron éste trabajo, por la revisión crítica del escrito y su determinante ayuda en técnicas de laboratorio utilizadas en este trabajo. ¡Gracias! Los aprecio mucho!*

*A mis maestros: Por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales, por la oportunidad brindada y la confianza depositada en mí para el desarrollo de ésta investigación, además por ser parte de mi formación académica.*

*Muchas gracias al Dr. Ricardo Gómez, y Dra. Patricia Tamez por sus valiosos apoyos y colaboraciones para la realización de esta tesis. ¡Gracias!*

*Gracias a MC Magda, por siempre brindarme un enorme apoyo incondicional. Magdis muchísimas gracias por todo eres una gran amiga y compañera! Te quiero y te admiro!*

*Gracias a Yady y Carmen, que siempre me apoyaron en el área de posgrado, muchas gracias por todas las atenciones que tuvieron conmigo!*



*Gracias a Dulce y Verito, que siempre me apoyaron y me brindaron su valiosísima amistad, muchas gracias por sus bellos detalles que tuvieron conmigo! Son unas hermosas personas! Las quiero mucho niñas!!*

*A mis maestras y amigas de la escuela AETOS: Paty Aguilar, Charito, Jesy, Mariel, Nelly, por el apoyo brindado desde el inicio de esta etapa de investigación, su tolerancia y comprensión ¡Las quiero!*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio: Gracias por apoyarme en todo momento, muchísimas gracias Ramón por todo tu apoyo. Ruth, Andrea, Chuy, Eliud, Dianita, Cynthia, Ariel, Mayris, Moni y Mary. Gracias en especial por tu colaboración Esme! ☺*

*A mis amigos compañeros: Que gracias al equipo que formamos en las clases logramos llegar hasta aquí hasta el final del camino, compartiendo compañerismo, alegrías, estrés pero sobre todo mucho cariño Isa e Isabella, Clarita, Pao, Luis, Gaby, Lauris, Mau, Magda, Adrian, Jessy, Fátima, Carlitos, Paty, Ericka. Gracias a cada uno de mis compañeros y amigos por su simpatía y amistad, por sus bromas que cada día daban un ambiente cálido a nuestra vida estudiantil.*

*Gracias en especial: Alfredo Lozano, por el enorme apoyo que me brindas, por la paciencia por su comprensión, amor y fuerza por ser tal y como es, por todo el tiempo que te robe en la realización de ésta investigación, por siempre estar a mi lado en las malas desveladas jeje! y en las buenas también.*

*Si miras lo que no tienes en vida, no tienes nada, si miras lo que tienes, lo tienes todo.*

*H. Jackson Brown*

## DEDICATORIAS

*A Dios: Porque me has conservado con vida y salud y permitirme compartir este momento con todas las personas que amo.*

*A mis padres: María Dolores Moreno Jiménez y Gerardo Ontiveros Heredia, por apoyarme en todo momento, por sus consejos, valores, motivación constante que me han permitido ser una persona de bien, más que nada por su amor y por cultivar el sabio don de la responsabilidad. Por los ejemplos de perseverancia, constancia que los caracterizan y que han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante, por su gran amor.*

*A mis hermanos: Peques! por todo el amor que les tengo ☺*

*A mi abuelito Cleto: por siempre tenerme presente y brindarme sus sabios consejos lo quiero bastante papi!*

*A mis maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas: En especial a: Dra. Mary, Dr. Mario R. y Dra. Eufemia que sin su apoyo, su confianza, comprensión y sugerencias no hubiera sido posible concluir éste trabajo de investigación y etapa profesional.*

*A mis grandes amigas y amigos de toda la vida: Por todas sus buenas vibras positivas y bendiciones que día con día me dedicaban ustedes! Gracias por el apoyo tan grande que siempre he tenido con ustedes, su motivación para culminar los estudios profesionales, su gran amistad que ha durado años y sobre todo el gran cariño: Chío “wowo”, Eleniux, Felix, David Torres “chikio”, Ricardo Murcia, Esmé Blanquis, Lety C, Mayris I, Martha Cantú, Paulina A, Cori, Brendis, Edith “wiki”, Naye, Lili, Kary, Rocío, Ewry, Mary, Marce, Eliézer, Robert “JR”, Adrian, Arely, Chinthia M., Jessy A., Jorge y Toño los aprecio muchísimo, para mi han sido mis mejores compañeros y amigos que he tenido ¡Los quiero! por brindarme buenos deseos, vibra positiva, en cada día me animaron para seguir adelante y me apoyaran con mi desarrollo profesional y emocional.*

*A toda mi familia y familia Lozano: Por impulsarme a seguir adelante y llegar hasta este lugar, brindarme todo el apoyo brindado y por su gran cariño, por sus consejos y formar parte de esta meta. Don Alfredo y Lucía los quiero!*

*Dedicada con mucho amor para tí Alfredo Lozano: Eres una persona que todo lo comprende y da lo mejor de sí mismo sin esperar algo a cambio. Porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando se necesita. Por ser una de las personas más importantes de mi vida, por darme ese ejemplo de dedicación y esfuerzo, y tu amor incondicional. Eres una persona única, te amo mucho, gracias por estar a siempre conmigo y compartir este momento tan especial en mi vida profesional, espiritual y personal.*

## Muchos pequeños éxitos

*Si uno sólo se centra en el final del viaje, la meta siempre aparece en la distancia. Esto lleva a muchos a abandonar sus objetivos cuando surgen obstáculos o el camino se inclina. Ya sabes que cada viaje empieza con el primer paso, pero también has de dar un segundo paso, y un tercero, y tantos como hagan falta hasta alcanzar el destino. La Ley del proceso, es la garantía de la naturaleza de que podemos conseguir casi cualquier objetivo, sin importar como de grande dividiéndolo en pasos pequeños y seguros.*

*Si los objetivos que valen la pena requieren esfuerzo, riesgo y sacrificio. Tienes que persistir a través del miedo y de la duda; tienes que utilizar recursos interiores y convertirte en más de lo que eras antes. Cada nuevo reto te sirve de iniciación: conoces el desánimo; te sobrepones a las incomodidades, al aburrimiento, a la frustración; y descubres de que estás hecho. No dudes tu dirección o dependas de otros para que te digan que es lo que debes o no debes hacer. Ve hacia lo que te atrae o te inspira- hacia lo que toca tu corazón. Pregúntate a ti mismo desde lo más profundo qué es lo que realmente te vale la pena el esfuerzo y los sacrificios que comporta perseguir un objetivo. Recuerda, viajero, que grandes sueños en el futuro distante son una carga difícil de llevar. Los mejores objetivos podrían ser aquellos que puedes tratar la siguiente semana, el siguiente día, la siguiente hora, o el siguiente paso; crea un proceso que conlleve muchos pequeños éxitos.*

Dan Millman

*Dedico este trabajo a todas las personas especiales de mi vida que han estado conmigo sin pedir nada a cambio, y a todos mis amigos y amigas que no mencione en este escrito, pero que compartimos muchos momentos especiales, difíciles e inolvidables.*

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Clasificación taxonómica de <i>G. lamblia</i> (Levine <i>et al.</i> , 1980)..... 12	
II.-	Clasificación taxonómica de <i>T. vaginalis</i> (Donné, 1836).....	26
III.-	Características de la microflora del tracto gastrointestinal (Rastall, 2004).....	44
IV.-	Efecto de los microorganismos intestinales sobre el humano (Berogne, 1989; Wind, 1994).....	51
V.-	Origen de los reactivos.....	55
VI.-	Preparación de soluciones.....	56
VII.-	Consideraciones por bioensayo para evaluación de la actividad de los FDP sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	68
VIII.-	Comparativa del rendimiento celular (UFC) de probióticos en los medios MRS-agar, M17-agar y MPT-agar.....	82
IX.-	Comparación del porcentaje de inhibición de los factores difusibles de probióticos sobre <i>G. lamblia</i> .....	96
X.-	Comparación del porcentaje de inhibición de los factores difusibles de probióticos sobre <i>T. vaginalis</i> .....	98
XI.-	Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los factores difusibles de probióticos sobre <i>G. lamblia</i> .....	101
XII.-	Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los Factores difusibles de probióticos sobre <i>T. vaginalis</i> .....	102

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.-	Morfología típica del quiste de <i>G. lamblia</i> .....	8
2.-	Morfología típica del trofozoíto de <i>G. lamblia</i> .....	9
3.-	Esquema del ciclo de vida de <i>G. lamblia</i> .....	10
4.-	Morfología típica del trofozoíto de <i>T. vaginalis</i> .....	24
5.-	Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .....	25
6.-	Microflora del tracto gastrointestinal.....	45
7.-	Estrategia experimental para el mantenimiento y cinética de crecimiento de <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	59
8.-	Estrategia experimental para el mantenimiento de probióticos...	62
9.-	Estrategia experimental para realizar la cinética de crecimiento de probióticos por el método turbidimétrico.....	62
10.-	Determinación de las UFC/mL de los probióticos mediante el método de Recuento bacteriano en placa (RBP).....	63
11.-	Estrategia experimental para la obtención de factores difusibles de probióticos (FDP).....	65
12.-	Estrategia experimental del bioensayo para evaluar la actividad biológica de FDP sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	67
13.-	Cinética de crecimiento de <i>G. lamblia</i> .....	69
14.-	Cinética de crecimiento de <i>T. vaginalis</i> .....	70
15.-	Cinética de crecimiento de probióticos en el medio MRS-caldo...	72
16.-	Cinética de crecimiento de probióticos en el medio M17-caldo...	74
17.-	Cinética de crecimiento de probióticos en el medio MPT-caldo...	76
18.-	Comparación del rendimiento celular de <i>B. longum</i> en presencia/ausencia de CO <sub>2</sub> empleando el medio MPT-caldo.....	77
19.-	Comparación del rendimiento celular de <i>B. longum</i> .....	78

20.-	Cinética comparativa del crecimiento de <i>L. casei</i> en el medio MPT, M17 y MRS.....	79
21.-	Cinética comparativa del crecimiento de <i>L. lactis</i> en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo .....	79
22.-	Cinética comparativa del crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en el Medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo.....	80
23.-	Cinética comparativa del crecimiento de <i>L. casei rhamnosus</i> en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo .....	80
24.-	Cinética comparativa del crecimiento de <i>L. plantarum</i> en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo .....	81
25.-	Cinética comparativa del crecimiento de <i>B. longum</i> en el medio MPT-caldo, MPR-CO <sub>2</sub> -caldo, M17-caldo y MRS-caldo .....	81
26.-	Cinética comparativa del rendimiento de probióticos en los medios MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo.....	83
27.-	Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de <i>B. longum</i> sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	85
28.-	Comparación de la inhibición de <i>G. lamblia</i> en presencia de los FD de <i>B. longum</i> .....	85
29.-	Comparación de la inhibición de <i>T. vaginalis</i> en presencia de los FD de <i>B. longum</i> .....	85
30.-	Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de <i>L. casei</i> sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	87
31.-	Comparación de la inhibición de <i>G. lamblia</i> en presencia de los FD de <i>L. casei</i> .....	87
32.-	Comparación de la inhibición de <i>T. vaginalis</i> en presencia de los FD de <i>L. casei</i> .....	87
33.-	Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de <i>L. acidophilus</i> sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	89
34.-	Comparación de la inhibición de <i>G. lamblia</i> en presencia de los FD de <i>L. acidophilus</i> .....	89

35.- Comparación de la inhibición de <i>T. vaginalis</i> en presencia de los FD de <i>L. acidophilus</i> .....	89
36.- Comparación de la inhibición de <i>G. lamblia</i> en presencia de los FD de <i>L. plantarum</i> .....	90
37.- Comparación de la inhibición de <i>T. vaginalis</i> en presencia de los FD de <i>L. plantarum</i> .....	90
38.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de <i>L. plantarum</i> sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	91
39.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de <i>L. casei rhamnosus</i> sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> ...	92
40.- Comparación de la inhibición de <i>G. lamblia</i> en presencia de los FD de <i>L. casei rhamnosus</i> .....	93
41.- Comparación de la inhibición de <i>T. vaginalis</i> en presencia de los FD de <i>L. casei rhamnosus</i> .....	93
42.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de <i>L. lactis</i> sobre <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i> .....	94
43.- Comparación de la inhibición de <i>G. lamblia</i> en presencia de los FD de <i>L. lactis</i> .....	95
44.- Comparación de la inhibición de <i>T. vaginalis</i> en presencia de los FD de <i>L. lactis</i> .....	95
45.- Comparación de la actividad biológica de los FDP sobre el cultivo axénico <i>in vitro</i> de <i>G. lamblia</i> .....	97
46.- Comparación de la actividad biológica de los FDP sobre el cultivo axénico <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i> .....	99

## NOMENCLATURA

<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Fármacos
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b><i>B. longum</i></b>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<b>BB-12</b>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i> ,
<b>Cel</b>	Célula
<b>CDC</b>	Center Diseases Control
<b>CIBIN</b>	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
<b>CFA</b>	Citrato férrico de amonio
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b><i>C. trachomatis</i></b>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b><i>E. histolytica</i></b>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<b>E.T.S.</b>	Enfermedades de transmisión sexual
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b><i>E. faecium</i></b>	<i>Enterococcus faecium</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>spp</b>	Especie
<b>ESQ</b>	Estructuras semejantes a quistes
<b>CDF</b>	Factor de desprendimiento celular
<b>FDP</b>	Factores difusibles de probióticos
<b>FD</b>	Factor difusible
<b>Fig.</b>	Figura
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio dibásico



<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio monobásico
<b><i>G. vaginalis</i></b>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
<b>GI</b>	gastrointestinal
<b><i>G. lamblia</i></b>	<i>Giardia lamblia</i>
<b><i>G. intestinalis</i></b>	<i>Giardia intestinalis</i>
<b><i>G. duodenalis</i></b>	<i>Giardia duodenalis</i>
<b>g</b>	Gramo
<b>g/mL</b>	Gramo por mililitro
<b>G+C</b>	Guanina + citocina
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>h</b>	Horas
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b><i>L. acidophilus</i></b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<b><i>L. casei</i></b>	<i>Lactobacillus casei</i>
<b><i>L. casei rhamnosus</i></b>	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>
<b><i>L. casei Shirota</i></b>	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>
<b><i>L. jensenni</i></b>	<i>Lactobacillus jensenni</i>
<b><i>L. lactis</i></b>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<b><i>L. plantarum</i></b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b><i>L.GG</i></b>	<i>Lactobacillus GG</i>
<b>LCR</b>	Lipid Cholesterol Rich
<b>Lb</b>	Libras
<b>LMCβI</b>	Liofilizado de Medio Condicionado con <i>Bifidobacterium longum</i>
<b>MRS</b>	Medio desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para crecimiento de bacterias ácido lácticas.
<b>M17</b>	Medio desarrollado para crecimiento de bacterias ácido lácticas

<b>mg</b>	Miligramos
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μg</b>	Microgramos
<b>mL</b>	Militros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>min.</b>	Minuto
<b>M.O.</b>	Microorganismos
<b>nm</b>	Nanómetro
<b><i>N. gonorrhoeae</i></b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>N</b>	Concentracion Normal
<b>FAO</b>	Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>O<sub>2</sub></b>	Molécula de Oxígeno
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>Pag.</b>	Página
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>PACSR</b>	Protozoa Axenic Culture Serum Replacement
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>RBP</b>	Recuento bacteriano en placa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b><i>S. boulardii</i></b>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<b>SDS</b>	(Sodium N-dodecanoyl N-methylglycinate; sodium N-lauroyl Sarcosinate; Sarcosyl NL; Sarcosyl) Sodium Salt
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b><i>S. termophilus</i></b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<b>MIT</b>	Terapias de Interferencia Microbiana
<b><i>T. vaginalis</i></b>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>TYI-S-33</b>	Trypticase, Yeast, Iron-Serum

<b>U.V.</b>	Ultra violeta
<b>U</b>	Unidades
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>Vol.</b>	Volumen
<b><i>et al.,</i></b>	y colaboradores

## SÍMBOLOS

Å	Angstrom
X	Aumentos
Ø	Centrifugación
[ ]	Concentración
λ	Longitud de onda
®	Marca Registrada
>	Mayor
<	Menor
μ	Micro, Micra

## RESUMEN

Existen protozoarios parásitos patógenos que ocasionan daños severos al humano, teniendo una distribución mundial, lo cual es un factor de importancia en países en vías de desarrollo en donde las condiciones sanitarias son deficientes e inadecuadas. Entre los protozoarios patógenos mayormente distribuidos en México, se encuentra *G. lamblia* agente causal de giardiasis y *T. vaginalis* agente causal de la tricomoniasis. Para el tratamiento de la giardiasis y la tricomoniasis, la droga de elección es el metronidazol, sin embargo esta droga presenta múltiples efectos secundarios indeseables en el humano, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, por otra parte la OMS ha recomendado el empleo de probióticos para el desarrollo de Terapias de Interferencia Microbiana (MIT). Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser ingeridos actúan en forma benéfica al desarrollo de la flora microbiana del intestino, ayudan a normalizar las funciones digestivas y a estimular la inmunidad humoral y celular. También actúa de manera benéfica en el desarrollo de la flora microbiana vaginal. Los probióticos utilizados en esta investigación fueron *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*. Debido a que en el medio MPT es posible cultivar estos probióticos, *G. lamblia* y *T. vaginalis*, se realizaron las cinéticas correspondientes. Se determinó el rendimiento celular de los probióticos (UFC), siendo los más eficientes *B. longum*, *L. casei* y *L. plantarum*. Se obtuvieron los Factores Difusibles (FD) de cada probiótico, posteriormente se determinó la actividad biológica sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*; los resultados indican que el FD de *L. plantarum* tiene gran potencial giardicida y el FD de *L. casei* presenta el mayor potencial tricomicida. Sin embargo todos los FDP presentaron potencial giardicida y tricomicida, éstos resultados presentaron diferencia significativa con respecto al control. Sería recomendable realizar estudios para identificar los metabolitos presentes en los FDP presentan actividad inhibitoria del crecimiento axénico *in vitro* de *G. lamblia* y *T. vaginalis*.

## ABSTRACT

There are pathogens parasitic protozoa worldwide distribution that cause severe damage to human health, which is an important factor especially in developing countries where hygiene is poor and inadequate. Among the protozoan parasites distributed mostly in Mexico are *Giardia lamblia* which is causing of giardiasis, and *Trichomonas vaginalis* which is causing of trichomoniasis. For the treatment of giardiasis and trichomoniasis, the choice drug is metronidazole, but this drug has many undesirable effects in humans, so it is necessary to search for new therapies. On the other hand, the World Health Organization(WHO) has recommended the use of probiotics for the development of Microbial Interference Therapy (MIT). Probiotics are live microorganisms which, promotes the development of microbial flora of the gut, help to normalize digestive function and to stimulate the humoral and cellular immunity. It also stimulates the normal development of vaginal microbial flora. The probiotics used in this research were *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*. Because in the medium MPT is possible to grow probiotics, *G. lamblia* and *T. vaginalis* were performed for the kinetics. We determined the yield probiotics, the most efficient were the diffusible factor (DF) from *B. longum*, *L. casei* and *L. plantarum*. The DF were obtained from each probiotic, later was determined the biological activity in *G. lamblia* and *T. vaginalis*. The results indicate that DF *L. plantarum* has great giardicida potential and DF *L. casei* presents a great trichomonacida potential. However, all the DF had potential giardicide and trichomonacide, these results showed significant difference compared to control. It would be advisable for the development of studies to identify the metabolites present in the diffusible factor of probiotics that present growth inhibitory activity *in vitro* axenic culture of *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Protozoarios parásitos patógenos

Los protozoarios parásitos patógenos causan enfermedades agudas y crónicas, entre los protozoarios parásitos patógenos que se encuentran distribuidos en todo el mundo podemos. En México las principales infestaciones intestinales por protozoarios parásitos son causadas por *G. lamblia*, éste parásito puede transmitirse a través del contacto oral-fecal y del agua contaminada con quistes. La trichomonosis urogenital humana, es una de las enfermedades de transmisión sexual (E.T.S.) y es causada por el protozoario parásito *T. vaginalis*, independientemente de la etiología de la enfermedad parasitaria, no hay que desestimar su posible relación con el cáncer cervical y ciertas alteraciones epiteliales, denominadas neoplasias, así mismo, *T. vaginalis* actúa como vector potencial de otros organismos concomitantes: *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, gonococos y otros virus.

A pesar de la importancia de las enfermedades como problema de salud pública, se cuenta una reducida cantidad de drogas para el tratamiento de enfermedades producidas por protozoarios, el tratamiento de elección son el metronidazol, seguidas inmediatamente de iodoquinolona, paromomycina o fuorato de diloxanida (Padilla, 1999). Sin embargo en varios estudios realizados se demuestra que estas drogas tienen efectos que se caracterizan por producir muerte selectiva de procariotes y eucariotes y en estudios posteriores se ha demostrado que esta droga es tanto mutagénico como carcinogénico en modelos murinos (Legator, 1975), además se ha observado resistencia de algunas cepas de protozoarios patógenos de algunos de los fármacos antimibianos más usuales en la práctica médica tal es el caso de el metronidazol (Samarawickream *et al.*, 1997).

## 2.2. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser ingeridos como suplemento de la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana como suplemento de la dieta, además ayudan a normalizar las funciones digestivas y a estimular la inmunidad humoral y celular. También la flora microbiana vaginal actúa en el desarrollo de protección contra infecciones vaginales (Macfarlane *et al.*, 1999).

Se han reportado resultados favorecedores atribuidos al empleo de probióticos en el tratamiento contra la diarrea aguda y crónica ya sea de origen bacteriano o viral, y en estudios previos también se ha observado la inhibición del crecimiento de *G. lamblia* al utilizar factores extracelulares provenientes de bacterias ácido lácticas (Salminen *et al.*, 2005). *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ambas pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas (LAB) son consideradas como los organismos probióticos más benéficos que contribuyen a la inhibición de bacterias intestinales dañinas (Donohue y Salminen, 1996).

Las bifidobacterias juegan un rol fundamental en el ambiente intestinal por lo tanto es necesario que sea el grupo dominante de la microflora, ya que se han comprobado beneficios adicionales a la salud, tales como mejoría en enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes *mellitus* no insulino dependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer (Kaloud y Stogmann, 1968).



### 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los protozoarios parásitos patógenos generan enfermedades con una amplia distribución cosmopolita, las cuales son más frecuentes en países en vías de desarrollo en donde las condiciones sanitarias son deficientes e inadecuadas. En México, estas enfermedades representan un problema importante de salud. El metronidazol es considerado como la droga sistémica de elección para el tratamiento de infecciones de protozoarios parásitos patógenos. Sin embargo esta droga presenta múltiples efectos secundarios indeseables en el humano, se caracteriza por provocar muerte selectiva de procariotes y eucariotes, además es mutagénica (bacterias), carcinogénica (modelos murinos), neurotóxica (gatos) y recientemente en diferentes estudios se ha reportado la resistencia de protozoarios parásitos patógenos. Por ésta razón, es necesario realizar estudios encaminados a la búsqueda de alternativas para el control de la giardiasis y tricomoniasis. Por lo cual, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda realizar más investigaciones encaminadas a la búsqueda de terapias de interferencia microbiana (Terapias MIT) empleando para ello microorganismos probióticos y sus factores difusibles al medio, y así en un futuro poder controlar las infecciones de enfermedades parasitarias intestinales. El creciente interés en los probióticos para el tratamiento de diferentes trastornos gastrointestinales ha llevado a incursionar en el área buscando una alternativa terapéutica ya que se tiene conocimiento de que los probióticos estimulan las funciones protectoras en el cuerpo humano.

A la fecha se han realizado pocos estudios de los efectos de los probióticos y sus factores difusibles sobre protozoarios patógenos. Éste trabajo se suma a investigaciones realizadas al área de parasitología clínica, microbiología y área de alimentos, a los cuales se les atribuyen efectos benéficos, pudiendo ser una terapia alternativa más destacada a futuro a la sustitución de drogas para combatir cierto tipo infecciones provocadas por protozoarios parásitos.

#### **4.-HIPÓTESIS**

Algunos factores difusibles de probióticos presentan actividad biológica sobre el cultivo axénico *in vitro* de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*

#### **5.-OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad biológica de los factores difusibles de probióticos sobre cultivos de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro*.

## 5.2. Objetivos particulares

### Protozoarios

- 1.-Determinar la cinéticas de crecimiento de *Giardia lamblia* IMSS 0889 y *Trichomonas vaginalis*, en el medio MPT en condiciones axénicas *in vitro*.

### Probióticos

- 1.- Establecer cinética de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bifidobacterium longum*, empleando los medios M17-caldo, MRS-caldo y MPT-caldo.
- 2.- Determinar las UFC de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bifidobacterium longum* empleando los medios M17-agar, MRS-agar y MPT-agar.
- 3.- Obtener los factores difusibles de probióticos (FDP) de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bifidobacterium longum*.

### Bioensayo

- 1.-Determinar la actividad biológica de los FDP a evaluar en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- 2.-Realizar el análisis estadístico de los valores obtenidos de la actividad biológica de cada uno de los FDP evaluados con el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000.
- 3.-Determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) de los FDP sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, bajo condiciones axénicas *in vitro*, evaluados mediante el análisis Probit.

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1. Las infecciones por protozoarios parásitos patógenos

Las infecciones por parásitos intestinales constituyen aún un importante problema de salud, por sus altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales, a pesar de que han aumentado los recursos terapéuticos eficaces y que muchos países han establecido programas de control para las parasitosis (Savioli *et al.*, 1992 y WHO, 1992).

Las infecciones por protozoos, se estima que 480 millones de personas sufren de amebiasis causada por *Entamoeba histolytica* (WHO, 1990) y aumentan los reportes de infecciones por protozoos intestinales, como *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis*, los que pueden causar diarreas crónicas e intensa con mala absorción, autolimitadas en individuos inmunocompetentes, como niños y viajeros procedentes de zonas endémicas, hasta los trastornos marcados del equilibrio hidromineral en pacientes afectados por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Okhuysen, 2001; Jong, 2002 y Gendrel *et al.*, 2003).

Las infecciones producidas por un protozoo flagelado denominado por *T. vaginalis* que causa la tricomoniasis vaginal también son alarmantes debido a que es la principal enfermedad de transmisión sexual (E.T.S.), de etiología parasitaria, no viral de mayor prevalencia en el mundo; con un total de 170 millones de mujeres infectadas cada año (OMS, 1995). Todo esto ha llevado a que se aumente el interés en la epidemiología y la prevención de estas infecciones emergentes (Lane y Lloyd, 2002 y Leclerc *et al.*, 2002).

### 6.1.2. *Giardia lamblia*

El protozooario *Giardia lamblia*, también conocido como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un parásito del intestino delgado que puede causar importante morbilidad tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados, y que afecta principalmente a niños, sobre todo en las edades de 1 a 5 años (Ali y Hill, 2003). En la actualidad, se considera a este protozoo como el principal agente patógeno encontrado en los brotes de transmisión hídrica que han ocurrido en algunos países desarrollados, como Inglaterra y los Estados Unidos. En este último país se calcula que provoca no menos de 5,000 admisiones hospitalarias al año (WHO, 1992; Hill, 1993 y Marshall, *et al.*, 1997) y las tasas de prevalencia parecen tener una tendencia al aumento (Kappus *et al.*, 1994).

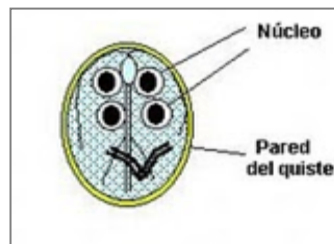
La infección por *G. lamblia* es transmitida a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, y de persona a persona, por lo que en instituciones cerradas como los círculos infantiles se puede presentar un riesgo mayor de transmisión. La giardiasis es considerada como la enfermedad intestinal producida por protozoos más frecuente en países desarrollados y afecta un estimado de alrededor de 280 millones de personas a nivel mundial (Lane y Lloyd, 2002; Ali y Hill, 2003).

La tasas de reinfección por *G. lamblia* son altas en zonas endémicas, por lo que la infección por este protozoo, a diferencia de otras parasitosis intestinales, resulta muy difícil de controlar (Gilman *et al.*, 1988; Dorea *et al.*, 1996). En instituciones como círculos infantiles, se ha llegado a considerar que la erradicación de la infección por *G. lamblia* en todos los niños infectados no es conveniente, no sólo por el costo y los posibles efectos colaterales de los fármacos a emplear; sino también debido a estas constantes tasas de reinfección (Novotny *et al.*, 1990; Furness *et al.*, 2000). Desde el punto de vista clínico, la mayoría de los individuos

infectados con *G. lamblia* son asintomáticos, sin embargo, otros pueden desarrollar manifestaciones clínicas, las que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica y malabsorción intestinal (WHO, 1992; Hill, 1993 y Marshall, *et al.*, 1997).

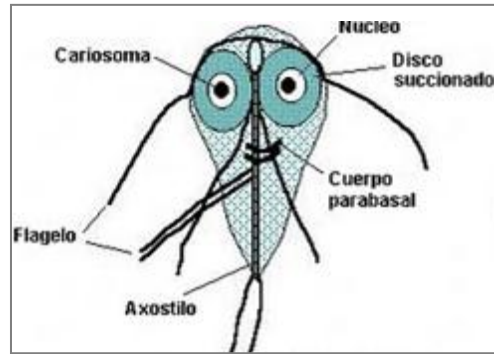
### 6.1.2.1. Morfología y biología

Existen dos fases morfológicas o estadios de este protozoo: el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, y el quiste (forma de resistencia) responsable de la transmisión del parásito. Los quistes son entre redondos u ovoides y miden de 8 a 14 por 7 a 10  $\mu\text{m}$ . Cada uno de ellos tiene cuatro núcleos y contiene estructuras como axonemas y cuerpos medianos. Los flagelos, al igual que los axonemas, están enrollados (Beaver, 1984; Adam, 2001), Fig. 1.



**Fig. 1.** Morfología típica del quiste de *G. lamblia*

Los trofozoítos tienen simetría bilateral, miden de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho, y tienen la forma de “una gota lagrimal” cuando son vistos en sentido dorsal o ventral. Son convexos en sentido dorsal y presentan un disco adhesivo, cóncavo en su porción ventral. Poseen cuatro pares de flagelos dispuestos simétricamente. De ellos, dos son anterolaterales, y dos posterolaterales, dos ventrales y un par caudal, los que tienen su origen en ocho cuerpos parabasales colocados simétricamente en la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos. Además presentan dos axonemas y dos cuerpos medianos. Los trofozoítos tienen dos núcleos que son idénticos, ambos ovoides y con el endosoma central bien diferenciado (Beaver, 1984; Adam, 2001), Fig. 2.

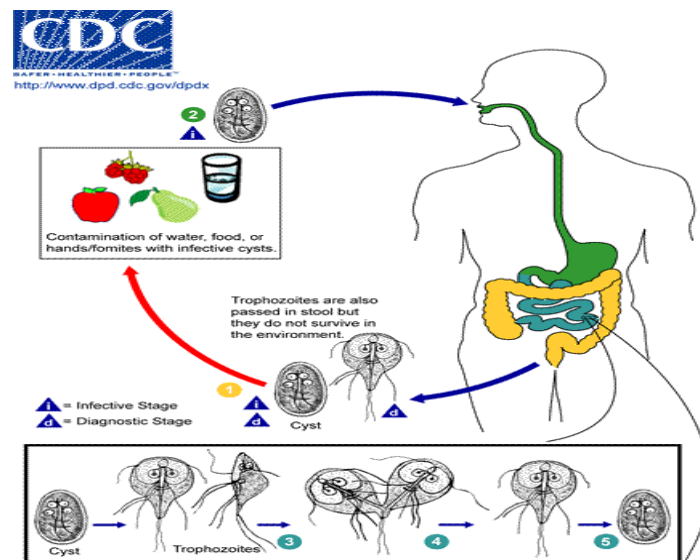


**Fig. 2.** Morfología típica del trofozoito de *G. lamblia*

Estos protozoos contienen cinco cromosomas y son poliploides. Algunas estructuras, tales como las mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y los nucléolos no han sido identificadas, lo que conforma la hipótesis de que este organismo es un eucariota primitivo (Adam, 2001; Upcroft y Upcroft, 1998). Su metabolismo anaerobio similar al de los procariotas hace que sea sensible a algunos fármacos antibacterianos especialmente los nitroimidazoles, los que son activados para formar radicales tóxicos (Upcroft y Upcroft, 1998). Estas especies, según Filice, son: *Giardia agilis* que presenta los cuerpos medianos en forma de lágrimas y que es procedente de anfibios; *Giardia muris*, con los cuerpos medianos pequeños y redondeados, la que se encuentra en los roedores, aves y reptiles; y *G. lamblia* (también llamada *G. intestinalis* o *G. duodenalis*), la que posee los cuerpos medianos con una forma similar a las orejas de un martillo, que son más frecuentemente encontrados dobles que simples, y que se aísla principalmente en los mamíferos (Adam, 2001). Existen dos especies adicionales que son indistinguibles de *G. lamblia* por el microscopio de luz: *Giardia ardeae* (de garzas) y *Giardia psittaci* (de pericos), las que han sido identificadas a partir de las diferencias morfológicas en el examen por el microscopio electrónico. Otra especie, *G. microti*, ha sido descrita sobre las bases de la especificidad de hospederos en ciertas especies de roedores (*Microtus* spp. y *Ondatra zibethicus*).

### 6.1.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida está compuesto de dos estados fundamentales: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la forma infecciosa de este protozoo, relativamente inerte y resistente a los cambios ambientales, aunque puede ser destruido por la desecación y el calor. Sin embargo, es viable en agua fría hasta por 16 días, y es resistente a las concentraciones de cloro utilizadas habitualmente en los sistemas de acueductos. Después de la ingestión, ocurre el desenquistamiento que comienza en el estómago y se completa en el duodeno, como resultado de la exposición al pH ácido del estómago y a las enzimas pancreáticas, quimiotripsina y tripsina. Se producen dos trofozoítos (estado vegetativo) de cada quiste. Los trofozoítos se replican en las criptas del duodeno y en la porción superior del yeyuno, y se reproducen asexualmente por fisión binaria o bipartición. Algunos de los trofozoítos pueden enquistarse en el íleon, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol (Beaver, 1984 y Adam, 1998), (Fig. 3).



**Fig. 3. Esquema del ciclo de vida de *G. lamblia*.** (2) Los alimentos y agua contaminada con *G. lamblia* son la fuente de infección de este parásito. (1) En su forma infectante, éste se presenta en forma de quistes, (3) Este quiste luego es ingerido por el hospedador y en el intestino pasa a su fase de trofozoíto. (5) El parásito es liberado en fase de trofozoíto o de quiste por las heces. Es ahí cuando *G. lamblia* puede encontrarse en suelos, aguas y alimentos contaminados, capaz de infectar nuevamente a otros organismos. (4) *G. lamblia* se reproduce mediante fisión binaria, o bipartición. Imagen tomada de www.CDC.com.



La infección por *Giardia* puede ser transmitida por el agua o los alimentos, y la vía fecal-oral se puede complementar de persona a persona. Las frutas, vegetales (Robertson y Gjerde, 2001) y el agua (Marshall *et al.*, 1997) son los vehículos principales de la transmisión. Sin embargo, poco se conoce acerca de la importancia relativa de las diferentes rutas de la infección (Ortega y Adam, 1997). Se ha señalado la importancia de algunos fomites entre los que se incluyen hasta los juguetes (Smalheiser, 2004) y algunos vectores mecánicos como las moscas, los que pueden tener particular importancia en los mecanismos de diseminación de los quistes (Graczyk *et al.*, 2003).

Este protozoo se encuentra en animales domésticos como gatos y perros, así como en una variedad de animales silvestres como los castores, que han sido implicados en brotes de transmisión hídrica; sin embargo, no está claro si los humanos pueden ser infectados con aislamientos de *Giardia* procedentes de animales. Aunque el potencial zoonótico de la giardiasis ha sido sostenido por estudios de transmisión cruzada entre los humanos y animales, un análisis más minucioso de estos estudios revela varias limitaciones en las metodologías utilizadas.

### **6.1.2.3. Taxonomía**

La clasificación taxonómica del protozoo *Giardia* ha sido un tema muy polémico en los últimos años debido entre otras a las siguientes razones:

1. Muchas de las primeras descripciones taxonómicas de *Giardia* spp., asumieron una diferente especie, para cada huésped infectado y consecuentemente se sobreestimó el número de especies.
2. Subsecuentemente se ha comprobado que las descripciones de especie basadas sólo en las diferencias morfológicas detectadas por simple microscopía óptica, subestiman las diferencias entre aislamientos, cepas o especies.

3. Los experimentos de transmisión cruzada de un huésped a otro han producido resultados inconsistentes.
4. Las herramientas disponibles para distinguir los aislamientos de *Giardia* han sido insuficientes, hasta la reciente introducción de métodos de biología molecular y microscopía electrónica para clasificar a *Giardia* spp.

*G. lamblia* es un protozoo flagelado que ha sido ubicado taxonómicamente de acuerdo con la descripción de la Tabla I.

**Tabla I**

Clasificación taxonómica de *G. lamblia* (Levine *et al*, 1980)

Reino	Protista	
Subreino	Protozoa	
Phyllum	Sarcomastigophora	Protozoos que presentan un solo tipo de núcleo, reproducción asexual, cuando existe, esencialmente singámica. Poseen flagelos, pseudópodos, o ambos tipos de organelas locomotrices.
Subphyllum	Mastigophora	Trofozoítos que poseen típicamente uno o más flagelos, reproducción asexual, la que básicamente se produce por fisión binaria longitudinal; en algunos grupos presentan reproducción sexual.
Clase	Zoomastigophorea	Cloroplastos ausentes, uno o varios flagelos presentes, formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos.
Orden	Diplomonadida	Con uno o dos cariomastigontes, cada uno, con uno o cuatro flagelos; al menos, uno de esos flagelos es recurrente; con dos núcleos, sin mitocondrias o aparato de Golgi. Con quistes. Pueden ser parasitarias o de vidas libres.
Familia	Hexamitidae	De 6 a 8 flagelos, dos núcleos y algunas veces axostilos y cuerpos medianos o parabasales; presentan simetría bilateral.
Género	<i>Giardia</i>	Difieren de otros miembros de la familia Hexamitidae porque poseen un disco adhesivo, el que sirve como una organela para la fijación, en la superficie ventral del trofozoíto.
Especie	<i>lamblia</i>	Es la única especie del género que ha sido descrita en humanos.

#### 6.1.2.4. Epidemiología

Este es uno de los protozoos más comunes del hombre a nivel mundial. Estudios realizados en algunos países subdesarrollados han verificado que a la edad de 3 años todos los niños han sido infectados en esas poblaciones (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997 y Procop, 2001). La infección con este protozoo, está emergiendo como una de las principales causas de diarrea infecciosa no viral, en niños que asisten a círculos infantiles, lo que ha llevado a considerarlo como una enfermedad infecciosa reemergente (Thompson, 2000).

En países desarrollados, aunque la infección ocurre menos frecuentemente, constituye un importante problema para la salud pública. En los Estados Unidos, por ejemplo, donde la prevalencia de infección parece estar incrementándose, ésta es la principal causa de brotes de enfermedad diarreica asociados con agua potable y es responsable de un estimado mínimo de 5,000 admisiones hospitalarias al año (Kappus *et al.*, 1994, y Furness *et al.*, 2000). Los factores de riesgo para la infección incluyen el pertenecer al grupo de 1 a 4 años de edad, asistir a guarderías infantiles, ingerir agua no filtrada, viajar a países donde la infección es altamente endémica, las prácticas de sexo oral-anal, y la presencia de ciertos trastornos inmunitarios, como la hipogammaglobulinemia (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997 y Okhuysen, 2001). Los lactantes parecen estar más protegidos, y esto pudiera deberse al efecto de la lactancia materna o a una menor probabilidad de ingerir quistes en estas edades (Farthing, 1996; Faubert, 2000 y Tellez *et al.*, 2003).

En países subdesarrollados, los factores de riesgo para adquirir la infección no están siempre bien definidos. Las infecciones ocurren más frecuentemente en niños que en adultos, con especial énfasis en los preescolares, aunque no está claro aún si esto es debido a una mayor

exposición a la parasitosis en la niñez temprana o al desarrollo de inmunidad en la niñez más tardía, después de repetidas exposiciones (WHO, 1990 y Procop, 2001).

#### **6.1.2.5. Control y prevención**

Los esfuerzos de la salud pública para controlar la infección por *G. lamblia* se han visto obstaculizados por la existencia de lagunas en los conocimientos acerca de la biología, la historia natural, la ecología y la transmisión del microorganismo; así como los factores de riesgo en diferentes condiciones, y las respuestas clínicas e inmunitarias de la infección en el hospedero humano (WHO, 1990 y Procop, 2001).

Es probable que el empleo de una sola medida de control no sea completamente efectivo en la prevención y el control de la infección. La estrategia básica para el control de la transmisión de *G. lamblia* se basa en prevenir o reducir la exposición a las heces infectivas. Los métodos para llevar esto a cabo pueden ser sofisticados o simples y deben ser adaptados a las situaciones locales.

En algunos países desarrollados, la infección y la enfermedad han sido asociados a brotes de transmisión hídrica, en grupos de riesgo relativamente bien descritos. Sin embargo, aun en estos países, la mayoría de las infecciones son más bien esporádicas que asociadas a brotes, y casi siempre el origen de la infección es desconocido. Tener la cultura del lavado de las manos, la buena higiene personal, el uso de letrinas y de sistemas adecuados para el depósito de las excretas son algunas de las principales medidas recomendadas. Hay que tener en cuenta que en zonas endémicas, el papel de la transmisión persona a persona puede ser muy importante y las medidas de control deben ir dirigidas a interrumpir este ciclo de transmisión. Son muy importantes la educación sanitaria para promover la higiene personal, el

suministro de agua potable segura y la efectiva deposición de excretas. La importancia de los animales reservorios no está clara aún y se necesitan todavía más investigaciones al respecto (Ortega y Adam, 1997 y Procop, 2001).

#### **6.1.2.6. Patogenia y fisiopatología**

En los casos sintomáticos, se ha observado aplanamiento de las microvellosidades, infiltración linfocítica y malabsorción. La presencia de una toxina no ha sido bien y consistentemente demostrada hasta la fecha, y son pocos los mecanismos potenciales identificados a través de los cuales el protozoo pueda causar diarrea. La giardiasis provoca una malabsorción de electrólitos y fluidos asociada con una afectación del borde en cepillo y una disminución del área de absorción, por lo que la diarrea asociada con esta parasitosis causa más bien, una malabsorción en vez de una secreción activa (Buret *et al.*, 1992). El daño del borde en cepillo de las microvellosidades y la disminución de la actividad de las disacaridasas pueden llevar a incrementar las cantidades de disacáridos en la luz intestinal y causar diarrea osmótica (Nain *et al.*, 1991).

El papel protector de la microflora puede estar relacionado con la competencia por sustratos nutricionales, la competencia específica por sitios receptores en la mucosa intestinal, la producción de compuestos antimicrobianos y metabolitos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, y la amplificación de la respuesta inmune (Perez *et al.*, 2001). Las diferencias en la flora normal del huésped pudieran explicar parcialmente la capacidad del parásito para provocar cuadros clínicos variables en los hospederos (Singer y Nash, 2000 b y Torres *et al.*, 2000).

### 6.1.2.7. Giardiasis

*G. lamblia* fue el primer protozoo humano, visto en 1681 por el científico holandés Antonie Van Leeuwenhoek, quien lo observó precisamente en sus propias heces diarreicas. Sin embargo, las ilustraciones de Leeuwenhoek no fueron tan claras como las del profesor Vilém Lambl. Este flagelado fue denominado inicialmente como *Cercomonas intestinalis* por Lambl en 1859; sin embargo, el parásito recibió poca atención hasta 1902, cuando el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles comenzó a sospechar una relación causal entre la infección por este flagelado y las diarreas (Cox, 2002 a) y propuso en 1915 una denominación nueva *G. lamblia* en honor del profesor A. Giard de Paris, y en del Dr. F. Lambl de Praga (Beaver, 1984 y Adam, 2001). Los estudios más recientes han demostrado que este parasitismo afecta al hombre desde tiempos prehistóricos (Ortega y Bonavia, 2003). Aunque durante mucho tiempo se pensó que era un comensal humano, no es hasta los años 60 que se comienza a conocerse claramente que puede producir diarreas y malabsorción en el hombre (Cox, 2002 a).

El nombre de especie *G. lamblia* fue ampliamente aceptado hasta los años 70, en los 80 se comenzó a extender el uso del término de *G. duodenalis* y en los 90 el de *G. intestinalis*. Actualmente no existe una razón convincente para abandonar el uso del nombre de *G. lamblia*, el cual ha sido ampliamente aceptado en la literatura biomédica. A pesar de eso, la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica está revisando aún esta cuestión (Adam, 2001). En los 300 años transcurridos desde que fue descubierto por primera vez, este protozoo ha comenzado a reconocerse con fuerza, como un parásito común y un patógeno potencial a escala mundial; sin embargo, aún existen muchos aspectos desconocidos como el número de especies que infectan a los humanos, y cuál es el papel, si existiese, que juegan los huéspedes reservorios en la epidemiología de la infección (Cox, 2002 a).

### 6.1.2.7.1. Manifestaciones clínicas en el hombre

La infección en el hombre tiene una evolución clínica variable, que va desde la infección asintomática, la mayoría de las veces, hasta la diarrea severa. Esto parece estar relacionado tanto con factores del hospedero como del agente biológico. El período de incubación después de la ingestión de quistes es variable y puede ser tan corto como una o dos semanas (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997 y Procop, 2001). Los signos y síntomas de la enfermedad son difíciles de distinguir de los de otras enfermedades gastrointestinales. La infección no siempre produce diarrea. De hecho, otros síntomas digestivos como los dolores abdominales y los cólicos pueden ocurrir más frecuentemente que la diarrea (Beaver *et al.*, 1984; Adam, 1998 y Aparicio Tijeras *et al.*, 2004).

*Giardia* es reconocida como una causa de rápida pérdida de peso y malabsorción de grasas, y puede presentarse lo mismo en forma crónica, que en forma aguda. Se ha descrito incluso que la afección de las funciones pancreáticas pudiera ser una causa de severa malabsorción en giardiasis (Carroccio *et al.*, 1997). Diferentes estudios han encontrado los niveles de algunos oligoelementos como el hierro sérico, el zinc (Ertan *et al.*, 2002 y Demirci *et al.* 2003) y el magnesio (Olivares *et al.*, 2003 y Kilic *et al.*, 2004) significativamente más bajos en pacientes infectados con *G. lamblia* que en controles, lo que pudiera deberse a la malabsorción que se produce en la giardiasis (Demirci *et al.*, 2003 y Olivares *et al.*, 2003).

Entre los síntomas digestivos más comunes están la diarrea, los cólicos o dolores abdominales, náuseas, meteorismo y disminución del apetito. En los pacientes con hipogammaglobulinemia, la enfermedad puede ser más grave, con tendencia marcada a la

cronicidad y a la malabsorción. Esto es más evidente en las personas con deficiencias de la IgA secretora. También se ha señalado la deficiencia subclínica de lactasa que puede llevar a una intolerancia de la lactosa, que pudiera persistir aún un tiempo después de la erradicación del parásito (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997 y Procop, 2001).

Este parasitismo se ha visto muy relacionado con trastornos del crecimiento y desarrollo en los niños; algunos estudios han mostrado que la infección por *G. lamblia* tiene un impacto adverso sobre el crecimiento de los niños (Farthing *et al.*, 1986; Valencia *et al.*, 1995; Muniz-Junqueira y Queiróz, 2002, y Sackey *et al.*, 2003) mientras que otros no mostraron relación entre la infección por *G. lamblia* y trastornos nutricionales (Adam, 1998; Lunn *et al.*, 1999 y Moya-Camarena, 2002). Algunos autores postulan que las infecciones asociadas con malnutrición en las edades tempranas de la vida pudieran traer como consecuencia, alteraciones en la esfera cognoscitiva en etapas más tardías de la niñez (Berkman *et al.*, 2002 y Niehaus *et al.*, 2002). De todas formas, numerosas investigaciones se acometen para elucidar estos últimos aspectos, debido a que en ocasiones se hace muy difícil evaluar los efectos de la infección por este flagelado sobre el crecimiento, el estado nutricional y su influencia en la esfera cognoscitiva en niños, a causa de la existencia de varios factores, como la presencia de múltiples patógenos que pudieran explicar estas diferencias en el crecimiento.

#### **6.1.2.7.2. Diagnóstico**

Aunque el examen microscópico de las heces es el método más práctico y efectivo para establecer la presencia de la infección en el hombre, la eliminación de quistes puede ser intermitente, lo que



podría llevar a falsos negativos. Por esta razón, es importante la realización de exámenes seriados con el fin de aumentar la sensibilidad (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997 y Procop, 2001). El examen microscópico de las heces consume tiempo y requiere muchas veces de buena calificación y experiencia del personal que realiza el diagnóstico; los quistes y trofozoítos de *Giardia* se pueden observar en frotis húmedos directos o con coloraciones permanentes. En ocasiones se ha descrito la presencia de quistes retraídos que pierden su estructura normal y toman una coloración anormalmente azulosa o grisácea hialina con la coloración de lugol.

El empleo de métodos parasitológicos de concentración como el método de Ritchie (formol-éter/acetato de etilo) o el de Faust (sulfato de zinc) aumenta considerablemente la sensibilidad del examen parasitológico; sin embargo, el uso de procedimientos de preservación de las heces con formalina podría afectar la flotabilidad de los quistes en algunos métodos parasitológicos como la de concentración por sacarosa (Moitinho *et al.*, 1999).

#### **6.1.2.7.3. Tratamiento**

Un gran número de fármacos han sido empleados para los pacientes sintomáticos, por su acción directa contra el parásito. Los 5-nitroimidazoles son las drogas de elección. Algunos productos de este grupo tales como el tinidazol y el secnidazol se han utilizado en dosis única, pero en ciertos países como en Estados Unidos, estos medicamentos no se consiguen, por no haber sido aprobado aún su uso por las agencias reguladoras (Farthing, 1996 y Ortega y Adam, 1998).

Algunos compuestos antihelmínticos del grupo de los benzoimidazoles, como el mebendazol, fueron ensayados con resultados prometedores al principio, pero los estudios posteriores demostraron una baja eficacia. Otros estudios preliminares señalaron una buena eficacia *in vitro* del antihelmíntico albendazol, pero en ensayos clínicos posteriores se llegó a la conclusión de que su eficacia es inferior a la de las drogas anti-giardiasis clásicas (Gardner y Hill, 2001). Análogos del albendazol y el mebendazol han sido sintetizados y probados *in vitro* contra *G. lamblia* y los resultados indican que algunos de estos compuestos son tan activos como el metronidazol contra *G. lamblia* (Navarrete-Vazquez *et al.*, 2003). Otros compuestos de este grupo, como el fenbendazol, ha tenido buenos resultados en ensayos preliminares con modelos animales (O'Handley *et al.*, 1997; Zajac *et al.*, 1998 y Keith *et al.*, 2003); sin embargo, su eficacia en humanos no ha sido aún bien evaluada. La quinacrina, que fue uno de los primeros fármacos efectivos para el tratamiento, se ha dejado de usar en algunos países por las reacciones secundarias que puede producir en determinados pacientes (Gardner y Hill, 2001).

El tratamiento de los niños asintomáticos es controversial. Aunque generalmente se recomienda no tratar estos casos, en ciertas ocasiones se recomienda basado en consideraciones de salud pública, como pudiera ser el control de brotes de giardiasis en guarderías infantiles, cuando otras medidas preventivas no son efectivas, o para prevenir la infección en los convivientes con un alto riesgo de enfermedad severa.

En los últimos tiempos se ha aprobado el registro para uso en humanos de otros nuevos fármacos, dentro de los cuales resalta la nitazoxanida, un derivado nitrotiazólico, que ha mostrado una buena

efectividad *in vitro* (Adagu *et al.*, 2002), y ha sido utilizado con éxito en varios ensayos clínicos (Rossignol, *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2003). Además del tratamiento con fármacos sintéticos que tienen una mostrada efectividad contra la infección por este flagelado, existen otras opciones terapéuticas potenciales las que incluyen una combinación de intervenciones nutricionales y fitoterapia (Hawrelak, 2003). Este enfoque es considerado útil por algunos autores, sobre todo si se tiene en cuenta el riesgo de efectos colaterales de algunos medicamentos, y la posible emergencia de cepas resistentes a diferentes fármacos, como el metronidazol (Upcroft y Upcroft, 2001).

Los principales objetivos de una intervención nutricional serían reducir la sintomatología aguda de la enfermedad, promover las defensas del hospedero humano, e inhibir el crecimiento y la replicación del parásito. Esto pudiera lograrse mediante el consumo de germen de trigo (Grant *et al.*, 2001) y una dieta de alimentos ricos en fibras (Hawrelak, 2003), pero bajos en grasas y en carbohidratos simples.

La ingestión adicional de probióticos pudiera ayudar en la eliminación de la infección, al interferir en el crecimiento de la infección por *G. lamblia* a través de diferentes mecanismos que incluyen la competencia por los sitios limitados de adherencia (Fuller y Gibson, 1997) y con nutrientes como la glucosa los que pudieran ser utilizados por otros patógenos (Vanderhoof y Young, 1998); además de la estimulación de la respuesta inmune (Heller y Duchmann, 2003 y Schultz *et al.*, 2003). Finalmente el consumo de algunos productos fitoterapéuticos pudiera ser muy útil, sobre todos los que no tienen importantes efectos nocivos o tóxicos, y los que han sido usadas tradicionalmente para mejorar los síntomas y eliminar la infección (Hawrelak, 2003).

### 6.1.3. *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* es un protozoo flagelado causante de la trichomonosis urogenital humana, es considerada una enfermedad de transmisión sexual (E.T.S.) con más prevalencia en el mundo (WHO, 1997). La primera descripción científica de *T. vaginalis* se debe a Donné en 1836: "animalículos en los materiales purulentos y en los productos de secreción de los órganos genitales del hombre y de la mujer". Recibió su nombre de Dujardin, un año más tarde (de "Tricho": pelo y "Monas": zarandeado). Siendo *Trichomonas vaginalis* la especie tipo del género.

La asociación y coexistencia de *T. vaginalis* con otros gérmenes, también causantes de E.T.S., es bastante común (Laga *et al.*, 1991; Zhang y Begg, 1994 ; Sobel, 1997). Existen estudios en los cuales se hace mención de la relación existente entre la trichomonosis y las infecciones provocadas por el virus del papilomavirus humano (PVH) (Ter Meuien *et al.*, 1992 y Jaminson *et al.*, 1995). Además se ha reportado que *T. vaginalis* puede actuar como transportador de otros virus (Pindak *et al.*, 1998 y Cu-Uvin *et al.*, 2002).

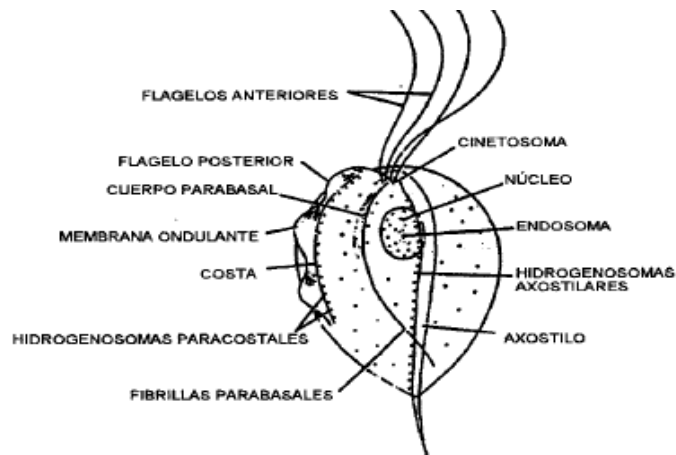
#### 6.1.3.1. Morfología

La morfología del parásito es muy variable, desde aspectos piriformes, semilunares, esferoidales en medios líquidos, con una actividad locomotriz muy intensa, hasta formas ameboides en medios semisólidos (agar), que disminuyen su movilidad. Los agentes que determinan tal polimorfismo son múltiples: la flora bacteriana concomitante, pH y presión osmótica del entorno y la riqueza de nutrientes del medio. Dentro del género *Trichomonas spp.*, la especie *vaginalis* ha sido la más ampliamente estudiada. Este patógeno urogenital varía en talla y en forma, mide como promedio 10  $\mu\text{m}$  de largo por 7 de ancho. Su apariencia varía de acuerdo a las condiciones físico químicas del medio donde se encuentre.

En cultivos axénicos adopta una forma ovalada, y tiende a ser más uniforme que cuando se adhiere a las células epiteliales vaginales, donde adquiere una forma ameboide (Arroyo *et al.*, 1993). *Trichomonas vaginalis* es un protozoo que posee 5 flagelos; cuatro de ellos localizados en su porción anterior y un quinto que recorre todo el borde externo de una expansión protoplasmática llamada membrana ondulante que ocupa los dos tercios anteriores del parásito. La principal función de estos flagelos es el desplazamiento del parásito con movimientos de rotación y traslación. En condiciones ambientales desfavorables el parásito puede internalizar los flagelos adoptando una forma semirredondeada a la cual algunos han denominado pseudoquistes (Honigber y Brugerolle, 1990).

Posee un núcleo redondeado u ovalado, localizado en la porción anterior del trofozoíto, con cromatina granular uniformemente distribuida y cariosoma subcentral. A partir del núcleo sale una estructura de aspecto hialino denominada axostilo que se extiende en forma longitudinal por todo el parásito. El citoplasma incluye gránulos que tienen importantes funciones metabólicas como son las vacuolas digestivas y los hidrogenosomas denominados así por su relación con la producción de hidrógeno molecular (Muller, 1988).

La membrana plasmática es una estructura de gran interés, ya que su composición bioquímica puede estar relacionada con marcadores de patogenia. Se han estudiado mediante lectinas ciertas glicoproteínas relacionadas con la virulencia (Wantor & Honigberg, 1983). Se ha comprobado la existencia de receptores superficiales para proteínas propias del hospedador, relacionando el hecho con su comportamiento patógeno. En la Fig. 4 muestran esquemas de la morfología microscópica de *T. vaginalis*.



**Fig. 4.** Morfología típica del trofozoito de *Trichomonas vaginalis*. Imagen que muestra los organelos típicos de *T. vaginalis*.

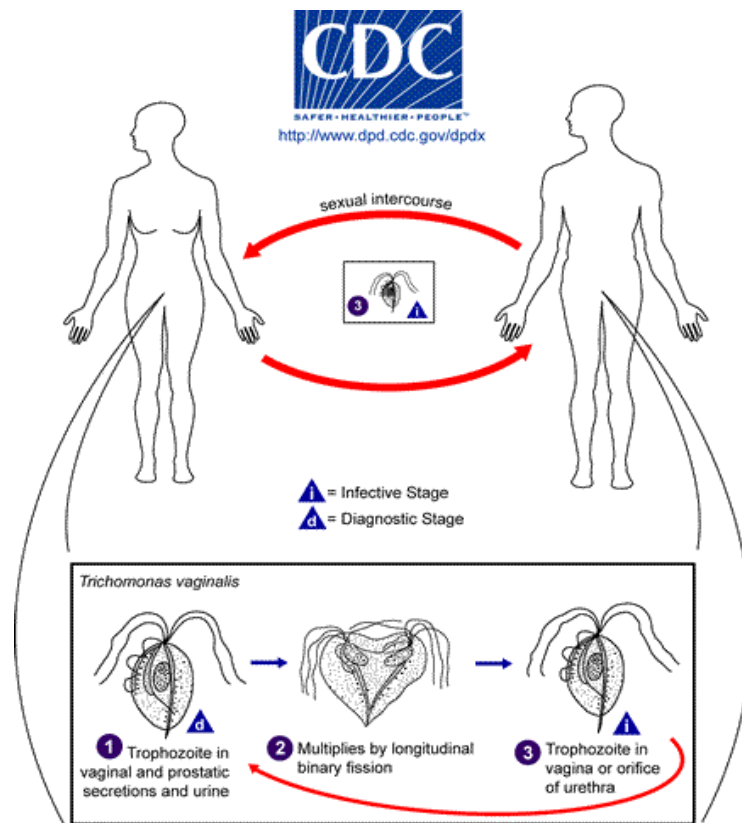
### 6.1.3.2. Ciclo de vida

*T. vaginalis* sólo existe en forma de trofozoíto. Se localiza en la vagina, glándulas prostáticas, vesícula seminal y uretra; en condiciones óptimas se multiplica de forma asexual por fisión binaria longitudinal dando lugar a dos nuevos trofozoítos. La forma más común de transmisión es de persona a persona, a través del contacto sexual. *T. vaginalis* se divide mediante fisión binaria, con división nuclear pleuromitótica.

La fuente esencial de energía es la glucosa que estimula fuertemente su crecimiento, siendo otros azúcares utilizados en menor grado, a excepción de la galactosa y la lactosa, que no parecen ser utilizados. La riqueza de la cavidad vaginal en glucógeno y glucosa permiten explicar la notable multiplicación del parásito en este medio. *T. vaginalis* posee enzimas que permiten un metabolismo activo de los glúcidos tanto por la vía de Embden-Meyerhof como por el ciclo de las pentosas, siendo capaz de fijar anhídrido carbónico. *T. vaginalis* no forma quistes de resistencia. Sin embargo, se puede observar en vagina y uretra masculina, así como en los cultivos agotados, la existencia de parásitos redondeados e inmóviles sin

flagelos visibles, que algunos consideran formas de resistencia, denominadas polimastigotes (Honigberg & Brugerolle, 1990).

Los trichomonas polinucleares no pueden ser considerados como formas quísticas, dada su escasa resistencia a la desecación y a las variaciones de pH. En la Figura 5. se presenta el ciclo de vida de *T. vaginalis*.



**Fig. 5.- Ciclo de vida de *T. vaginalis*.** Las etapas que componen el ciclo de vida de *T. vaginalis* son las siguientes: 1) En adultos la transmisión es directa por intercambio sexual. 2) Su reproducción es por división binaria. 3) Los trofozoítos, en general sólo infectan la superficie del tracto vaginal y el cérvix en la mujer. En el varón infectado la localización más común es el epitelio uretral y las glándulas prostáticas. En el contacto sexual con el varón infectado la mujer adquiere el parásito y viceversa. Imagen tomada de [www.CDC.com](http://www.CDC.com).

### 6.1.3.3. Taxonomía de *T. vaginalis*

*T. vaginalis*, según la revisión realizada por Levine *et al.*, 1980, para la clasificación de los protozoos, presenta la siguiente clasificación taxonómica (Beaver *et al.*, 1994), enlistada en la Tabla II.

**Tabla II**

Clasificación taxonómica de *T. vaginalis* Donné 1836 (Beaver *et al.*, 1994)

Reino	Protista	(Aeckel, 1866, Whittaker, 1977)
Subreino	Protozoa	(Goldfiis, 1818, Von Siebold, 1845)
Filo 1	Sarcomastigophora	(Honigberg & Balamuth, 1963)
Sublilo 1	Mastigophora	(Diesing, 1866)
Clase I	Zoomastigophorea	(Calkins, 1909)
Superorden 1	Parabasilidea	(Honigberg, 1973)
Orden Vii	Trichomonadida	(Kirby, 1947, Mattern & Honigberg, 1974)
Familia	Trichomonadidae	(Chalmers & Pekkola, 1918, Kirby, 1946)
Subfamilia	Trichomonadidae	(Honigberg, 1963)
Género	<i>Trichomonas</i>	(Donné, 1836)
Especie	<i>Trichomonas vaginalis</i>	(Donné, 1836, Ehrenberg, 1838)

### 6.1.3.4. Epidemiología

*T. vaginalis*, tiene una distribución cosmopolita. La infección tiene una incidencia de más de 170 millones de casos anualmente a nivel mundial, en los Estados Unidos se reportan aproximadamente 3 millones de casos nuevos por año (WHO, 1997). En Cuba existen muy pocos antecedentes de estudios que indiquen la prevalencia de la trichomonosis y la mayoría han estado dirigidos a relacionar la presencia o no del parásito con alguna enfermedad del sistema genito-urinario. Esta infección se ha relacionado con el cáncer cervical (Gram *et al.*, 1992; Kharsany *et al.*, 1993; Zhang y Begg, 1994; Viikki *et al.*, 2000), la enfermedad pélvica inflamatoria (Heine y Mc Gregor, 1993) y la infertilidad (Grodstein *et al.*, 1993). Las mujeres infectadas



durante el embarazo poseen predisposición a la ruptura prematura de membranas placentarias (Minkoff *et al.*, 1984; Saurina y McCormack, 1997), al parto prematuro y a tener hijos de bajo peso al nacer (Cotch *et al.*, 1997), lo cual se traduce en importantes implicaciones médicas, sociales y económicas (Carey y Klebanoff, 2001 y Smith *et al.*, 2002).

El principal mecanismo de transmisión de la infección es el contacto sexual. En forma ocasional puede ser contraída a través de baños de inmersión en piscinas, y por uso compartido de ropa interior y toallas. Esta forma de transmisión extravénerea tiene lugar fundamentalmente en niñas y en mujeres vírgenes. Los recién nacidos hijos de madres infectadas pueden adquirir el parásito a través de su paso por el canal de parto. Del 2-17% de las infecciones en el neonato han tenido lugar por este mecanismo. En los Estados Unidos, la tasa de infección por *T. vaginalis* es mayor en mujeres de la raza negra que en las blancas, lo que parece estar asociado a factores socioeconómicos y al nivel de educación (Petrin *et al.*, 1998).

El trofozoíto es muy lábil y se destruye con facilidad en el medio ambiente, especialmente en ausencia de humedad y pH adecuados, sucumbe a temperaturas mayores de 40° C o a la exposición directa de la luz solar. La temperatura óptima de desarrollo en cultivos es de 37° C, reproduciéndose cada 5 a 9 horas. La acidez normal de la vagina (pH 4 - 4.5) generalmente desfavorece la infección. Una vez establecida la infección el mismo parásito provoca una tendencia a la alcalinidad, con lo cual favorece su crecimiento. El hallazgo de este protozoo en las adolescentes está en estrecha relación con la presencia de factores de riesgo tales como, el inicio precoz de las relaciones sexuales y la falta de educación en cuanto al uso del condón como método no solo anticonceptivo sino también preventivo de las E.T.S., en relación a estas causas, se ha reportado que un 39% de las adolescentes estudiadas habían comenzado su actividad sexual antes de los 15 años

(Jaminson *et al.*, 1995). Otro factor condicionante de no menos importancia, lo es sin dudas, las múltiples parejas sexuales.

#### **6.1.3.5. Control y prevención**

La manera más segura de evitar el contagio de enfermedades de transmisión sexual es la abstención del contacto sexual, o tener una relación estable y mutuamente monógama con una pareja que se haya hecho las pruebas de detección y que se sabe que no tiene ninguna infección. Los condones de látex para los hombres, cuando se usan de manera habitual y correcta, pueden reducir el riesgo de transmisión de la trichomonosis. Cualquier síntoma en el área genital, como por ejemplo secreción o ardor al orinar, una llaga o irritación poco usual, debe ser razón para dejar de tener relaciones sexuales y consultar con un médico de inmediato. Una persona a quien se le haya diagnosticado trichomonosis (o cualquier otra E.T.S.) debe recibir tratamiento y avisar a todas las personas con las que haya tenido relaciones sexuales recientemente para que éstas también consulten a un médico y puedan tratarse. Esto reduce el riesgo de que las parejas sexuales presenten complicaciones por la trichomonosis y el riesgo de re-infección en las personas que han tenido el parásito. Una persona con trichomonosis y todas sus parejas sexuales recientes deben dejar de tener relaciones sexuales para hacerse el tratamiento contra la infección y esperar a que desaparezcan los síntomas (<http://www.cdc.gov/std/>).

#### **6.1.3.6. Patogenia y fisiopatología**

El mecanismo exacto de patogenia se desconoce, la relación parásito-hospedador es muy compleja y el amplio rango de manifestaciones clínicas no puede ser atribuido a un único mecanismo de patogenia. La membrana celular de *T. vaginalis* debe jugar un papel clave (Petrin *et al.*, 1998), puesto que interviene en la adherencia, interacción parásito-hospedador e

incorporación de nutrientes, procesos en los que intervienen las proteínas y glicoproteínas superficiales.

Las investigaciones actuales están dirigidas a los eventos iniciales que se requieren para el establecimiento de la infección. Entre los factores que intervienen en la patogenia se han descrito dos tipos de mecanismos: mecanismos contacto-dependientes y mecanismos independientes. En relación con los primeros se ha señalado la adherencia de *T. vaginalis* a las células epiteliales. Alderete *et al.*, en 1992 describieron cuatro proteínas de superficie denominadas adhesinas con masas moleculares de 65, 51, 33 y 23 Kda que median la interacción del parásito con las células epiteliales y las protegen de la citotoxicidad contacto-dependiente (Alderete *et al.*, 1992). Las adhesinas se expresan de forma alterna con una glicoproteína altamente inmunogénica que se conoce como P270. El proceso de adhesión requiere además de la presencia de cisteín proteinasas del parásito. Se han identificado al menos 11 proteinasas en la superficie del parásito que participan en los procesos de adhesión por mecanismos aún no esclarecidos (Arroyo y Alderete, 1989).

La laminina es una glicoproteína especializada de las células vaginales localizadas en la membrana basal del epitelio que promueve la adhesión, diferenciación y se ha comprobado que tiene propiedades quimiotácticas. Se ha demostrado a *T. vaginalis* adheridas a plásticos cubiertos con laminina (Costa e Silva Filho *et al.*, 1988) y endocitando partículas de poliestireno cubiertas con laminina (Benchimol *et al.*, 1990). *T. vaginalis* tiene receptores para otra glicoproteína que está presente en las células de la vagina, denominada fibronectina, la cual se expresa en la membrana basal y es secretada al suero. *T. vaginalis* puede encontrarse unida a la fibronectina de las células del hospedero (Peterson y Alderete, 1982), pero no está claro si la función del receptor de fibronectina está relacionado con la adquisición de

nutrientes, con la adhesión (Alderete *et al.*, 1994) o con la combinación de ambas funciones (Gold y Ofek, 1992).

Los carbohidratos (D-lactosa y N-acetil-B-D-glucosamina) presentes en la superficie de *T. vaginalis* y el posible papel de estas moléculas en el fenómeno de adhesión fueron descritas por Wantor y Honigberg, 1983. La presencia de carbohidratos parece estar relacionada con la virulencia (Kon *et al.*, 1988) y se piensa que algunas de estas moléculas pudieran estar involucradas en la lisis de eritrocitos (De Carli *et al.*, 1994), en la fagocitosis de células blanco (Benchimol y De Souza, 1995) y asociadas al fenómeno de susceptibilidad a drogas (Dias Filho *et al.*, 1992).

En relación a los mecanismos contacto independientes, Garber *et al.*, en 1989, describieron una sustancia soluble denominada factor de despegamiento celular (CDF), que cuando se pone en contacto con monocapas de células en cultivo *in vitro* provoca el desprendimiento de estas células de los cultivos (Garber *et al.*, 1989). Esta sustancia parece ser una glicoproteína y es inmunogénica en el hombre. Su papel patógeno no se conoce, pero podría ser responsable de la producción del eritema visto en la mucosa vaginal durante la infección aguda. En otra comunicación, Garber y Lemchuk- Favel en 1990 hacen referencia a que los niveles de CDF se correlacionan de forma directamente proporcional con la severidad de los síntomas clínicos producidos en el curso de la trichomonosis, por lo que se considera que puede ser un importante marcador de virulencia de esta parasitosis (Garber y Lemchuk-Favel, 1990). La concentración de CDF puede variar por tres factores fundamentalmente: el tiempo en que se demoran en crecer los parásitos, previo a la preparación del filtrado, el tamaño inicial del inóculo y el pH del medio. El CDF purificado es activo en un rango de pH entre 5.0-8.5 con una actividad óptima a pH 6.5 e inactivo por debajo de 4.5. Esta observación es muy importante desde el punto de vista clínico pues como es conocido el pH normal de la vagina es de 4.5,

pero durante la trichomonosis puede elevarse por encima de 5.0 lo cual sugiere que el CDF puede constituir un importante factor en la patogénesis de la enfermedad (Garber *et al.*, 1989). El factor de despegamiento celular disminuye su actividad con el beta estradiol. Los síntomas de la infección pueden estar influenciados por la concentración vaginal de estrógenos. Esto puede explicar el empeoramiento de los síntomas durante la menstruación, cuando los niveles de estrógenos son más bajos (Garber *et al.*, 1991).

La interacción de *T. vaginalis* con los miembros de la flora vaginal (Petrin *et al.*, 1998) así como los mecanismos propios del parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero (Alderete *et al.*, 1992; Provenzano y Alderete, 1995) también han sido mencionados como importantes factores relacionados con la patogenicidad. Todos estos aspectos han contribuido a que la relación huésped parásito en el curso de la tricomoniasis se considere muy compleja y que el amplio rango de síntomas clínicos que pueden tener lugar durante el proceso de infección no debe ser atribuido a un solo mecanismo de patogenicidad.

#### **6.1.3.7. Tricomonosis**

Esta parasitosis presenta una distribución cosmopolita, identificándose en todos los grupos raciales y en todos los estratos socioeconómicos (Petrin *et al.*, 1998; Sorvillo *et al.*, 2001 y Wallace *et al.*, 2002). Los datos más recientes muestran una incidencia anual de más de 170 millones de casos en el mundo (WHO, 1997), pero la prevalencia real es desconocida pues la enfermedad no se notifica. En la mayoría de los casos el diagnóstico se realiza mediante la observación microscópica del frotis directo simple del exudado vaginal (oscila entre un 38 y un 80 %) (Martin *et al.*, 1967; McCann, 1974 y Borchardt y Smith, 1991). Las formas clínicas en el curso de la trichomonosis son muy diversas y van desde las formas asintomáticas hasta formas sintomáticas severas con presencia fundamentalmente de

leucorrea, prurito, dispareunia y punteados hemorrágicos que pueden tener localización vulvar, vaginal y en el cuello uterino (Wendel, 2003). En el hombre, generalmente la infección se presenta de forma asintomática, en algunos casos puede ser la causa de uretritis y prostatitis (Skerk *et al.*, 2002 y Price *et al.*, 2003). Los mecanismos que influyen en la patogénesis aún no han sido bien identificados, lo cual ha motivado polémica entre algunos investigadores.

#### **6.1.3.7.1. Manifestaciones clínicas en el humano**

La trichomonosis es una enfermedad del tracto urogenital humano de transmisión venérea, que si bien no es grave, produce un cuadro clínico muy variado. Así, la cifra de casos asintomáticos se aproxima al 40% en la mujer, aún cuando el dato pudiera incrementarse en la formación higiénico-sanitaria de las pacientes, habiéndose apuntado una marcada subjetividad en la apreciación de los síntomas (Rojas *et al.*, 1999).

Según datos experimentales, el período de incubación de la tricomonosis es de 4 a 28 días (Beaver *et al.*, 1994). La presencia de síntomas es más frecuente en el sexo femenino; en el hombre generalmente provoca escasa o nula sintomatología (Dragsted *et al.*, 2001). Las variadas formas clínicas de la enfermedad dependen probablemente del número y virulencia del parásito, de la resistencia del huésped y del valor de pH en la vagina. Se ha sugerido que este protozoo pudiera ser el responsable de la inducción de cambios en la mucosa cervical humana, que van desde la displasia hasta el carcinoma *in situ* (Bechtold y Reicher, 1991). En general las manifestaciones clínicas de la trichomonosis son inespecíficas y cualquier causa de cervicitis y vulvovaginitis como las provocadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia*

*trachomatis* y *Gardnerella vaginalis* pueden ser semejantes a las provocadas por *T.vaginalis* (Atias, 1994). Algunos autores señalan que la presencia de *T. vaginalis* contribuye a la esterilidad en varones como en mujeres al estar presente en los órganos utrogenitales (Hynie *et al.*, 1960; Jarecki-Black *et al.*, 1998; Daly *et al.*, 1999; Krieger, 1984 y Joyner *et al.*, 2000).

#### 6.1.3.7.2. Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas no brindan elementos suficientes para efectuar un diagnóstico exacto o de certeza de la trichomonosis. La existencia de portadores asintomáticos hace que necesariamente el diagnóstico esté basado en algún método que demuestre la presencia del parásito. La sensibilidad de las diferentes métodos guarda estrecha relación con el número de parásitos y con el método empleado. Los métodos directos consisten en la demostración por microscopía óptica de parásitos móviles, principalmente en secreción vaginal y son: el examen directo simple del exudado vaginal y el cultivo *in vitro*.

El método de examen directo simple del exudado vaginal, permanece aún como el más ampliamente usado para el diagnóstico de la trichomonosis, por ser un procedimiento útil, sencillo, rápido y de bajo costo, aunque poco sensible. Bajo las mejores circunstancias alcanza una sensibilidad de solo un 38-80% (Martin *et al.*, 1967; Mc Cann, 1974, y Borchardt y Smith, 1991). La posibilidad del examen directo para detectar el parásito está directamente relacionada con el número de *T. vaginalis*, se requieren aproximadamente mil parásitos por mL de secreción para un examen directo positivo. La aplicación de ducha vaginal poco tiempo previo a la toma de la muestra, puede provocar una reducción importante de la sensibilidad del diagnóstico.

El examen directo de la orina es útil especialmente en pacientes del sexo masculino. Consiste en la observación directa de la orina o del sedimento urinario obtenido por centrifugación a baja velocidad de la muestra. La método de coloración de Papanicolaou se ha usado como medio de pesquisa de bajo costo y efectiva para detectar mujeres con *T. vaginalis* (Borchardt y Smith, 1991).

#### 6.1.3.7.3. Tratamiento

Desde 1959, el metronidazol constituye el fármaco de elección para el tratamiento de la tricomoniasis, aunque ya en la década de los años 60 se comenzó a reportar la aparición de casos clínicos con infecciones refractarias después de un tratamiento adecuado (Aure y Gjonnaes, 1969; Diddle, 1969 y Kurnatowska, 1969). Sin embargo, la existencia de cepas de *T. vaginalis* resistentes a esta droga no fue confirmada hasta 1979 (Meingassner y Thurner, 1979).

No fue hasta el año 1959 cuando se encontró que un nitroimidazol derivado del *Streptomyces*, tenía alta efectividad en el tratamiento sistémico de la tricomoniasis. Se trataba del (hydroxietil-2-metil-5-nitroimidazol, comúnmente denominado metronidazol o flagyl. Con anterioridad a esta fecha, solamente se disponían de preparaciones tópicas vaginales que atenuaban los síntomas de la enfermedad, pero no se lograba su absoluta curación, pues este tratamiento local no era capaz de penetrar el epitelio vaginal ni uretral (Lossick y Kent, 1991).

El metronidazol penetra a las células por el mecanismo de difusión simple y es activado en los hidrogenosomas (Muller, 1986), donde el grupo nitro de la droga es reducido anaeróticamente por la enzima piruvato ferridoxinaoxidoreductasa, resultando en radicales



intermediarios citotóxicos. Estos radicales se fijan a las cadenas de ADN del parásito provocando su ruptura y por consecuencia la muerte del parásito. La respuesta es rápida cesando la motilidad y la división celular una hora después de la administración de la droga. La muerte del parásito ocurre a las 8 horas de aplicado el medicamento como ha quedado demostrado en cultivos celulares (Tocher y Edwards, 1994; Martínez y Caume, 2001, y Crossnoe *et al.*, 2002). El parásito puede desarrollar tanto resistencia anaeróbica como aeróbica (Cerkasovova *et al.*, 1986). Sin embargo, en la mayoría de los casos esta última ha sido reportada en aislamientos clínicos resistentes al metronidazol (Upcroft y Upcroft, 2001).

La resistencia aeróbica aparece con la disminución de la habilidad de los parásitos para mantener la anaerobiosis en su interior. Esto ocurre debido a un decrecimiento de la afinidad de su sistema respiratorio por el O<sub>2</sub>, el cual es un potente aceptor de electrones de los radicales nitro y puede inhibir la acción de la droga e incluso interferir con la activación del metronidazol (Cerkasovova *et al.*, 1986 y Quon *et al.*, 1992). Los fallos en el tratamiento casi siempre han sido relacionados con tratamientos incompletos e inadecuados (Grossman y Galask, 1990), con pobre absorción de la droga (Kane *et al.*, 1961), inactivación del medicamento por la flora vaginal (Benazet y Gillaume, 1971) y con las reinfecciones (Korner y Jensen, 1976).

La existencia de aislamientos de *T. vaginalis* resistentes a los nitroimidazólicos fue confirmada a partir de los estudios de susceptibilidad *in vitro* y desde entonces se han reportado aislamientos resistentes a la droga en Estados Unidos y en varios países europeos y africanos (Van der Weiden y Van der Meijden, 1990; Meri *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2002 y Dunne *et al.*, 2003).

## 6.2. Probióticos

Recientemente en una convención de expertos de la Organización Mundial de la Salud y de la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO/OMS 2001), una definición simple y ahora ampliamente aceptada fue propuesta, esta define al término probiótico como “microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en las cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud de quien los consume”.

En 1857 las bacterias lácticas fueron descubiertas por Louis Pasteur, en 1878 Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de la leche ácida, en 1889 Henry Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium*, y *Lactobacillus acidophilus* fue descubierto por Moro en 1900. En el origen del concepto de probiótico es importante referenciar a Ellie Metchnikoff, el científico ruso padre de la teoría celular de la inmunidad, y a su obra titulada “la prolongación de la vida: estudios optimistas”, aparecieron en 1908, el mismo año en el que su autor recibió el Premio Nobel (Podolsky, 1998). Metchnikoff atribuyó a los procesos de putrefacción debidos a bacterias intestinales, la producción de sustancias tóxicas (indol, aminas, amonio) que pasarían al medio interno, causando un proceso de autointoxicación responsable de acortamiento de la vida. Sin embargo, y junto a soluciones más drásticas, él propuso la posibilidad de modificar el equilibrio entre poblaciones bacterianas putrefactas (nocivas) y fermentativas (beneficiosas), a favor de estas últimas, inspirado por la observación de la notable longevidad de poblaciones búlgaras en cuya dieta habitual figuraba el yogurt, éstas ideas fueron discutidas, tanto en su planteamiento fundamental de la existencia de una falta de armonía en el organismo, que es necesario equilibrar si se desea alcanzar la “longevidad sin envejecimiento” como en su elección de consumo del “*Bacillus bulgaricus*” para alcanzar la salud y equilibrio (Podolsky, 1998 y Tannock, 2004). En 1930 el doctor Minoru Shirota aisló a partir del intestino humano *Lactobacillus* y tras varias investigaciones logró fortalecerlos, haciéndolos resistentes a los jugos gástricos y biliar (<http://www.yacult.com>).

La flora intestinal es un complejo ecosistema compuesto por varios cientos de especies de microorganismos, la mayoría de ellos del género bacteria. Éste ecosistema incluye algunos microorganismos considerados patógenos por su capacidad de invadir al huésped, pero también contiene numerosas especies capaces de promover efectos benéficos para la salud. Existen modificaciones transitorias en la relación con cambios dietéticos o derivadas del uso de antibióticos, pero suelen ser reversibles, de modo que cada individuo mantiene una flora estable (Guarner, 2002).

Para que un probiótico sea ideal debe de sobrevivir al tracto gastrointestinal. Llegando intacto al intestino, por lo que necesita ser capaz de adherirse al epitelio para colonizarse y así aumentar la acidez, lo que impide que se desarrollen bacterias que provocan enfermedades. Se han realizado trabajos que demuestran los efectos benéficos de las bacterias lácticas (probióticos) en el tratamiento y prevención de trastornos digestivos en el hombre (Saxelin, 1997).

### 6.2.1. El género *Lactobacillus*

La mayoría de las cepas bacterianas consideradas como probióticos pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico”, que comparten la propiedad de generar ésta molécula como principal producto de su metabolismo fermentativo. Miembros de este grupo son bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, y *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998).

Un miembro característico del grupo de bacterias ácido láctico es el género *Lactobacillus*. Los *Lactobacillus* son bacilos o cocobacilos Gram-positivos no esporulados, que , como miembros del Phylum Firmicutes, tienen un contenido de G+C inferior al 50%; aerotolerantes o anaerobios , su metabolismo es fermentativo, distinguiéndose especies homofermentadoras y heterofermentadoras, y sus complejos requerimientos nutritivos reflejan sus nichos ecológicos ricos en carbohidratos: plantas, residuos vegetales, alimentos

fermentados y como componentes de la microbiota de compartimentos del cuerpo de animales (especialmente el intestino) (Tannock, 2004). La taxonomía del género es complicada y compleja (Klein *et al.*, 1998) hace que la identificación de cepas basada en perfiles de fermentación de azúcares y otros criterios fenotípicos (Wijrzes *et al.*, 1997) sea, en muchos casos, aproximada, requiriéndose combinaciones de métodos fenotípicos y genotípicos (Yeung *et al.*, 2002).

### 6.2.2. El género de *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias fueron originalmente aisladas y descritas en el periodo de 1899-1900 por Henry Tissier. Estas bacterias Gram positivas, productoras de gas, ácido acético y láctico a partir del metabolismo de los azúcares, anaerobias con morfología bífida fueron originalmente nombradas como *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900). Sin embargo, Orla-Jensen en 1924, propuso que *Bifidobacterium bifidus* fuera clasificado como una especie separada bajo el género denominado *Bifidobacterium*. Este género había sido clasificado como miembro del género *Lactobacillus*, debido a su forma y a sus características fermentativas obligadas. Aun así, estudios detallados de hibridación de DNA, contenido de G + C y sus capacidades de metabolismo único hasta que las diferencias en el metabolismo de las hexosas provocó como resultado en la resurrección del género *Bifidobacterium*, siendo incluido como tal en la 8ª Edición del Manual de Bergey aparecida en 1974.

A medida que se fue profundizando en las investigaciones, se descubrieron varias propiedades de este microorganismo, probándose que era incapaz de reproducirse en presencia de oxígeno, por esta razón se clasificó en el grupo anaerobio obligado *Bifidobacterium*, el cual comprende 11 especies. La mayoría de las cepas de bifidobacterias que son importantes para humanos, crecen a una temperatura óptima de 36 a 38°C. Son microbios ácido-tolerantes y el pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.0, sin embargo las cepas de

*Bifidobacterium* que se mantienen en un pH superior a 8.5 no sobreviven. La pared celular de las bifidobacterias tiene la estructura típica de una bacteria Gram positiva, consiste de una cubierta de peptidoglicano que contienen polisacáridos, proteínas y ácidos teicóicos.

Las bifidobacterias poseen una morfología y fisiología características, éstas bacterias son no móviles, no formadoras de esporas, usualmente algo curvadas y bifurcadas con forma de Y y V. Han sido descritas como anaerobias estrictas por Scardovi en 1984; aun así, algunas cepas toleran ciertas cantidades de oxígeno (Simpson, *et al.*, 2004). Las bifidobacterias forman parte de las bacterias anaerobias que se instalan en primer lugar en el intestino de los recién nacidos; factores exógenos como los oligosacáridos presentes en la leche materna contribuyen a la colonización intestinal por estas poblaciones bacterianas concretas (Moreau y Gaboriau 2001). Se ha demostrado que las bifidobacterias constituyen el 95% de la población total bacteriana del intestino en recién nacidos alimentados con leche materna (Harmsen *et al.*, 2000). La población de *Bifidobacterium* decrece en el intestino de humanos adultos, además permanece relativamente estable, representando del 3 al 6 % de la flora fecal. Bifidobacteria, así como otros organismos productores de ácido láctico exhiben un efecto protector contra los efectos devastadores de las enfermedades diarreicas agudas. Bifidobacteria, en particular *Bifidobacterium longum* en distintos estudios, ha mostrado que puede reducir la incidencia y duración de la diarrea asociada a antibióticos (Colombel *et al.*, 1987; Orrhage *et al.*, 2000).

Otra propiedad encontrada a *Bifidobacterium* es que en combinación con otras cepas de probióticos muestra una reducción frecuente de diarrea del viajero. Esta incidencia fue reducida de un 71 a 43 % en turistas, a quienes se les dieron capsulas conteniendo *S. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* (Black *et al.*, 1991).

Estudios realizados a bifidobacterias han arrojado datos que muestran sus efectos antagónicos contra otros microbios patógenos, estos incluyen producción de varios ácidos, bacteriocinas o peróxido de hidrógeno, la competencia por nutrientes o receptores de adhesión, acción anti-toxinas y estimulación del sistema inmune (Fooks y Gibson, 2002 y Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

### **6.2.2.1. Principales funciones de las bifidobacterias en el hombre**

Las bifidobacterias y algunos coliformes cumplen una función muy importante en la microflora intestinal, y es la síntesis de vitaminas, B1, B2, B6, B12, ácido fólico, biotina, niacina, ácido pantoténico y vitamina K (Orla Jensen, *et al.*, 1939).

La flora intestinal posee diversos sistemas enzimáticos constitutivos e inducibles, capaces de varias reacciones metabólicas participando activamente en la digestión (Drassar y Hill, 1974). "La actividad metabólica de la flora intestinal es potencialmente igual a la del hígado". Éste órgano es una planta química del organismo, ya que allí se realizan una gran cantidad de funciones bioquímicas, una de ellas es descomponer y desintoxicar las sustancias tóxicas, absorbidas por el intestino delgado.

La mayoría de los microorganismos de la flora intestinal ejercen efectos tanto benéficos como patógenos, y en algunos casos hay familias que solo ejercen efectos patógenos y que pueden ocasionar un envenenamiento agudo por la producción de sustancias tóxicas. En el caso de *Veillonella*, *Clostridium* y *Proteus*, descomponen los residuos alimenticios y fluidos digestivos, causando putrefacción intestinal y produciendo sustancias carcinogénicas y tóxicas como el amonio, aminas y sulfitos hidrogenados, los cuales causan varios problemas si pasan a la circulación sistémica sin ser descompuestos o desintoxicados en el hígado (Orla Jensen *et al.*, 1945; Hoffmann, 1966, y Drasar y Hill, 1974). Otra consecuencia de la

putrefacción intestinal es la producción de nitrosamina, sustancia que se demostró ser muy carcinogénica (Drasar y Hill, 1974, y Rasic y Kurmann, 1998).

Es fundamental que las bifidobacterias se encuentren dominantes en la microflora. Algunos microorganismos son útiles en la digestión y absorción. Entre ellos el bifidobacterium es particularmente efectivo para aliviar la constipación y lesiones hepáticas. *Bifidobacterium* metaboliza el azúcar transformándolo en lactato y acetato, si la población de bifidobacterias es alta, se formarán mayores cantidades de ácido, volviendo el interior del intestino más ácido, lo cual suprime la fermentación anormal debida a los microorganismos patógenos, y estimula los movimientos peristálticos del intestino, curando la constipación (Mitsuoka, 1986).

Los lactobacilos y *Escherichia coli* seguidos por bifidobacterias y bacteroides son los más activos en la degradación de las nitrosaminas (Rowland y Grasso, 1975). Otras sustancias importantes son los ácidos biliares, colesterol y bilirrubina, son degradados por la flora intestinal, en especial participan bacteroides, Clostridia, Bifidobacterias, Lactobacilos y *E.coli* (Drasar y Hill, 1974). Por otra parte, ejercen un efecto protector sobre el hígado. Si los microorganismos patógenos, predominan en la flora intestinal, se producirán más sustancias tóxicas, lo cual recargará al hígado, y al contrario, las Bifidobacterias no producen sustancias tóxicas, y al inhibir el crecimiento de los patógenos, le reducirá el trabajo al hígado.

#### **6.2.2.2. Prevención de infecciones por estímulo de la inmunidad**

Las bifidobacterias se encuentran en grandes concentraciones en la parte baja del intestino delgado y en el intestino grueso del ser humano, asumiendo el papel de guardián en contra de alguna posible invasión de microbios patógenos que habitan en el intestino grueso. En varios estudios

efectuados se observa que estas bacterias curan los efectos secundarios de las terapias con antibióticos, es decir la alteración de la flora intestinal. Nuestro cuerpo está protegido contra infecciones bacterianas, virales y cáncer gracias a la inmunidad. Si esta es baja, estamos sujetos a infecciones o a sufrir cáncer. Es por esto que es tan importante mantener una buena capacidad inmune, siendo las bifidobacterias las promotoras para elevarla, o recuperarla (Drasar y Hill, 1974, y Rasic, JL, y Kurmann, 1983).

Las bifidobacterias, las cuales sobreviven y se desarrollan en ausencia de oxígeno (anaerobias obligadas), predominan en el intestino grueso. El estómago y la parte superior del intestino delgado contienen pocas bacterias ya que allí los alimentos se mueven más rápidamente, además la saliva contiene lisozima, que es una enzima bacteriolítica, el pH del fluido gástrico es demasiado bajo y el pH de la bilis es demasiado alto (Rasic, JL, y Kurmann, 1983).

### **6.2.3. Importancia de los probióticos**

#### **6.2.3.1. Flora microbiana del tracto gastrointestinal**

El tubo digestivo está formado por cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano (Fig. 6). El colon es uno de los órganos metabólicamente más activos del cuerpo humano, y juega un papel muy importante en la nutrición y en la salud. Entre los distintos componentes de la microflora colónica se encuentran algunas bacterias (bifidobacterias y lactobacilos) que impiden el crecimiento de las bacterias nocivas para la salud humana y, por ello, en la actualidad hay un gran interés en mejorar el desarrollo de las que son benéficas, disminuyendo así el crecimiento de las potencialmente patógenas. Ningún organismo elabora bacterias, es decir, no las genera, simplemente éstas se hospedan en nuestro



intestino. Su incorporación es siempre externa. Durante la vida intrauterina, la luz intestinal permanece estéril pero la colonización comienza inmediatamente luego del nacimiento y alcanza una estabilidad duradera hacia el primer año de vida. Dicha estabilidad puede ser alterada durante episodios de infecciones intestinales, tratamientos antibióticos, inmunodeficiencias transitorias o crónicas y en la vejez (Mateos, 2002).

La flora intestinal siempre está activa y se renueva aproximadamente cada 48 horas. Un factor externo que incide en la composición de la flora es la dieta y esto es particularmente evidente durante la lactancia. Alrededor de 1 a 1.5 Kg. del peso corporal se deben a los microorganismos intestinales, los cuales comprenden alrededor de 100 especies, en un número de  $10^{14}$  células individuales colonizan la parte baja del intestino delgado y el intestino grueso, donde hay ausencia de oxígeno, formando un ecosistema de la microflora intestinal. Esta flora incluye microorganismos benéficos, patógenos y neutrales, los cuales tienen relación estrecha con la salud. El pequeño porcentaje de microorganismos patógenos es de gran importancia, ya que van a tener en alerta al sistema inmunológico, reactivando las defensas locales, en cada parte del tracto digestivo (Rasic y Kurmann, 1983). Por esto al intestino se le denomina “la cuna del sistema inmune” (Klupsch, 1984).

Las bifidobacterias son las más importantes para la salud, ya que ayudan a tener un buen equilibrio con toda la flora intestinal. En términos microbiológicos, el tracto gastrointestinal puede ser entendido en función de tres regiones principales: estómago, intestina y colon; cada una de las cuales poseen una disposición de la población microbiana muy singular (Rastall, 2004). La microflora del colon se ha convertido en el objetivo principal de las intervenciones dietéticas, debido a que estos microorganismos ayudan a completar la digestión (a través del proceso de

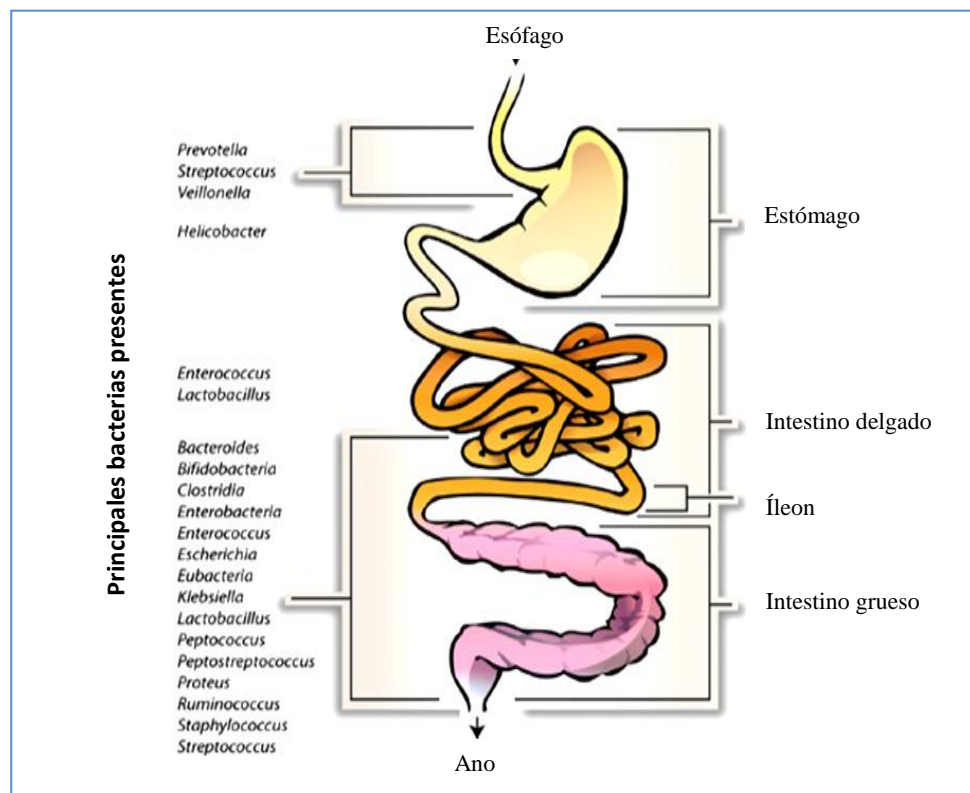
fermentación) protegen contra las bacterias patógenas y estimulan el desarrollo del sistema inmune (Macfarlane y Cummings, 1999).

La cantidad de oxígeno presente en el tracto digestivo depende del sitio mientras hay una cantidad apreciable en el estómago e intestino delgado, el segmento inferior del intestino delgado y el intestino grueso contienen muy poco. La distribución intestinal de los microorganismos depende de la cantidad de oxígeno presente. Las bacterias ácido lácticas, que se desarrollan independientes de la cantidad de oxígeno presente (anaeróbicas facultativas), colonizan el intestino delgado. Cada región del tracto gastrointestinal posee una disposición de la población microbiana muy singular (Tabla III y Fig. 6).

**Tabla III**

Características de la microflora del tracto gastrointestinal (Rastall, 2004)

<b>Tracto gastrointestinal</b>	<b>Características de la microflora</b>	<b>Ejemplos</b>
Estómago	-Muy bajo número de bacterias -Presencia de anaerobios facultativos -Presencia de tan solo 100(UFC)3 mL(pH ácido)	Lactobacilos Streptococos
Intestino delgado	-Mayor carga bacteriana -Presencia de enterobacterias anaerobios y anaerobios facultativos.	Lactobacilos Streptococos Bifidobacterium spp. Bacteroides spp. Clostridium
Colon	-La región con mayor carga bacteriana -Presencia de $10^{11}$ - $10^{12}$ (UFC)/ mL. -Presencia de anaerobios estrictos, enterobacterias y anaerobios facultativos, en menor medida.	Peptococos Bifidobacterium spp. Bacteroides spp. Clostridium Atopobium spp.



**Fig. 6. Microflora del tracto gastrointestinal.** Imagen que muestra la localización de las principales bacterias relacionadas con el tracto gastrointestinal. Madigan MT *et al* 2005. Imagen tomada de Microbial Interactions with Humans, Brock Biology of Microorganisms.

El uso de probióticos ha sido estudiado en alteraciones relacionadas en el equilibrio de la flora gastrointestinal, siendo las más comunes: la diarrea asociada al empleo de antibióticos, la diarrea aguda (sobre todo en población pediátrica), la intolerancia a la lactosa, el síndrome de intestino irritable, las infecciones por *Helicobacter pylori* y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras (Martínez, 2001).

En los últimos años, los probióticos han adquirido una considerable importancia como microorganismos capaces de ejercer un beneficio sobre la salud, por ejemplo en la prevención y en el tratamiento de desórdenes intestinales, en la reducción del riesgo de cáncer o en la modulación de la respuesta inmune, tal como lo demostró Bujalance, *et al.*, 2007 en un

estudio donde empleó *L. plantarum* como inmunomodulador; ya que este estimuló significativamente a los esplenocitos en respuesta a la concavalina A y al mitógeno de las células T (Puertollano *et al.*, 2005).

### 6.2.3.2 Efecto protector de la flora intestinal

Cuando el balance de la flora intestinal está en equilibrio, ésta ejerce un efecto protector contra infecciones intestinales (Savage, 1977). Las bifidobacterias representan un papel importante en la limpieza del ambiente intestinal, por lo cual es necesario que sea el grupo dominante en la microflora. Esto se demostró en un estudio de dos grupos de niños, unos alimentados con leche adicionada con bifidobacterias y factores promotores, y un segundo grupo con leche de vaca, presentando los niños del segundo grupo una tendencia ocho veces mayor a infecciones intestinales (Kaloud y Stögmann, 1968). Con la presencia continua de antígenos (constituida o por la flora patógena) y su paso por la mucosa, el sistema inmune se ve constantemente estimulado. Sin embargo, hay otros factores que inciden en la resistencia del individuo a infecciones intestinales: La competencia de nutrientes esenciales (Savage, 1977), o por el efecto antagónico, para lo cual los dos grupos microbianos representan un papel primordial: *L. acidophilus* y *Bifidibacterium*.

Se ha reportado un compendio de la clasificación de las bacteriocinas en base a las características bioquímicas y genéticas. En donde las bacteriocinas producidas y/o secretadas por *L. plantarum* (plantaricinas E/F y J/K) corresponden a la clase II b o denominada también como clase de los no antibióticos subclase b; dicha clase corresponde a las bacteriocinas formadoras de complejos de poración y que consisten de dos péptidos diferentes. En 1998 Anderssen E., mencionó que las plantaricinas E/F y J/K son bacteriocinas producidas por *L. plantarum* que tienen una actividad antimicrobiana cuando interactúan como sistema de péptidos. Moll N.,

1999, mencionó que los poros formados por complejos de poración E/F y J/K presentan diferente selectividad iónica; ya que la plantaricina E/F permiten el paso de cationes monovalentes en contraste con la plantaricina J/K para compuestos aniónicos (González *et al.*, 2005).

### 6.2.3.3. Efecto protector de la flora microbiana vaginal

La vagina representa un ecosistema dinámico que permanece en equilibrio gracias a una fina interacción de factores tales como la flora normal bacteriana (Ángeles-López *et al.*, 2001). La flora normal vaginal está constituida en un 96% por especies de *Lactobacillus* y únicamente el 4% por bacterias aeróbicas potencialmente y micoplasmas (Eschenbach, 2001).

Estudios basados en cultivos de bacterias, seguidos de tipificación molecular, han mostrado que *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus jensenni* son los organismos predominantes en la mayoría de las mujeres sanas pre-menopáusicas (Antonio *et al.*, 1999). Un análisis de la microflora vaginal en el curso del ciclo menstrual ha mostrado que el 22% de las mujeres mantienen una flora bacteriana estable en la que predominan los lactobacilos, mientras que el 78% restante sufren una alteración de la flora. La receptividad de las células epiteliales a la adherencia de los lactobacilos aumenta en el pico de estrógenos a mitad del ciclo, aunque no es claro qué factores causan tal alteración (Schwebke y Weiss, 2001). Después de la menopausia, del 25 al 30% de las mujeres aún tienen lactobacilos presentes, y éstos pueden aumentar entre el 60 y 100% mediante una terapia de reemplazo con estrógenos por vía oral o vaginal. Por lo tanto, el riesgo de infecciones del tracto urogenital aumenta con la edad y disminuye con la terapia antes mencionada (Reid *et al.*, 2004).

Los lactobacilos son bacterias que constituyen una pieza clave en la flora bacteriana vaginal normal. Algunas especies de lactobacilos tienen la

habilidad para producir ácido láctico, responsable de un pH ácido en la vagina, el cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas. La producción de ácido láctico es considerada como el mejor mecanismo protector de los lactobacilos contra las infecciones vaginales. Algunos lactobacilos producen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en cantidades que exceden la capacidad de los organismos para degradarlo. Éste compuesto puede inhibir o eliminar otros microorganismos, particularmente aquellos que carecen o tienen bajos niveles de peroxidasa o catalasa, enzimas responsables de su degradación (Eschenbach, 2001). Los lactobacilos productores de ( $H_2O_2$ ) tienen un efecto bactericida *in vitro* sobre diferentes bacterias incluyendo *G. vaginalis*, *N. gonorrhoea* y *Prevotella bivia* (Hillier *et al.*, 1993). Además se ha descrito un efecto antiviral en combinación con otros componentes de la vagina (Klebanoff y Coombs, 1991).

Cuando se altera el complejo de balance de la flora vaginal, los microorganismos endógenos potencialmente patógenos que son parte de la flora normal (*C. albicans*, *G. vaginalis* y bacterias anaerobias), proliferan a una concentración que produce síntomas. También pueden favorecer la infección de los microorganismos patógenos transmitidos sexualmente tales como *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* (Eschenbach, D.A. 2001). La interacción *in vitro* de *T. vaginalis* con diferentes especies de lactobacilos es capaz de modificar la virulencia del parásito (Gamiño-Arrollo *et al.*, 2004).

La infección por *T. vaginalis* incrementa el riesgo de adquisición o reactivación del virus del papiloma humano (VPH, y es un cofactor importante para amplificar la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en donde un microambiente cervicovaginal alterado juega un papel importante en la susceptibilidad a la infección (Sorvillo *et al.*, 2002 y Watts *et al.*, 2005).

Diversos estudios han demostrado que la ausencia o disminución de los lactobacilos, asociado con un mayor crecimiento de patógenos anaerobios causantes de vaginitis bacteriana resulta en un incremento significativo en el riesgo de infección por el VIH, virus del herpes simple, *N. gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*. Las bacterias patógenas desplazan a los lactobacilos, elevando el pH y creando un ambiente en el cual los patógenos pueden sobrevivir e infectar al huésped (Reid *et al.*, 2004).

#### **6.2.4. Antagonismo microbiano**

Todas las especies microbianas se encuentran en conflicto constante entre ellas, y el balance intestinal de la microflora depende de las condiciones intestinales. Los microorganismos, que son seres vivos independientes, requieren de condiciones ambientales particulares para su supervivencia. Estos proliferan gracias al consumo de residuos alimenticios y a los fluidos secretados por los órganos digestivos. Sin embargo, algunos de estos fluidos pueden actuar como factor inhibitorio para los microorganismos, dependiendo su secreción de las condiciones físicas y fisiológicas, y de la edad del individuo. El acetato, producido por las Bifidobacterias es un agente supresor de la competencia microbiana (Araya-Kojima *et al.*, 1995).

Existen múltiples ensayos de varias preparaciones de probióticos que han mostrando su eficiencia, tal es el caso de *Bifidobacterium lactis* (BB-12), donde se observó que aquellos sujetos (previamente tratados con ampicilina) que recibían cápsulas de probiótico, su tracto gastrointestinal era recolonizado de manera más rápida que aquellos que recibían placebo. Los efectos adversos como la diarrea solo se observaron en una persona que recibía probiótico en comparación con tres personas que recibían el placebo (se sentían enfermos y presentaban vaginitis y diarrea), por lo tanto la bacterias productoras de ácido láctico pueden ser útiles en el restablecimiento de la microflora durante y después de un tratamiento antibiótico (Black, *et al.*, 1991).

Las infecciones diarreicas son un problema de salud mayor a nivel mundial, convirtiéndose en responsable de millones de muertes cada año (OMS, 1997). La terapia con antibióticos afecta directamente a la microflora intestinal al comprometer su habilidad para colonizar y favorecer el crecimiento de microbios putrefactivos tales como especies de *Clostridium* y *Klebsiella*, debido a esto se han estudiado los probióticos para su utilización como una alternativa en la prevención y tratamiento para infecciones diarreicas. Se ha demostrado efectos benéficos con el uso de *Lactobacillus GG* en enteritis por rotavirus, reduciendo la duración de la diarrea (Isolauri, *et al.*, 1991 y 1994; Majamaa, *et al.*, 1995 y Raza, *et al.*, 1995). También se ha demostrado efectividad en shigellosis (Sepp, *et al.*, 1995). Los resultados en otras infecciones bacterianas parecen ser menos positivos (Raza, *et al.*, 1995 y Pant *et al.*, 1996). Se ha demostrado eficacia en el uso de *S. boulardii* y *E. faecium* SF68 en esta patología (Chapoy, 1985; Cetina-Sauri G, *et al.*, 1989 y Wunderlich P. *et al.*, 1989). El uso de *S. termophilus* y *Bifidobacterium Bb 12* previene la infección por rotavirus (Saavedra, *et al.*, 1994).

En una publicación reciente reportan la disminución del crecimiento celular de los cultivos de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro* por acción de los liofilizados de medios condicionados con *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. lactis* (Barrón González, *et al.*, 2008). Por ello, se ha relacionado el consumo de ciertos alimentos prebióticos, que contienen estas cepas de bacterias, con una estimulación de las defensas (Mateos, 2002). Zamora Herrera, *et al.*, 2007 y Ontiveros Moreno, *et al.*, 2008 emplearon liofilizados de medios condicionados con *B. longum* y evaluaron la actividad biológica tanto en el crecimiento como enquistamiento axénicos *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS.

Es deseable que los microorganismos benéficos sean dominantes en la flora intestinal. Sin embargo se debe anotar, que al utilizar una terapia con antibiótico para eliminar los microorganismos patógenos, se está eliminando igualmente la flora intestinal, causa de síntomas patológicos y enfermedades. Por eso es



esencial asegurar el desarrollo de los microorganismos benéficos y el bajo desarrollo de una flora patógena en el intestino, porque se acumula una serie de metabolitos tóxicos, los cuales son absorbidos y transferidos a la circulación sanguínea, causando problemas de salud. Este caso se puede igualar a la contaminación ambiental, llamándose "Contaminación ambiental interna". Los únicos microorganismos que no polucionan el ambiente interno son las Bifidobacterias y *L. acidophilus*, estos efectos se observan en la Tabla IV.

**Tabla IV**

Efecto de los microorganismos intestinales sobre el humano

Microorganismos	Efecto Benéfico	Efecto Tóxico
Bacteroides	Síntesis vitaminas Previene infección	Putrefacción intestinal Carcinógenos (Patógeno)
Eubacterias	Previene infección Estimula inmunidad	
Estreptococos anaerobio	Previene infección	
<b>Bífidobacterias y <i>Lactobacillus acidophilus</i></b>	<b>Síntesis Vitaminas Digestión y Absorción Previene infección Estimula inmunidad</b>	
Enterococos	Previene infección Estimula inmunidad	
<i>Escherichia</i>	Previene infección Síntesis Vitaminas	Putrefacción intestinal Toxinas microbianas Carcinógenos (Patógeno)
<b><i>Lactobacilos</i></b>	<b>Digestión Absorción Previene infección Estimula inmunidad</b>	
<i>Veillonella</i>		Carcinógenos
<i>Clostridium</i>		Putrefacción intestinal Toxinas microbianas Carcinógenos (Patógeno)
<i>Staphylococcus</i>		Toxinas microbianas (Patógeno)
<i>Proteus</i>		Putrefacción intestinal (Patógeno)
<i>Pseudomonas</i>		Toxinas microbianas (Patógeno)

### **6.2.5. Estrategias terapéuticas**

Existen 3 estrategias alimentarias que promueven el mantenimiento de un equilibrio más saludable de la microflora intestinal, consistentes en la alteración benéfica de su composición, mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos o de ambos basadas en la utilización de prebióticos, probióticos y simbióticos. Los probióticos son microorganismos vivos reconocidos como habitantes normales del intestino humano que, al ser ingeridos, potencian las propiedades de la flora intestinal. Los prebióticos son ingredientes alimentarios (hidratos de carbono no digeribles) que poseen un efecto favorable sobre la flora intestinal ya que estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas. Los simbióticos son la combinación de prebióticos y probióticos. Tanto los prebióticos como los probióticos son considerados alimentos funcionales, y se definen, como aquellos que contienen un componente, sea o no un nutriente, que afecta una o varias funciones del organismo en forma específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico que va más allá de su valor nutritivo tradicional de acuerdo a los recientes lineamientos de la OMS (Hertzler, 2003).

Las estrategias terapéuticas actuales deben tomar en cuenta una terapia de interferencia microbiana, es decir, que permita mantener o restablecer un estado de salud mediante la introducción en el huésped de microorganismos vivos que permitan estabilizar el equilibrio de la flora intestinal. Posibles funciones de los prebióticos y de los probióticos en múltiples casos de enfermedades, tales que una elicitación de una respuesta inmune, los procesos fermentativos en el colon y sus subproductos, sus usos, efectos e implicaciones en la salud del huésped más allá de los beneficios nutricionales, los probióticos y prebióticos y posiblemente también los simbióticos; presentan aplicaciones farmacéuticas importantes (Douglas y Sanderme, 2008).

Es así como en el campo de los derivados lácteos, después de varios años de investigación, ha salido al mercado lo que se llama los "cultivos biológicos" los cuales se diferencian de los tradicionales en que sobreviven el paso del estómago al intestino, y una vez allí son asimilados por el organismo, de forma que fuera de su alto valor nutritivo, poseen adicionalmente un importante carácter terapéutico. Este tipo de cultivo está compuesto por dos clases de bacterias, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* las cuales forman una asociación altamente productiva. Es importante tener en cuenta que las Bifidobacterias ingeridas con yoghurt o sus compuestos estarán más protegidos de la acción de los jugos gástricos, asegurando su llegada al intestino. Se considera que la dosis diaria de Bifidobacterias que debe ser ingerida para mantener una dominancia en el intestino es de  $10^8$  a  $10^9$ , en estas concentraciones se puede asegurar un efecto terapéutico (Podolsky, 1998).

Cuando el ser humano ingiere productos que contengan estas bacterias, éstas encuentran un hábitat adecuado en el intestino, y permanecen viables bajo condiciones normales. Ambos microorganismos son resistentes a sales biliares y a los pH bajos, condiciones normales en el paso por el estómago e intestino. En el caso de los derivados lácteos que contienen las bacterias tradicionales, hay únicamente un aporte nutritivo, ya que generalmente vienen pasteurizados o han sido guardados a bajas temperaturas y ellas requieren una temperatura de más de  $37^\circ$  para mantenerse vivas. No así cuando están liofilizadas, todavía en el empaque de la farmacia, entonces deben estar a  $4^\circ$  y en algunas presentaciones (mesófilos, termófilos y otras para la industria), bajo cero grados centígrados. Las "bacterias biológicas" pueden adicionarse a la leche fresca o a sus derivados, convirtiéndolos así, en alimentos altamente nutritivos y terapéuticos (Podolsky, 1998).

El Dr. Elie Metchnikoff creía que el ácido láctico de las bacterias en los productos eliminan a organismos nocivos en los intestinos y por lo tanto reduce la producción de toxinas que conducen a enfermedades e infecciones

(www.yakult.com). Este descubrimiento implica un paso gigante en el campo de la biotecnología, el cual debe darse a conocer a todos los niveles, desde los industriales, hasta los consumidores, pasando por los profesionales de la salud, como el Dr. Minoru Shirota, quien dirigió sus estudios en el campo de la medicina preventiva con el objetivo de ayudar a las personas a evitar enfermedades, debido a esto comenzó por el camino del estudio en microorganismos. En su investigación el Dr. Minoru Shirota, descubrió que los *Lactobacillus* son eficaces contra las bacterias dañinas en el intestino. Más tarde logró fortalecer y cultivar *Lactobacillus casei* Shirota (www.yakult.com).

Pocos estudios han sido publicados apoyando la hipótesis de que la terapia del tipo prebiótico o probiótico, pudieran ser efectiva en el tratamiento de estas condiciones: *B. longum* empleado como probiótico, ha logrado prevenir una translocación de bacterias (Ondarza Benítez, 2007).

Las bifidobacterias y otras cepas de bacterias benéficas son estimuladoras de la síntesis de IgA. Por ello, se ha relacionado el consumo de ciertos alimentos prebióticos, que contienen estas cepas de bacterias, con una estimulación de las defensas (Mateos, 2002).

#### **6.2.5.1 Terapias de Interferencia Microbiana (MIT)**

La interferencia microbiana (IM) cumple una función principal en el mantenimiento de la flora normal de la piel y las membranas mucosas al evitar la invasión por potenciales patógenos exógenos, la IM es expresada por medio de diversos mecanismos que incluyen la producción de sustancias antagonistas, cambios en el microambiente bacteriano y reducción de los nutrientes. Sus mediadores incluyen la producción de materiales complejos tales como bacteriocinas, bacteriófagos o enzimas bacteriolíticas y moléculas menos complejas como peróxido de hidrógeno, ácidos lácticos, grasos y de amonio (Madigan, 2009).

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Material

#### 7.1.1. Material Biológico

i) Protozoarios parásitos:

*Giardia lamblia* cepa IMSS:0889

*Trichomonas vaginalis* Donné 1836

ii) Probióticos:

*Lactobacillus acidophilus*

*Lactococcus lactis*

*Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus casei rhamnosus*

*Lactobacillus casei*

*Bifidobacterium longum*

iii) Suero bovino estéril

#### 7.1.2 Material Químico

Los reactivos empleados en el desarrollo de trabajo fueron grado reactivo y son provenientes de las casas comerciales específicas en la Tabla V.

**Tabla V**  
Origen de los reactivos

Casa comercial	Reactivo
Bioxón de México	Peptona de caseína Extracto de levadura D(+)Glucosa
Control Técnico y Representaciones. S.A. de C.V.	N-Lauroylsarcosine (Sodium N-dodecanoyl-N-methylglycinate) Histamina Caldo nutritive
PRAXAIR de México	Bióxido de carbono (99.9% pureza)
Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V.	Fosfato de potasio monobásico Hidróxido de sodio Ácido clorhídrico Cloruro de sodio Citrato férrico de amonio
Proveedora Química y Hospitalaria	Penicilina G-sódica (Pengesod) Sulfato de estreptomycin
Sigma Chemical Company (St. Louis Mo, USA)	Acido ascórbico L-cisteína Fosfato de potasio dibásico
DIFCO, S.A. de C.V	Medio MRS y Medio M17

## 7.2. Metodología para preparación de soluciones y medios de cultivo

La descripción detallada para la preparación de soluciones se encuentra en la Tabla VI.

**Tabla VI**  
Preparación de soluciones

SOLUCIÓN	DESCRIPCIÓN
Agua de mar	Se disolvieron 20 g de sal de mar en 500 mL con agua destilada y se ajustó a pH 7.4
Ácido clorhídrico [0.1N]	Se aforó hasta 50 mL con agua bidestilada desionizada 0.41 mL de HCl concentrado (12N).
Bilis bovina [0.3%]	Se disolvió 0.3g de bilis bovina en 10 mL de buffer PBS. Se mantuvo a -20° C, hasta su empleo.
Buffer PBS	Se disolvió 8.00g de NaCl, 0.20g de KCl, 1.44 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , en 1000 mL de agua bidestilada desionizada, se ajustó a pH 7.4 y se mantuvo en refrigeración en un frasco ámbar a 4° C, hasta su empleo
Citrato férrico de amonio [1%]	Se disolvió 0.1g de citrato férrico de amonio en (CFA) 10 mL de agua bidestilada desionizada; y se mantuvo en refrigeración en un frasco ámbar a 4°C, hasta su empleo.
Hidróxido de sodio [10N]	Se disolvió 40g de Hidróxido de sodio (NaOH) en 100 mL de agua bidestilada desionizada.
Lactosa [10%]	Se disolvió 10g de lactosa en 90 mL de agua bidestilada desionizada y se ajustó a pH 7.0. Se mantuvo en refrigeración a 4° C, hasta su empleo. Se esterilizó por medio de filtración.
Solución salina [0.85%]	Se disolvió 0.85g de Cloruro de sodio (NaCl) en 100 mL de agua bidestilada desionizada y se ajustó a pH 7.0. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15Lb de presión a 121°C. Se mantuvo en refrigeración a 4°C, hasta su empleo.
Solución de penicilina – estreptomicina	<p>a) <u>Solución concentrada de penicilina:</u> A un frasco ampula de 1,000,000 U de Penicilina G sódica cristalina, se le inyectó con aguja y jeringa estéril 5.0 mL de agua bidestilada desionizada para disolver la penicilina.</p> <p>b) <u>Solución patrón de penicilina-estreptomicina:</u> A un frasco ampula de sulfato de estreptomicina, se le añadió bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezcló</p> <p>c) <u>Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (100X):</u> Se transfirió asépticamente toda la solución patrón de penicilina- estreptomicina del frasco ampula a una probeta estéril de 25 mL y se aforó a 20 mL con agua bidestilada desionizada estéril. Se almacenó a 4° C en alícuotas de 5mL en tubos cónicos de 50 mL que se cubrieron con papel aluminio.</p>

### 7.3 Protozoarios

**7.3.1. Preparación de medio de cultivo.** Para el mantenimiento y cultivo de los protozoarios *Giardia lamblia* IMSS 0889 y *Trichomonas vaginalis* se empleó el medio descrito por Barrón *et al.*, 2008.

**7.3.2. Mantenimiento de cepas:**

**a) *G. lamblia* IMSS 0889:** Se mantuvo mediante resiembras sucesivas, inoculando  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL en un tubo de borosilicato para cultivo de 13x100 mm con tapón de rosca, que contenía 5 mL de medio con 0.05mL de solución penicilina–estreptomicina, 0.5 mL de suero bovino y 0.005mL de bilis bovina. La cepa se incubó a 37° C por 72 horas. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de los protozoarios parásitos. El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto, se colocó en agua-hielo por 20 minutos, posteriormente se agitó diez veces por inversión suave y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo empleando una pipeta Pasteur, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL, a cada tubo se le realizaron lecturas por triplicado. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en buen estado y en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento (Fig.7).

**b) *T. vaginalis*:** Se mantuvo mediante resiembras sucesivas, inoculando 2500 trofozoítos/mL en un tubo de borosilicato para cultivo de 13x100 mm con tapón de rosca, que contenía 5mL de medio con 0.05mL de solución penicilina–estreptomicina y 0.5mL de suero bovino. La cepa se incubó a 37° C por 72 horas. Antes de cada resiembra los cultivos se observaban en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de los protozoarios parásitos. El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto, se colocó en agua-hielo por 20 minutos, posteriormente cada tubo se agitó diez veces por inversión suave y el número de trofozoítos se determinó tomando

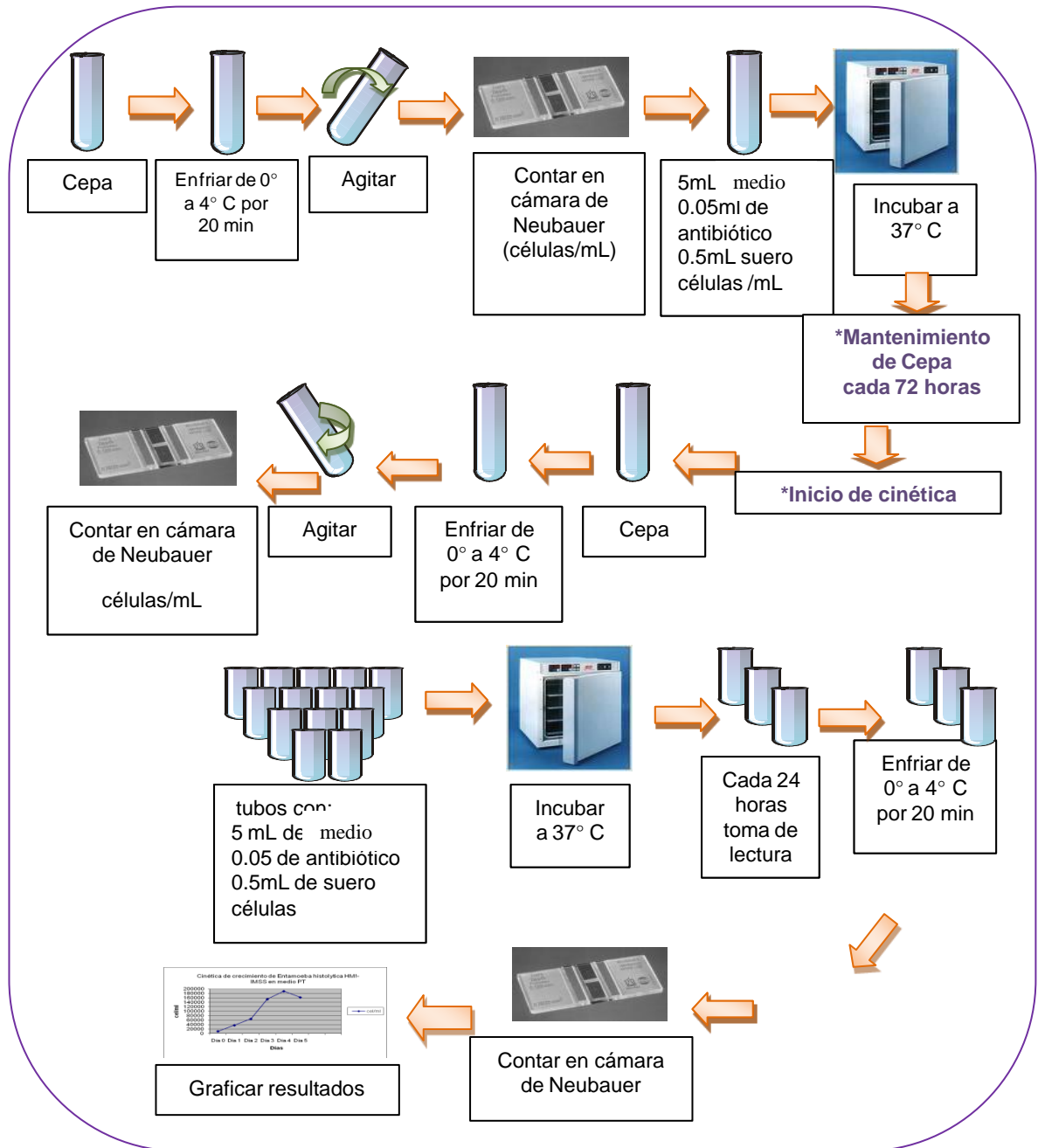
una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL por triplicado. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento (Fig. 7).

### 7.3.3. Cinéticas de crecimiento

a) ***G. lamblia* IMSS 0889:** Se inocularon 30 tubos de borosilicato de 13 x 100 con tapón de rosca, cada tubo contenía 5 mL de medio a los cuales se les añadió 0.5 mL de suero bovino y 0.05mL de solución de Penicilina-estreptomicina, y 0.005mL de bilis bovina, cada tubo se inoculó con  $1 \times 10^4$  células/mL. Se incubaron a 37°C y a partir del día 1 cada 24 horas se determinó el número de células/mL a 3 tubos de cultivo hasta el décimo día de incubación (Fig. 7).

b) ***T. vaginalis:*** Se inocularon 30 tubos de borosilicato de 13 x 100 con tapón de rosca para cada uno de las cepas, cada tubo contenía 5 mL de medio TYI-S-33 a los cuales se les añadió 0.5 mL de suero bovino y 0.05mL de solución de Penicilina-estreptomicina, cada tubo se inoculó con  $0.25 \times 10^4$  células/mL. Se incubaron a 37°C y a partir del día 1 cada 24 horas se determinó el número de células/mL a 3 tubos de cultivo hasta el décimo día de incubación (Fig. 7).





**Fig. 7.-** Estrategia experimental para el mantenimiento y cinética de crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis*

## 7.4 Probióticos

**7.4.1. Preparación de medio de cultivo.** Para el mantenimiento y cultivo de los protozoarios *G. lamblia* y *T. vaginalis* se empleó el medio descrito por Barrón *et al.*, 2008.

### 7.4.2. Preparación de medios para el cultivo de probióticos

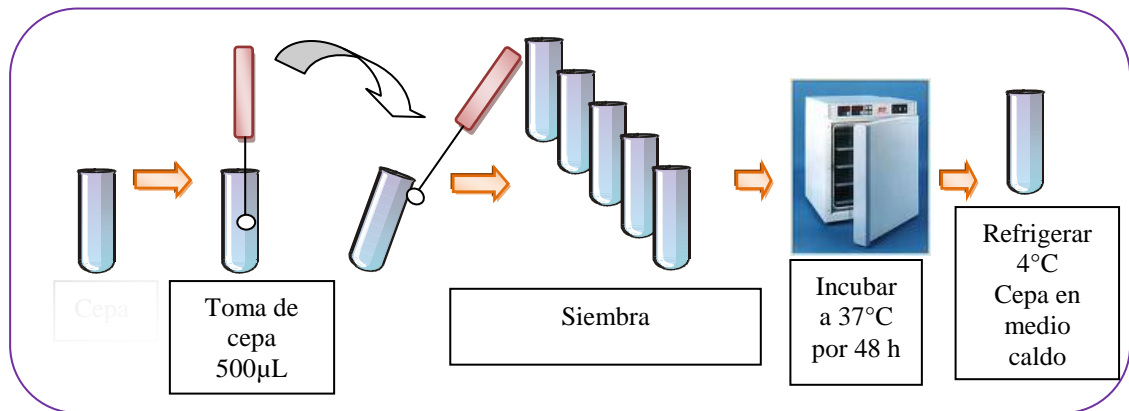
Los siguientes medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial, los cuales se describen a continuación:

- a) **Medio MRS-caldo:** Se preparó este medio de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial, suspendiendo 64 g del medio en un litro de agua destilada, dejándolo reposar por 5 minutos, se ajustó a pH 7.0 con NaOH [10N], se procedió a su distribución en alícuotas de 5mL en tubos de borosilicato de 13 x 100 mm. Posteriormente se esterilizaron las alícuotas en autoclave por 15 minutos a 15Lb de presión a 121°C, dejándolas enfriar a temperatura ambiente, para pasar a congelar a temperatura de -20 °C y almacenándolas hasta su uso.
- b) **Medio MRS-agar:** Se preparó este medio de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial, suspendiendo 64g del medio y añadiéndole 11.5g de agar nutritivo en un litro de agua destilada, dejándolo reposar por 5 minutos, se ajustó a pH 7.0 con NaOH [10N], se procedió a su distribución en alícuotas de 5mL en tubos de borosilicato de 13 x 100 mm. Posteriormente se esterilizaron las alícuotas en autoclave por 15 minutos a 15Lb de presión a 121° C, dejándolas enfriar a temperatura ambiente, para pasar a congelar a temperatura de -20°C y almacenándolas hasta su uso.
- c) **Medio M17-caldo:** Se preparó este medio de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial, suspendiendo 64g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos, se ajustó el pH 7.0 con NaOH [10N], se procedió a su distribución en alícuotas de 5 mL en tubos de

borosilicato de 13x100 mm. Posteriormente se esterilizaron las alícuotas dejándolas enfriar a temperatura ambiente, por último se le agregó lactosa al 10% en cada tubo, se pasó a congelar a temperatura de -20 °C y se almacenaron hasta su uso.

- d) Medio M17-agar:** Se preparó este medio de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial, suspendiendo 64g del medio y añadiendo 11.5g de agar nutritivo en un litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos, se ajustó el pH 7.0 con NaOH [10N], se procedió a su distribución en alícuotas de 5 mL en tubos de borosilicato de 13x100 mm. Posteriormente las alícuotas se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 15Lb de presión a 121° C después se dejaron enfriar a temperatura ambiente, por último se le agregó lactosa al 10% en cada tubo, se pasó a congelar a temperatura de -20 °C y se almacenaron hasta su uso.
- e) Medio MPT-caldo y MPT-agar:** Se preparó de acuerdo a las indicaciones mencionadas por Barrón *et al.*, 2008.

**7.4.3 Mantenimiento:** La cepas de probióticos se mantuvieron en refrigeración a 4°C en caldo, cada cepa se activó tomando 500µL y se suspendió en 5mL de caldo para probióticos, se incubaron por 24 - 48 h a 37°C. Para la activación de cada cepa de bacterias y mantenimiento de las mismas, se tomó bajo condiciones de esterilidad 0.5 mL del cultivo de la cepa de las bacterias ácido lácticas en tubos borosilicato de 13x100 mm conteniendo 5 mL de caldo y otros tubos con caldo, se incubaron a 37°C/18 horas, posteriormente bajo condiciones de esterilidad se tomó una asada de cada cultivo y se sembró por estría en tres tubos de borosilicato de 13 x 100 mm conteniendo 5 mL de medio-agar inclinado y otros tubos conteniendo medio-agar inclinado, se incubó a 37°C/24 horas, enseguida se guardaron a 4°C por no más de tres meses (Fig. 8).

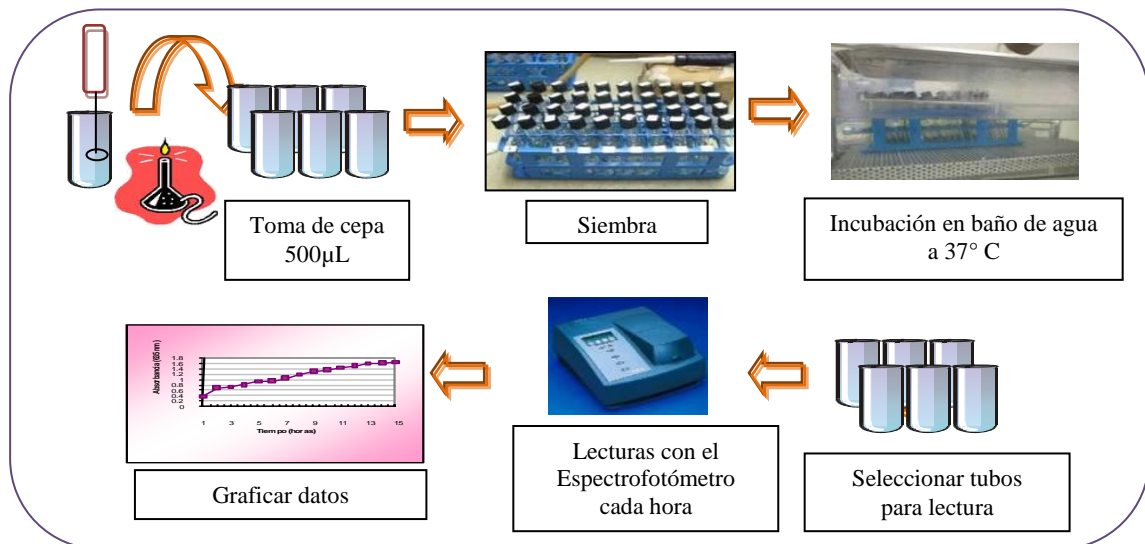


**Fig. 8.-** Estrategia experimental para el mantenimiento de probióticos

#### 7.4.4. Cinética de crecimiento

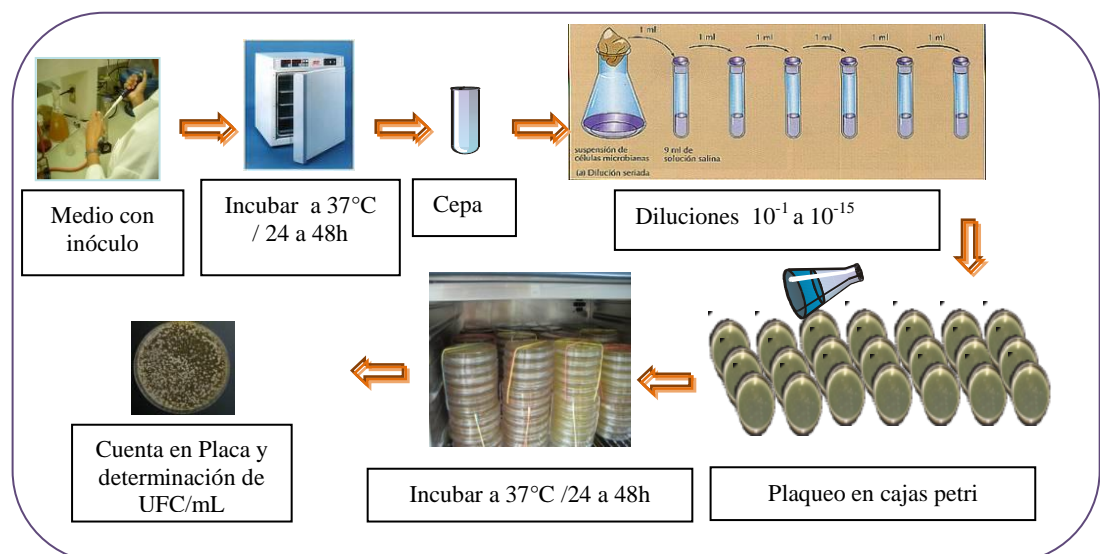
##### a) Método turbidimétrico

Se dispuso para cada una de las cepas de probióticos, nueve tubos con tapón de rosca conteniendo 5mL de caldo, y frente al mechero, se inocularon con 500µL de cultivo de cada uno de los probióticos, e inmediatamente se tomó la primera lectura. Posteriormente se incubaron en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis®) a una longitud de onda de 635nm durante un lapso de 24 h, se registró y se graficaron los valores obtenidos ( Fig. 9).



**Fig. 9. -** Estrategia experimental para realizar la cinética de crecimiento de probióticos por el Método turbidimétrico

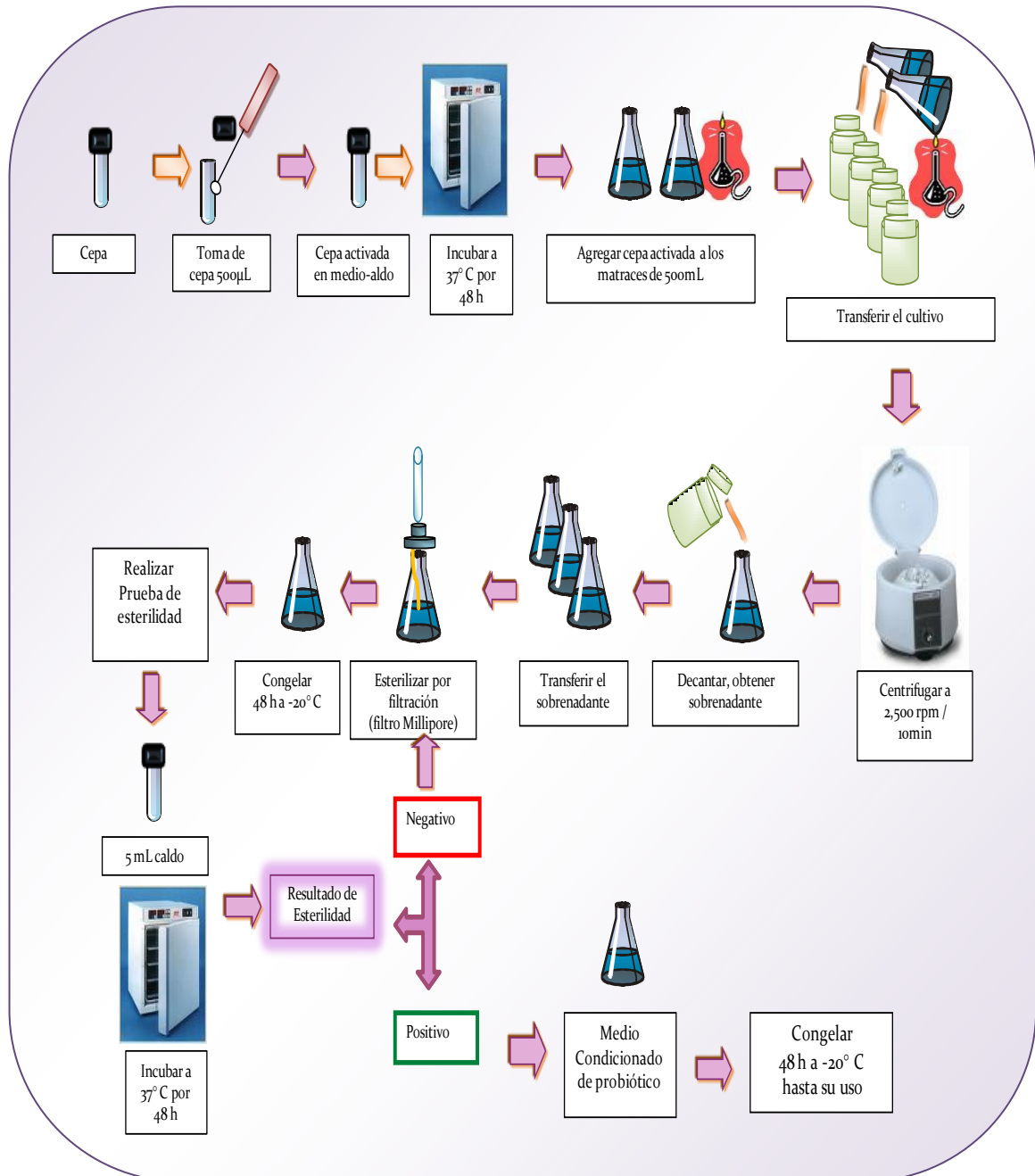
**b) Método de Recuento Bacteriano en Placa:** Se reactivaron las bacterias probióticos, tomando una asada de una colonia del cultivo en medio-agar y se depositaron en tres tubos de 13x100 mm conteniendo 5 mL de medio, se procedió a incubar a 37° C durante 24 horas, transcurrido este tiempo se inoculó tres tubos de 13x100 mm con 5 mL de medio-caldo con un inóculo al 1% y se incubó a 37°C/24 horas, después se inoculó 1% de cultivo en otros tres tubos de 13x100 mm con 5 mL de medio-caldo con un inóculo de 1% y se incubó a 37°C/14 horas, transcurrido este tiempo se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL empleando la método de dilución en placa; para realizar esta determinación se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-15}$ . A partir de las últimas diez diluciones se transfirió 1 mL a una caja petri enseguida se agregaron 15 mL de medio-agar, inmediatamente se giró la placa suavemente haciendo figuras de ochos invisibles en la mesa, esto para distribuir homogéneamente el inóculo a través del medio-agar, se dejó solidificar, posteriormente se incubó a 37°C/24 horas, después de este tiempo se contó las colonias para determinar la cuenta de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) Fig 10.



**Fig.10.-** Determinación de las UFC/mL de los probióticos mediante el método de Recuento bacteriano en placa (RBP)

#### **7.4.5. Obtención de medio condicionado de probióticos**

Los probióticos se reactivaron antes de iniciar cada bioensayo. A un litro de medio-caldo se le inoculó 1% del cultivo de cada uno de los probióticos (incubado por 24 h a 37°C dependiendo de cada cepa) se incubó a 37°C por 48 horas. El cultivo se colocó en frascos especiales y se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente; este paso se repitió hasta que se observó la ausencia del precipitado; el sobrenadante fue esterilizado con filtración cuatro veces con filtros Millipore de 0.22µm. Se le realizó la prueba de esterilidad, tomando una alícuota y colocándolo en medio-caldo para probióticos, se incubó a 37°C por 48 horas y una vez aprobada dicha prueba de esterilidad, el sobrenadante estéril fue el medio con los factores difusibles de los probióticos o FDP (Fig.11).



**Fig.11.** Estrategia experimental para la obtención de factores difusibles de probióticos

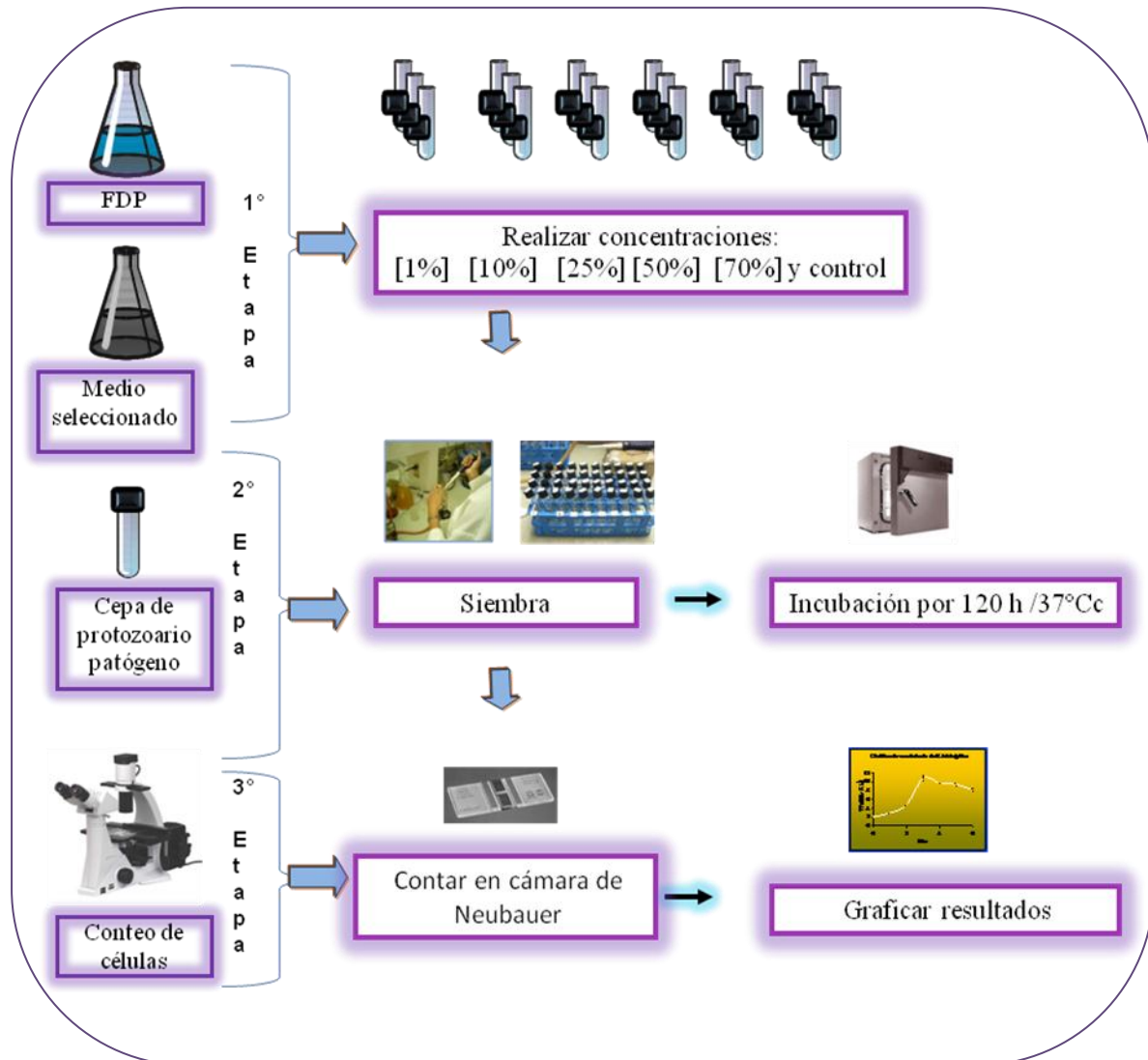
## 7.5. Bioensayos

### 7.5.1. Evaluación de la actividad biológica de factores difusibles de probióticos (FDP) sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *G. lamblia* IMSS 0889 y *T. vaginalis*

Los bioensayos para evaluar la actividad de los factores difusibles de probióticos (FDP) sobre el crecimiento de *G. lamblia* IMSS 0889 y *T. vaginalis* se llevó a cabo en tres etapas (Fig. 12 y Tabla VII).

- A) Primera etapa: Se dispuso de 54 tubos por bioensayo, en total fueron 648 tubos de borosilicato para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca, cada tubo contenía 5 mL de medio, a cada tubo se añadió 0.05mL de solución penicilina-estreptomicina, 0.5 mL de suero bovino y dosis de 1, 10, 25, 50 y 70% de cada FD de los probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, y *Bifidobacterium longum*.
- B) Segunda etapa: Se inoculó  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL de trofozoítos de *G. lamblia* y en el caso de de *T. vaginalis* fueron  $0.25 \times 10^4$ . La cepa se incubó a 37° C por 120 horas. Se observó cada tubo en un microscopio invertido.
- C) Tercera etapa: Al quinto día, los tubos se colocaron en agua-hielo por 20 minutos, éste paso con la finalidad de poder despegar las células adheridas al tubo, éste se agitó 10 veces por inversión suave, y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL. Se graficaron los datos. Los bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en buen estado y en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento (Fig.12).





**Fig.12-** Estrategia experimental del bioensayo para evaluar la actividad biológica de FDP sobre el crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis*

## 7.6. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los factores difusibles de probióticos sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *G. lamblia* y *T. vaginalis*, se realizaron experimentos independientes por triplicado. Se promediaron los rendimientos máximos que se obtuvieron durante los diferentes experimentos y se compararon contra el cultivo control mediante el análisis de varianza con una  $P < 0.05$  empleando la prueba de Dunnet-t (2-way) con el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000 (Tabla VII).

**Tabla VII**

Consideraciones por bioensayos para la evaluación de la actividad de los FDP\* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*

Consideraciones por bioensayo	Tratamientos					
	FDP[%]					Control
	1	10	25	50	70	
Volumen transferido de la solución FDP (mL)	0.05	0.5	1.5	2.5	3.5	-
Volumen de medio (mL)	4.95	4.5	3.5	2.5	1.5	5
Suero bovino (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antibiótico (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Bilis bovina(mL) **	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Volumen final (mL)	5	5	5	5	5	5
Total de tubos	9	9	9	9	9	9
*Para la evaluación de la actividad biológica de FD de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , y <i>Bifidobacterium longum</i> .						
** Solo en cultivos de <i>G. lamblia</i>						

### 7.7. Determinación de la $CI_{50}$ de los FDP sobre *G. lamblia* y *T.vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro*

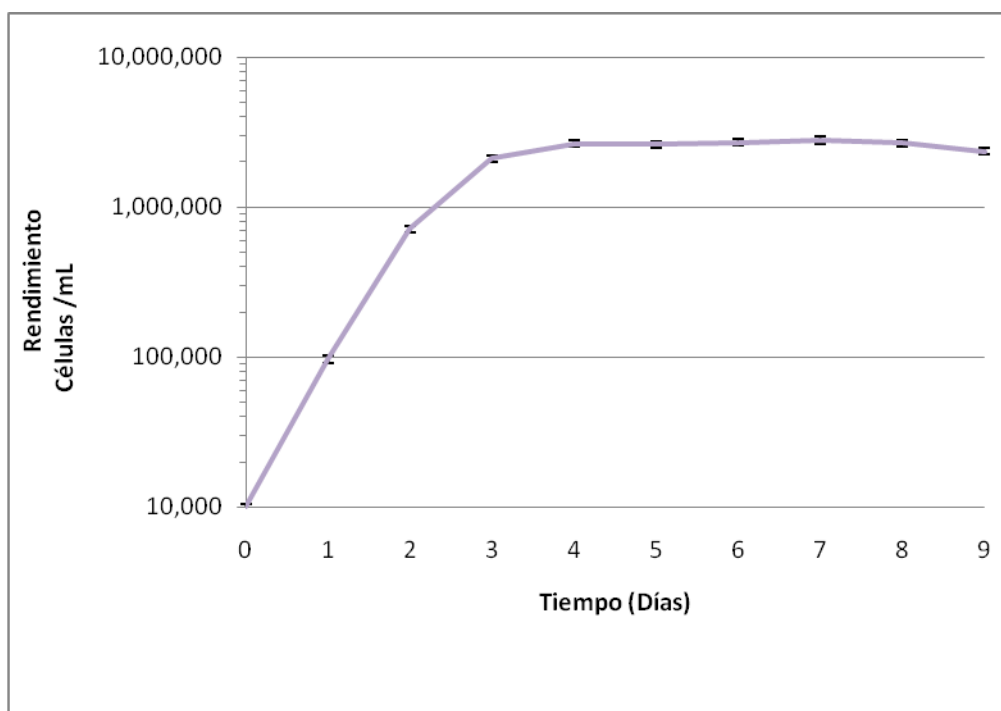
Se realizaron experimentos independientes por triplicado y se promediaron los rendimientos máximos que se obtuvieron durante los diferentes experimentos y se compararon contra el cultivo control, empleando la prueba de PROBIT con el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Protozoarios

#### 8.1.1. Cinética de crecimiento de *Giardia lamblia* IMSS 0889

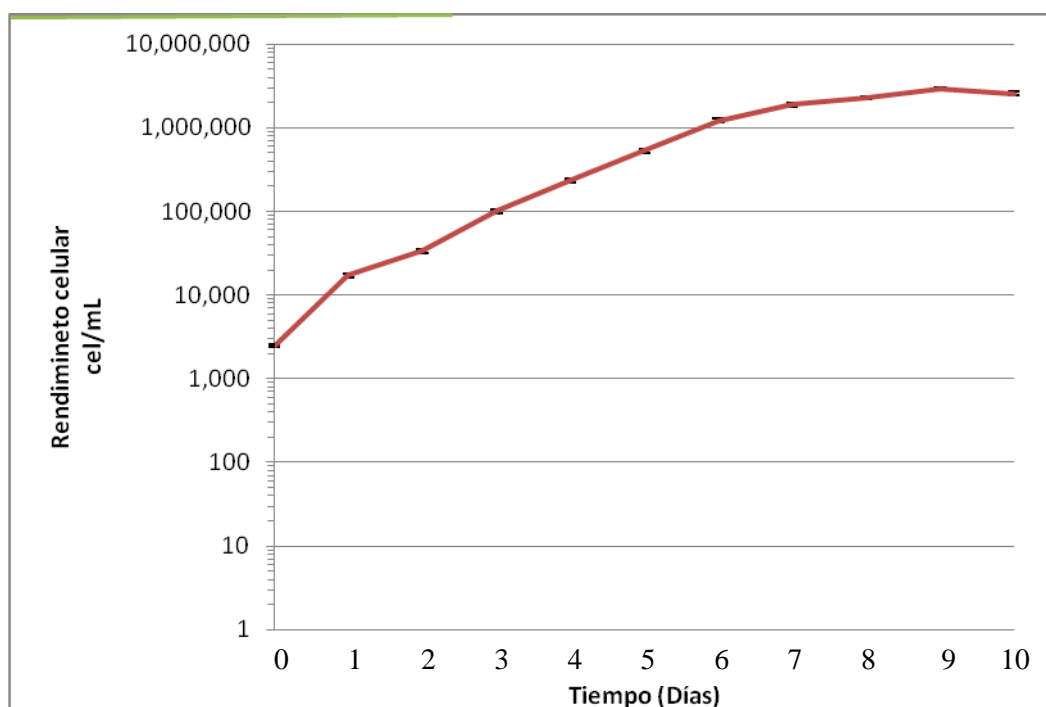
En la cinética de crecimiento de *G. lamblia* en el medio de cultivo MPT, no se observa fase de adaptación, lo cual es indicio del buen estado fisiológico del cultivo celular, se observa una fase de crecimiento logarítmico desde su inicio hasta el día tres, alcanzando un rendimiento máximo de 3; 087,500 cél/mL al cuarto día. Posteriormente se observa un moderado descenso en el rendimiento celular, el cual se prosiguió por nueve días, ésta cinética es el resultado de tres eventos independientes por triplicado (Fig. 13).



**Fig. 13.-Cinética de crecimiento de *G. lamblia*.** Cinética realizada empleando el medio MPT, los resultados obtenidos son el resultado de tres eventos independientes por triplicado, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).

### 8.1.2. Cinética de crecimiento de *T. vaginalis*

La cinética de crecimiento de *T. vaginalis* en medio de cultivo MPT, no se observa fase de adaptación, lo cual indica el buen estado fisiológico de las células, se observa una fase de crecimiento logarítmico desde su inicio, alcanzando un rendimiento máximo de 2;915,000 cel/mL al día nueve. Posteriormente se observa un moderado descenso en el rendimiento en el número de células hasta el día diez. Ésta cinética es el resultado de tres eventos independientes por triplicado (Fig. 14).

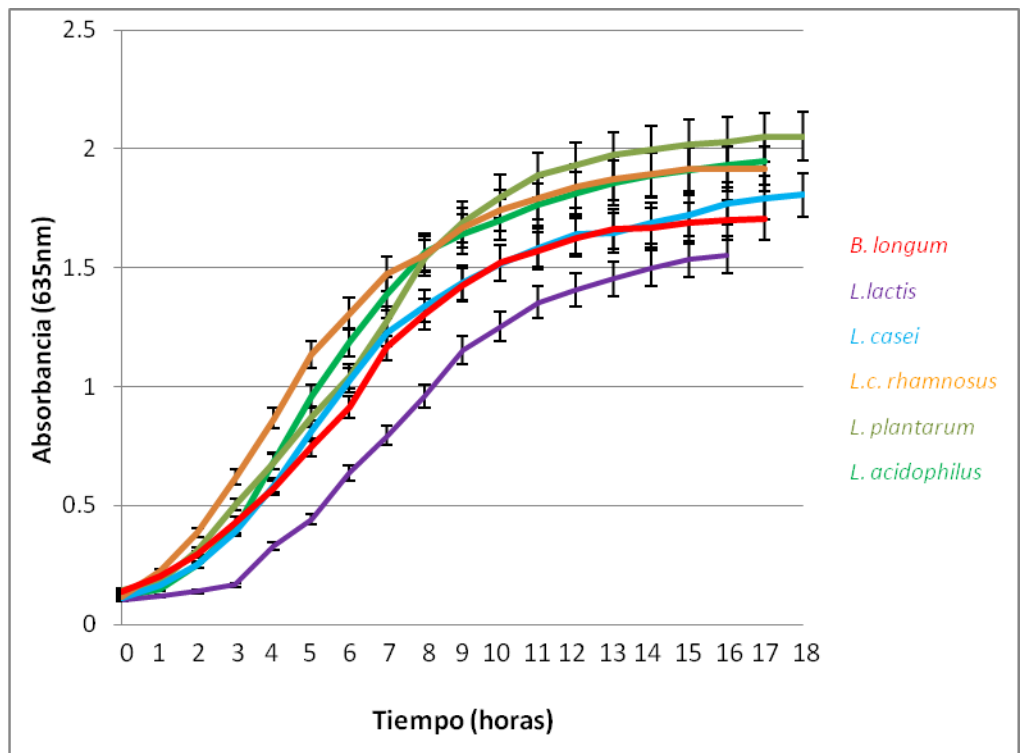


**Fig. 14.-Cinética de crecimiento de *T. vaginalis*.** Cinética realizada empleando el medio MPT, los resultados obtenidos son el resultado de tres eventos independientes por triplicado, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).

## 8.2. Probióticos

### 8.2.1. Cinéticas de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría empleando el medio MRS-caldo

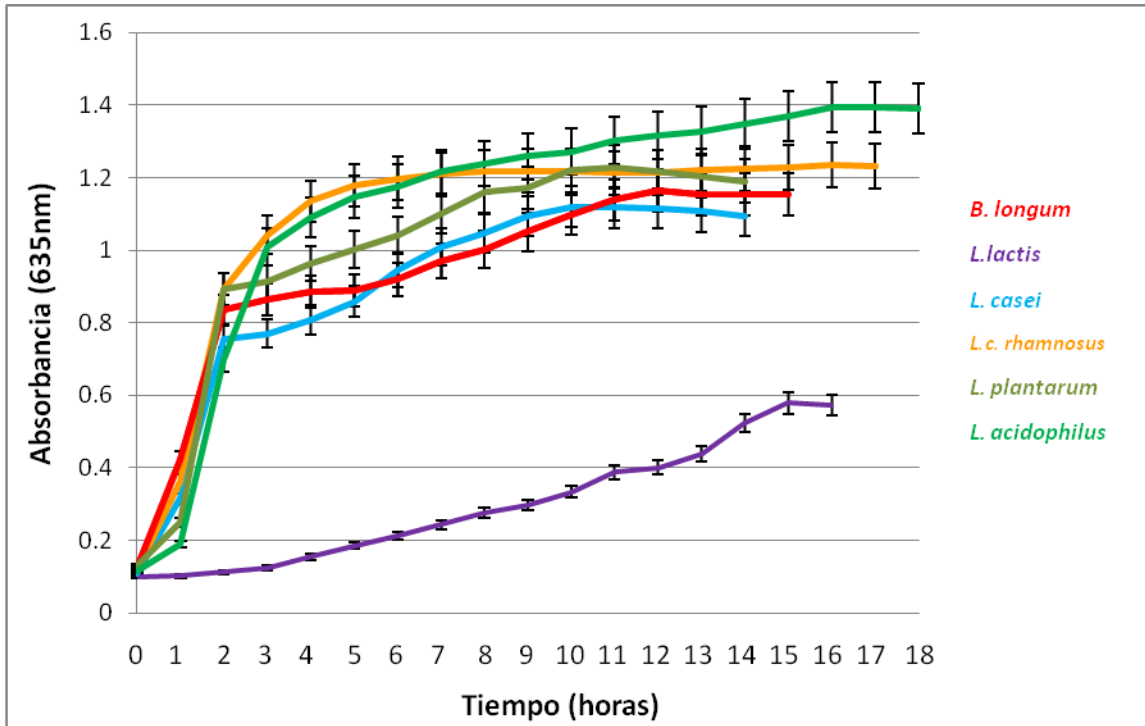
En la figura 15 se observa la cinética de crecimiento de *B. longum*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. acidophilus*, en el medio MRS-caldo, presentando el mayor rendimiento celular el cultivo de *L. plantarum*. No se observa diferencia significativa entre el rendimiento celular de *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. casei rhamnosus*; el rendimiento celular fue seguido de *L. casei* y *B. longum* entre estos cultivos no se aprecia diferencia significativa, pero sí con respecto a las tres cepas antes mencionadas y también con respecto a *L. lactis*. En las cinéticas antes mencionadas no se aprecia fase estacionaria, se aprecia fase exponencial desde la hora cero hasta aproximadamente las diez horas de incubación; sin embargo *L. lactis* presentó el menor rendimiento celular, y presentó fase de adaptación durante las tres primeras horas de incubación, el rendimiento celular sí presentó diferencia significativa con respecto a las otras cinco cinéticas antes descritas. Cada punto graficado en las cinéticas representa el promedio de nueve lecturas realizadas en tres eventos independientes por triplicado.



**Fig. 15.-** Cinética de crecimiento de probióticos en el medio MRS-caldo. Se aprecian las cinéticas de *B. longum*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* en el medio MRS-caldo, mediante el método indirecto de turbidez, cada punto representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).

### 8.2.2. Cinéticas de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría y empleando el medio M17-caldo

Los resultados que se muestran en la figura 16 corresponden a la cinética de crecimiento de *B. longum*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. acidophilus*, en el medio M17-caldo, presentando el mayor rendimiento celular el cultivo de *L. acidophilus*, mostrando diferencia significativa con respecto a las cinéticas de *L. plantarum* y *L. casei rhamnosus*, seguido de las cinéticas de *B. longum* y *L. casei*, estas cuatro cepas no mostraron diferencia significativa entre sí a las 14 horas de incubación, pero sí con respecto a *L. acidophilus*; las cinéticas de crecimiento de las cinco cepas aquí descritas no mostraron fase de adaptación, entrando inmediatamente en marcada fase logarítmica durante las dos primeras horas de incubación, y posteriormente se aprecian diferentes patrones de crecimiento. Por otra parte en la cinética de *L. lactis* sí se aprecia ligera fase de adaptación, esta fue la cepa que presentó menor rendimiento celular, este rendimiento celular presentó marcada diferencia significativa con respecto a las cinéticas de las cinco cepas antes descritas. Cada punto graficada en las cinéticas representa el promedio de nueve lecturas realizadas en tres eventos independientes por triplicado.

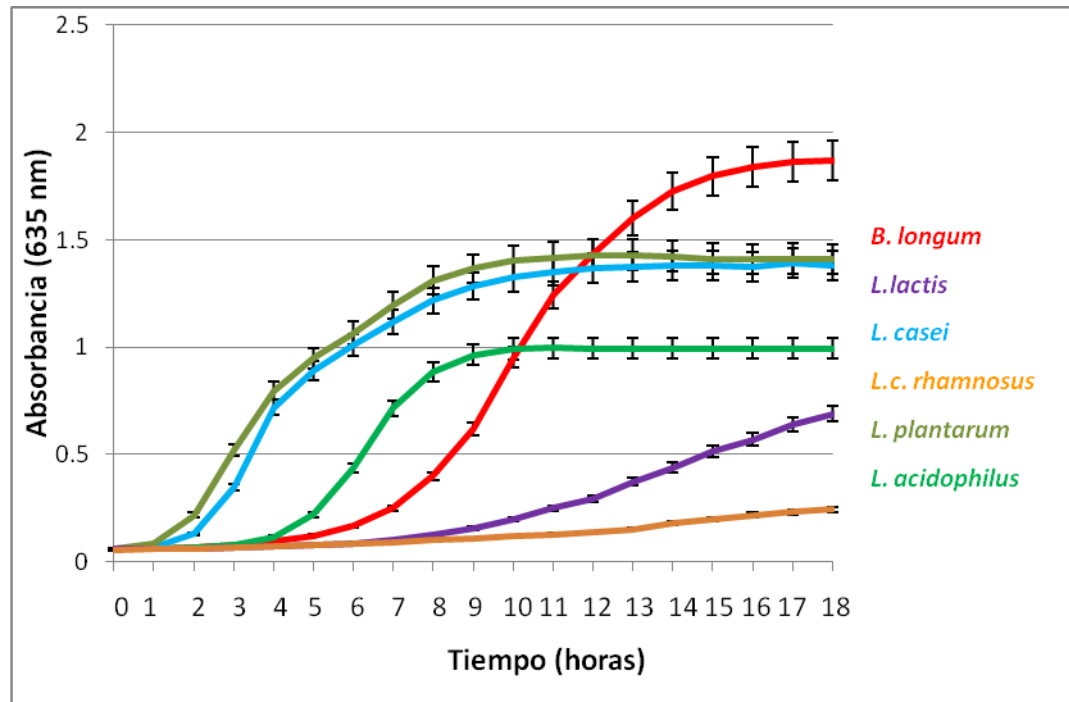


**Fig. 16.- Cinética de crecimiento de probióticos en el medio M17-caldo.** Se aprecian la cinéticas de crecimiento de *B. longum*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. acidophilus*, mediante el método indirecto de turbidez. Ésta cinética fue realizada empleando el medio M17-caldo, cada punto representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



### 8.2.3. Cinéticas de crecimiento de probióticos por el método de turbidimetría y empleando el medio MPT-caldo

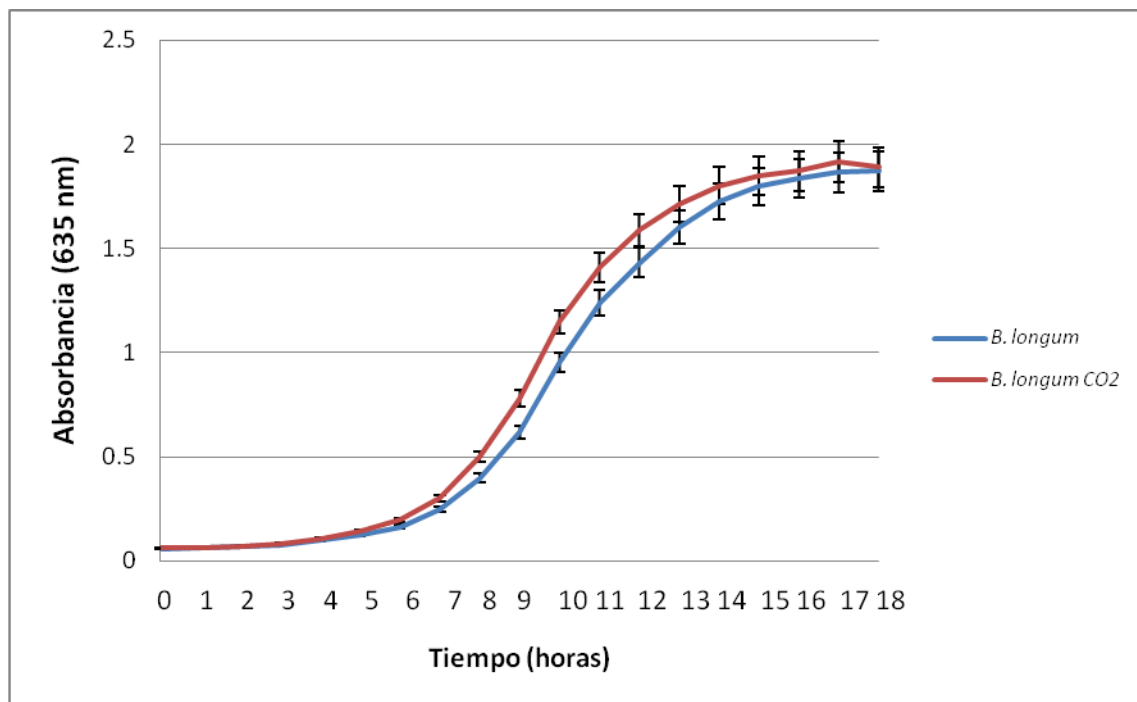
Los resultados que se muestran en la figura 17 corresponden a las cinéticas de crecimiento de *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei rhamnosus*, empleando el medio MPT-caldo. Se observa que *B. longum* presentó mayor rendimiento celular, seguido de *L. casei* y *L. plantarum* cuyos rendimientos no presentan diferencia significativa entre sí, pero sí con respecto al rendimiento de *B. longum*, y con respecto al rendimiento inferior de *L. acidophilus*; *L.lactis* y *L.c.rhamnosus* no presentaron buen rendimiento celular. Estos resultados indican que el medio MPT-caldo sustenta eficientemente el cultivo de *B. longum*, *L. casei* y *L. plantarum*. . Cada punto graficado en las cinéticas representa el promedio de nueve lecturas realizadas en tres eventos independientes por triplicado.



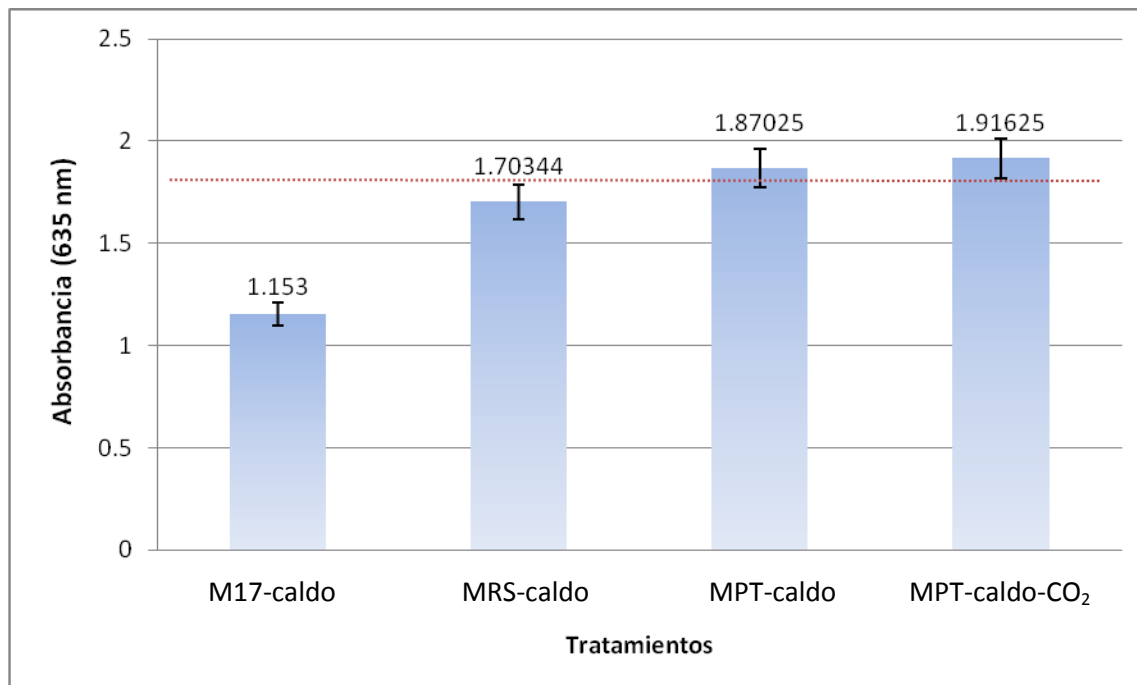
**Fig. 17.- Cinética de crecimiento de probióticos en el medio MPT-caldo.** Se realizaron las cinéticas de *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. lactis* y *L. casei rhamnosus* mediante el método indirecto de turbidez, cada punto representa el promedio de nueve repeticiones independientes por triplicado, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).

#### 8.2.4. Cinética de crecimiento de *B. longum* en presencia de CO<sub>2</sub> empleando el medio MPT-caldo

En la figura 18 se muestra la cinética de crecimiento de *B. longum* en el medio MPT-caldo en presencia de CO<sub>2</sub> y ausencia de éste, en la cinética se observa ligera fase de adaptación durante las primeras 4 horas de incubación, posteriormente se observa la fase logarítmica hasta las 14 horas de incubación, posteriormente se aprecia la fase estacionaria, siendo ligeramente mayor el rendimiento celular del cultivo de *B. longum* en presencia de CO<sub>2</sub>; sin embargo al final de la fase logarítmica el rendimiento celular obtenido en presencia o ausencia de CO<sub>2</sub> no presentan diferencia significativa (Fig. 19). Cada punto graficada en las cinéticas representa el promedio de nueve lecturas realizadas en tres eventos independientes por triplicado.



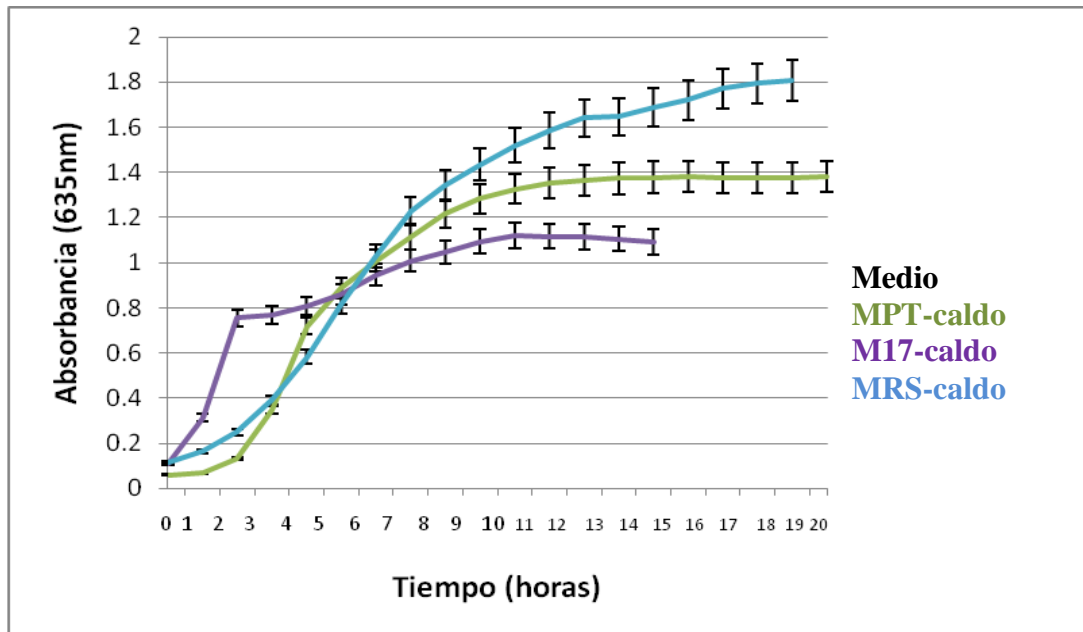
**Fig. 18.- Comparación del rendimiento celular de *B. longum* en presencia/ausencia de CO<sub>2</sub> empleando el medio MPT-caldo.** El rendimiento celular de *B. longum* no presenta diferencia significativa al ser cultivado en presencia o ausencia de CO<sub>2</sub>, cada punto representa el promedio de nueve repeticiones independientes por triplicado, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



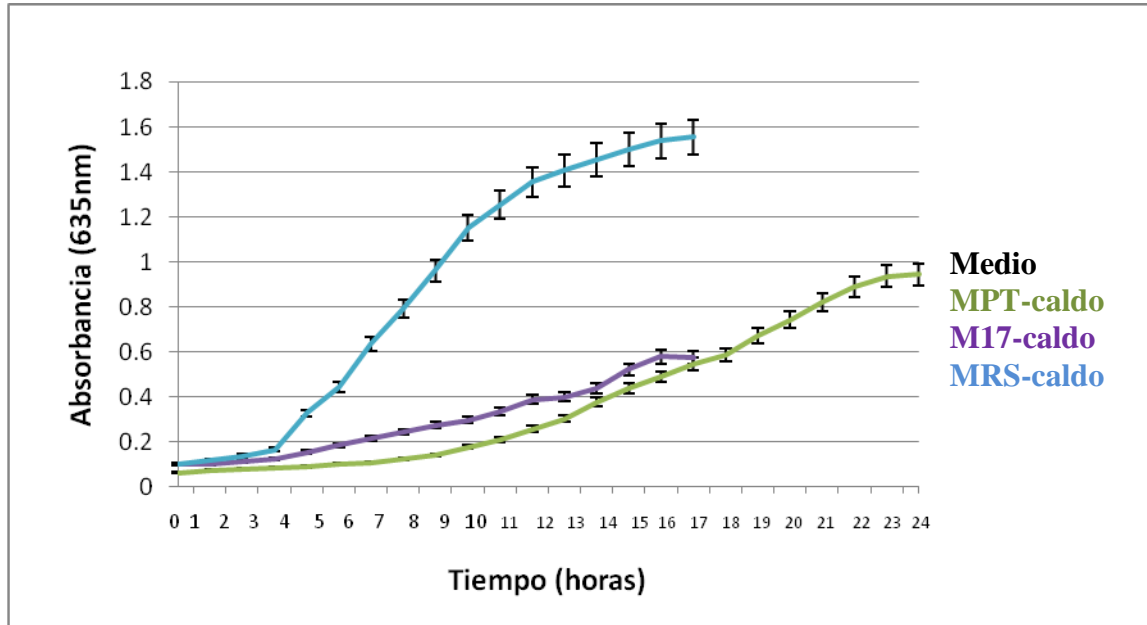
**Fig. 19.-Comparación del rendimiento celular de *B. longum*.** En la presente gráfica se muestra el comparativo del rendimiento celular de *B. longum* cultivado en el medio M17, MRS y MPT y MPT-CO<sub>2</sub>, el mayor el rendimiento celular de *B. longum* se observó en el medio MPT- CO<sub>2</sub>, sin embargo este rendimiento no presenta diferencia significativa con respecto al medio MPT sin CO<sub>2</sub>.

### 8.2.5. Cinéticas comparativas de crecimiento de los probióticos en los medios MRS-caldo, M17-caldo y MPT-caldo

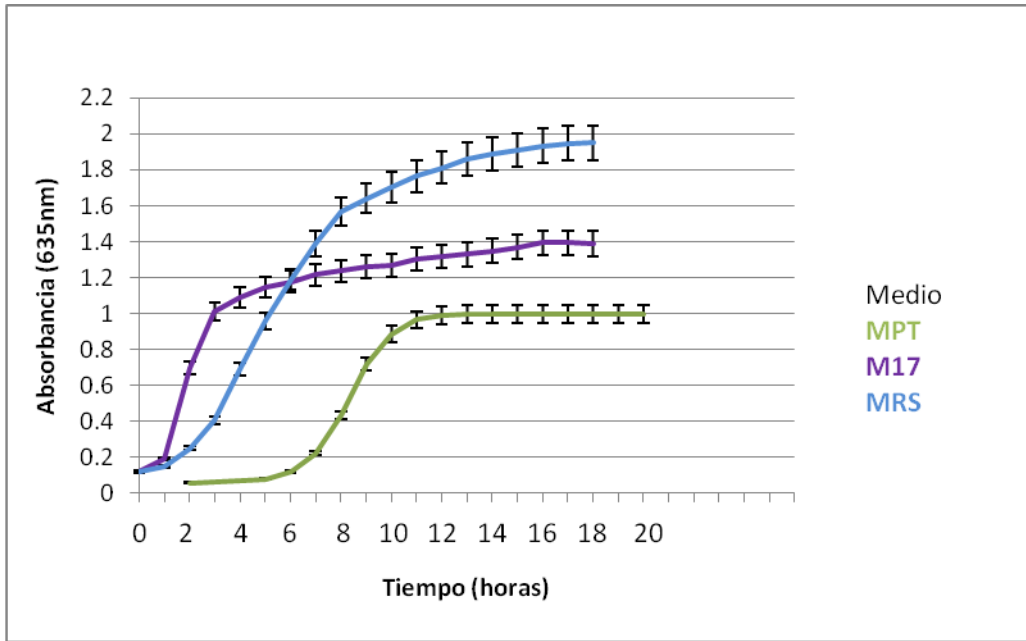
En las figuras 20 a la 25 se muestran las cinéticas comparativas de cada uno de los probióticos y el comportamiento que mostraron en los medios de cultivo empleados: MPT-caldo, MRS-caldo y M17-caldo, así como MPT-caldo-CO<sub>2</sub> para realizar el cultivo de *B. longum*. En estos resultados se aprecia que los diversos lactobacillus evaluados presentan mayor rendimiento celular en el medio MRS-caldo (figuras 20, 22, 23 y 24) y *B. longum* presentó mejor rendimiento celular en el medio MPT-caldo y MPT-caldo-CO<sub>2</sub>, (Fig. 25), estos resultados se obtuvieron empleando la método espectrofotométrica.



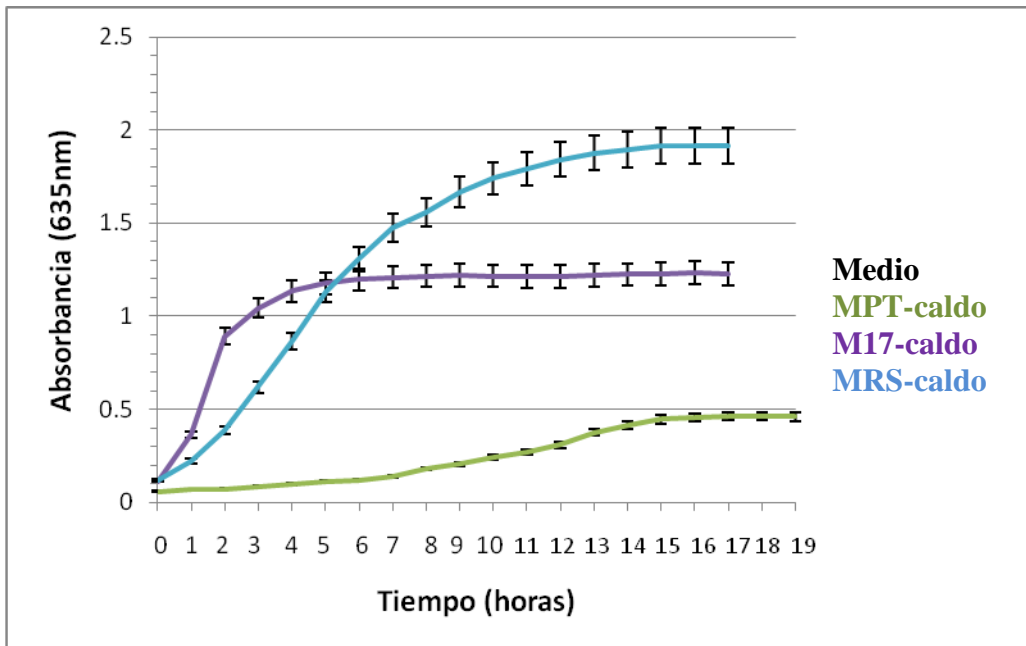
**Fig. 20.-** Cinética comparativa del crecimiento de *L. casei* en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo.



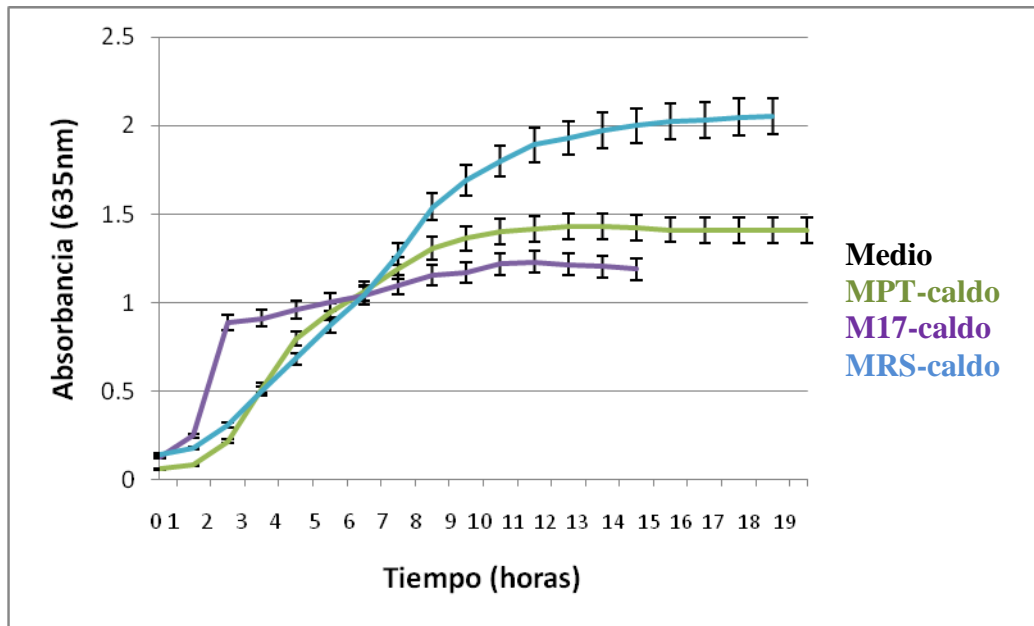
**Fig. 21.-** Cinética comparativa del crecimiento de *L. lactis* en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo



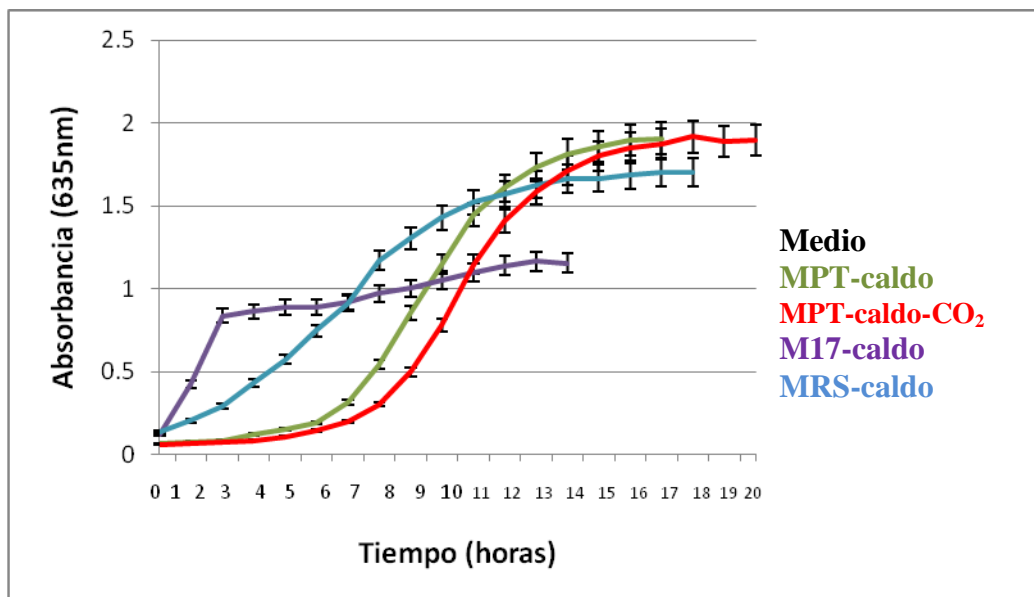
**Fig. 22.-** Cinética comparativa del crecimiento de *L. acidophilus* en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo.



**Fig. 23.-** Cinética comparativa del crecimiento de *L. casei rhamnosus* en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo.



**Fig. 24.-** Cinética comparativa del crecimiento de *L. plantarum* en el medio MPT-caldo, M17-caldo y MRS-caldo.



**Fig. 25.-** Cinética comparativa del crecimiento de *B. longum* en el medio MPT-caldo, MPT-caldo-CO<sub>2</sub>, M17-caldo y MRS-caldo

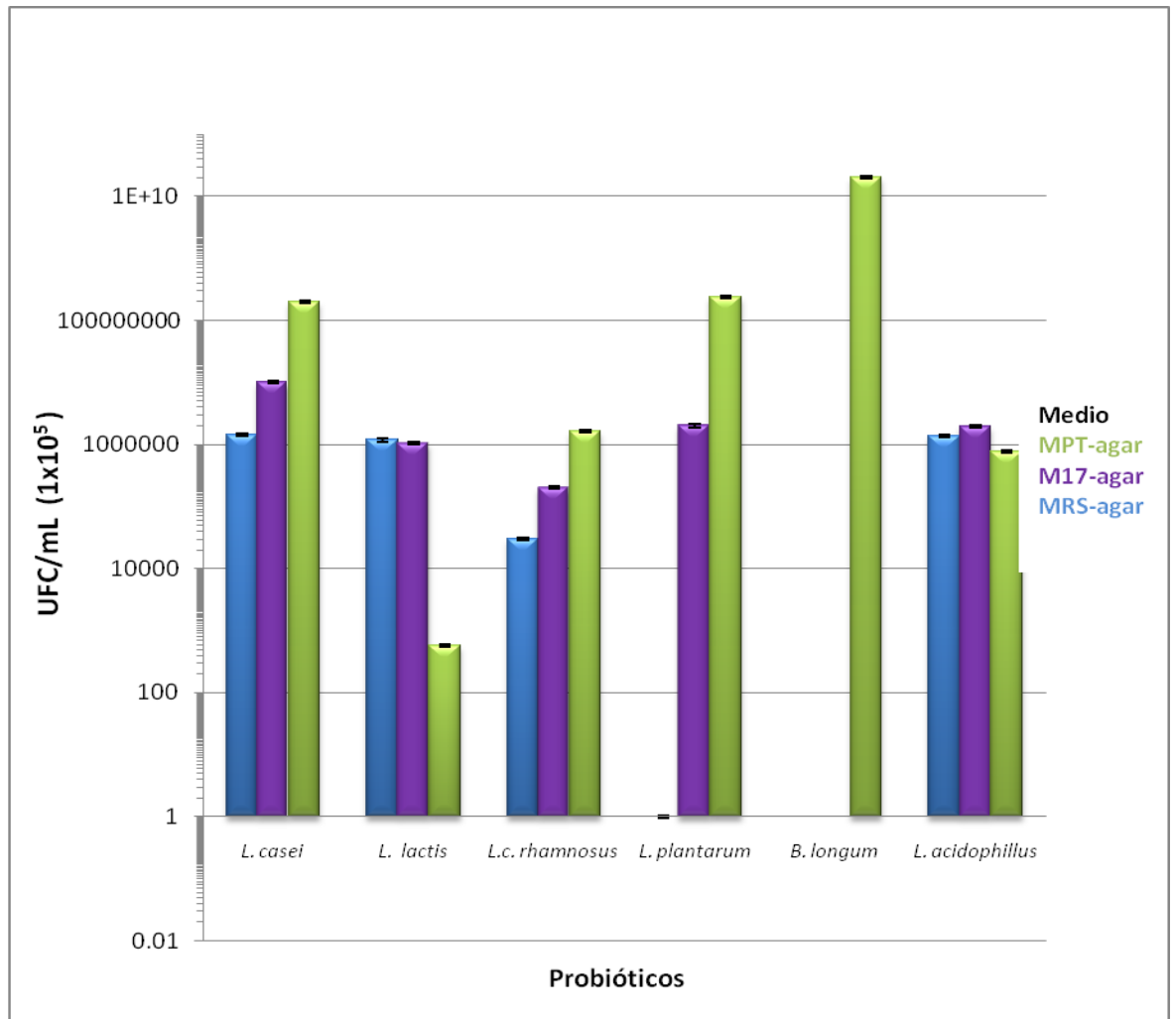
### 8.3 Determinación del rendimiento celular mediante el método de Recuento Bacteriano en Placa (RBP)

En la Tabla VIII y figura 26 se muestran los resultados del rendimiento celular mediante el método de RBP, en la cual se evaluó el rendimiento de los probióticos en tres medios de cultivo, el mayor rendimiento celular (RBP) se obtuvo en el medio MPT-agar para *Bifidobacterium longum* ( $200 \times 10^{13}$ ), seguido de *Lactobacillus plantarum* ( $2.4 \times 10^{13}$ ), *Lactobacillus casei* ( $2 \times 10^{13}$ ), *L. casei rhamnosus* ( $0.0165 \times 10^{13}$ ), estos resultados presentan marcada diferencia significativa con los rendimientos obtenidos en los medios MRS-agar y M17-agar. En el medio M17-agar *Lactobacillus acidophilus* ( $0.0195 \times 10^{13}$ ) presentó mejor rendimiento exhibiendo diferencia significativa con respecto a los otros medios. En el medio MRS-agar *Lactococcus lactis* presentó el mayor rendimiento celular ( $0.0144 \times 10^{13}$ ) y no presentó diferencia significativa con respecto al rendimiento en el medio M17-agar, pero sí con respecto al rendimiento en el medio MPT-agar.

**Tabla VIII**  
Comparativa del rendimiento celular (UFC/mL) de probióticos en los medios MRS-agar, M17-agar y MPT-agar

Cepa	UFC/mL ( $1 \times 10^5$ )		
	MRS-agar	M17-agar	MPT-agar
<i>Lactobacillus casei</i>	1,440,000	10,000,000	<b>200,000,000</b>
<i>Lactococcus lactis</i>	<b>1,180,000</b>	1,050,000	570
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	30,000	200,000	<b>1,650,000</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	2,000,000	<b>240,000,000</b>
<i>Bifidobacterium longum</i>	0	0	<b>20,000,000,000</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,380,000	<b>1,950,000</b>	770,000





**Fig. 26.-** Comparativa del rendimiento celular de probióticos en los medios MPT-agar, M17-agar y MRS-agar

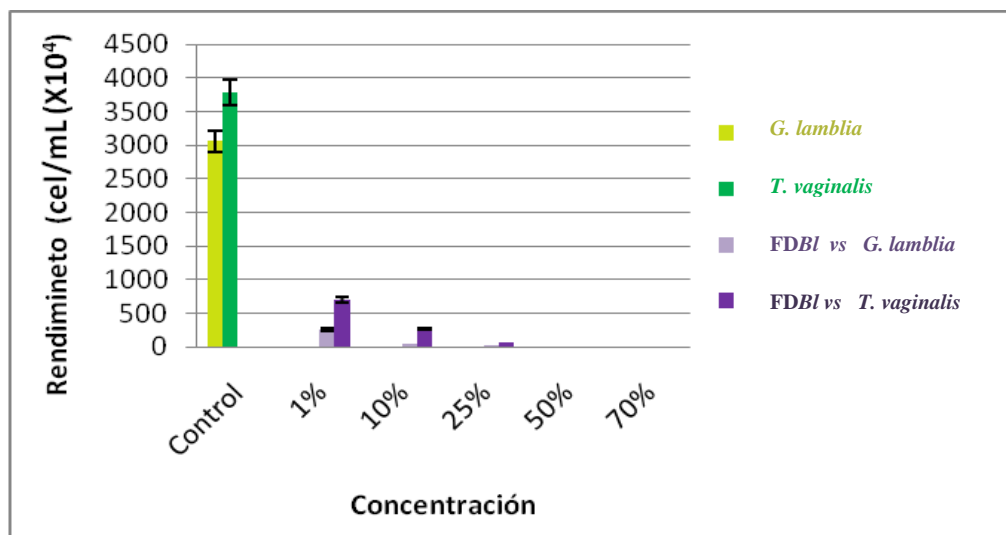
## 8.4. Bioensayos

### 8.4.1. Evaluación de la actividad biológica de factores difusibles de probióticos (FDP) sobre cultivo axénico *in vitro* de *G. lamblia* y *T. vaginalis*

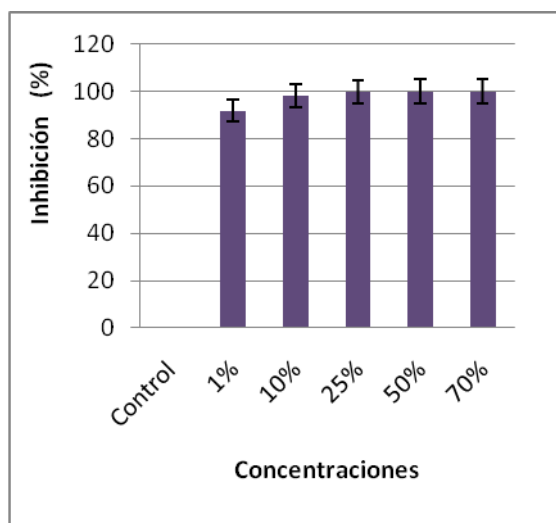
En la figura 27 se observa los resultados de la actividad biológica de los factores difusibles de *B. longum* en el medio MPT-caldo. El cual muestra que las cinco concentraciones evaluadas tienen una marcada inhibición del crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis* en cultivo bajo condiciones axénicas *in vitro*. En los cultivos de *G. lamblia* se observa que en presencia de la dosis de 25, 50 y 70% presentaron 99.9, 100 y 100% de inhibición respectivamente; a las dosis de 1 y 10% la inhibición fue de 91.7 y 98.3% respectivamente. Éstos datos presentan muy marcada diferencia significativamente con respecto al control, sin embargo entre cada concentración evaluada no existe diferencia significativa (Fig. 28 y 45).

Con respecto al cultivo de *T. vaginalis*, las cinco concentraciones de los factores difusibles de *B. longum* presentaron marcada inhibición del crecimiento, a la dosis 50 y 70% ambas presentaron inhibición del 100%, las dosis 1, 10, 25% presentaron inhibición del 77.4, 91.4 y 97.7% respectivamente, los porcentajes de inhibición a las dosis de 10, 25, 50 y 70% no presentaron diferencia significativa entre sí, pero la dosis de 1% sí presentó diferencia significativa con respecto al resto de las dosis (Fig. 29 y 46).

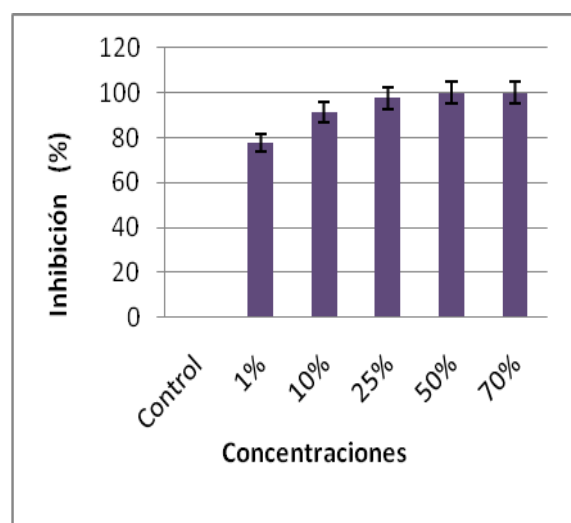
Los cultivos de *G. lamblia* son más sensibles a los FD de *B. longum* que los cultivos de *T. vaginalis*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 27.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de *B. longum* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*.** La inhibición del crecimiento de *G. lamblia* y de *T. vaginalis* se observó a partir de la concentración 1%, seguido de las demás concentraciones. En todos los tratamientos se observa diferencia significativa con respecto al control. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 28.** Comparación de la inhibición de *G. lamblia* en presencia de los FD de *B. longum*.

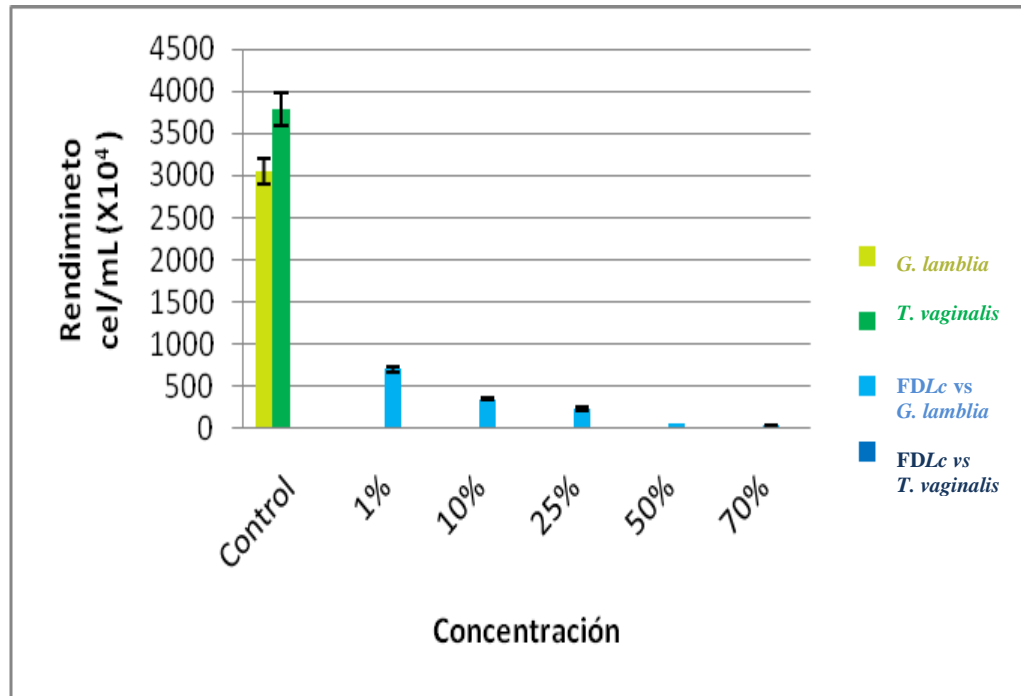


**Fig. 29.** Comparación de la inhibición de *T. vaginalis* en presencia de los FD de *B. longum*.

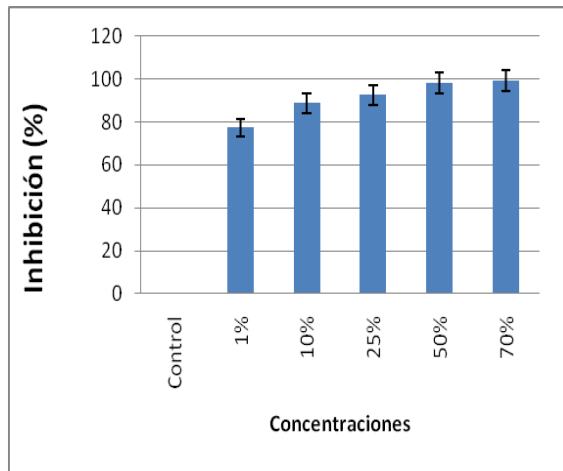
En la figura 30 se observa los resultados de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. casei* en el medio MPT-caldo. El cual muestra que las cinco concentraciones evaluadas tienen una marcada inhibición del crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis* en cultivo bajo condiciones axénicas *in vitro*. En los cultivos de *G. lamblia* se observa que en presencia de la dosis de 70% presentaron 99.1% de inhibición respectivamente; a las dosis de 1, 10, 25 y 50% la inhibición fue de 77.3, 88.7, 92.5 y 98.3% respectivamente. Éstos datos presentan muy marcada diferencia significativamente con respecto al control, sin embargo a las dosis de 10, 25, 50 y 70 no presentan diferencia significativa, sin embargo si presentan diferencia significativa con respecto a la dosis del 1% (Fig. 31 y 45).

Con respecto al cultivo de *T. vaginalis*, las cinco concentraciones de los factores difusibles de *L. casei* presentaron marcada inhibición del crecimiento, a la dosis 25, 50 y 70% presentaron inhibición del 100%, las dosis 1 y 10% presentaron inhibición del 99.5 y 99.7% respectivamente, los porcentajes de inhibición a las cinco dosis evaluadas no presentaron diferencia significativa entre sí (Fig. 32 y 46).

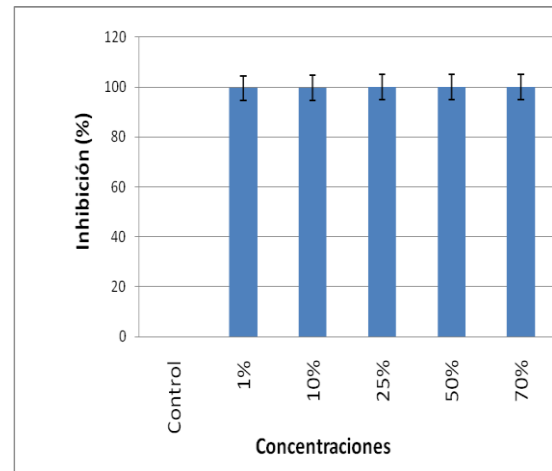
Los cultivos de *T. vaginalis* son más sensibles a los FD de *L. casei* que los cultivos de *G. lamblia*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 30.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. casei* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*.** Tanto *T. vaginalis* como *G. lamblia* presentan marcada inhibición en presencia de los FD de *L. casei*, sin embargo *T. vaginalis* es más sensible que *G. lamblia*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar (+ DS).



**Fig. 31.** Comparación de la inhibición de *G. lamblia* en presencia de los FD de *L. casei*

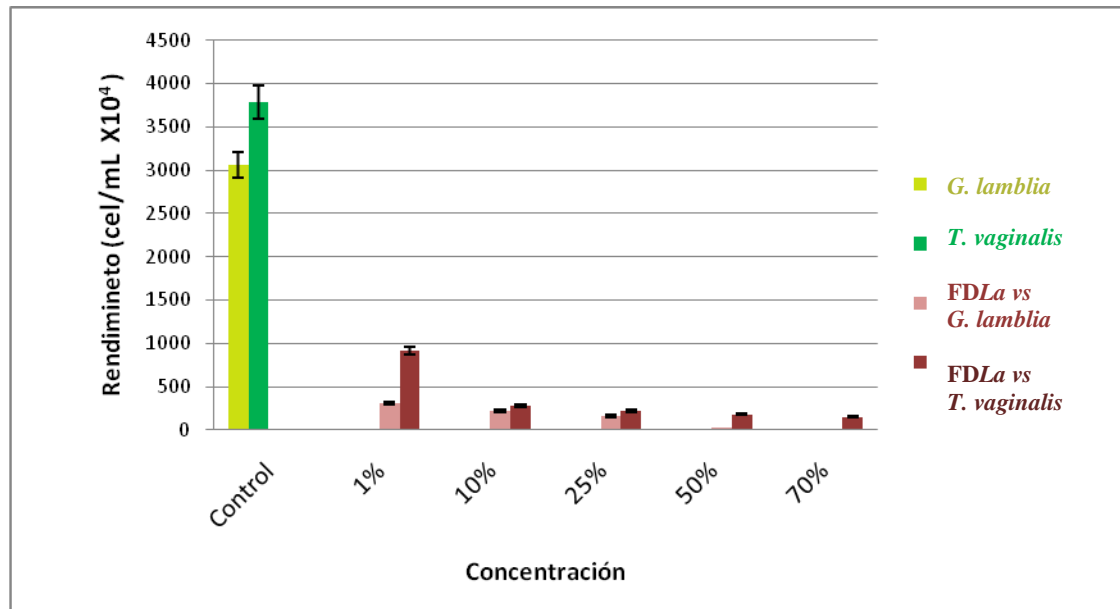


**Fig. 32.** Comparación de la inhibición de *T. vaginalis* en presencia de los FD de *L. casei*

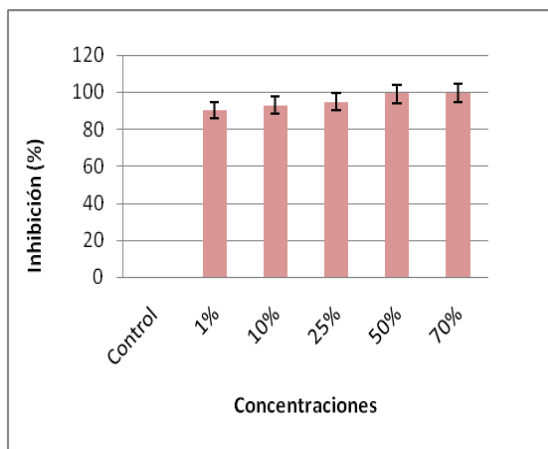
En la figura 33 se observa los resultados de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. acidophilus* en el medio MPT-caldo. El cual muestra que las cinco concentraciones evaluadas tienen una marcada inhibición del crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis* en cultivo bajo condiciones axénicas *in vitro*. En los cultivos de *G. lamblia* se observa que en presencia de las dosis de 1, 10, 25, 50 y 70% presentaron una inhibición del crecimiento de 90.2, 92.9, 94.8, 99.2 y 99.7% respectivamente. Estos datos presentan muy marcada diferencia significativamente con respecto al control (Fig. 34 y 45).

Con respecto al cultivo de *T. vaginalis*, las cinco concentraciones de los factores difusibles de *L. acidophilus* presentaron marcada inhibición del crecimiento, a la dosis 1, 10, 25, 50 y 70% presentaron inhibición del 70.6, 90.9, 92.8, 94.1 y 95.1%, los porcentajes de inhibición a las dosis 10, 25, 50 y 70% no presentaron diferencia significativa entre estas, pero sí con respecto a la dosis de 1% (Fig. 35 y 46).

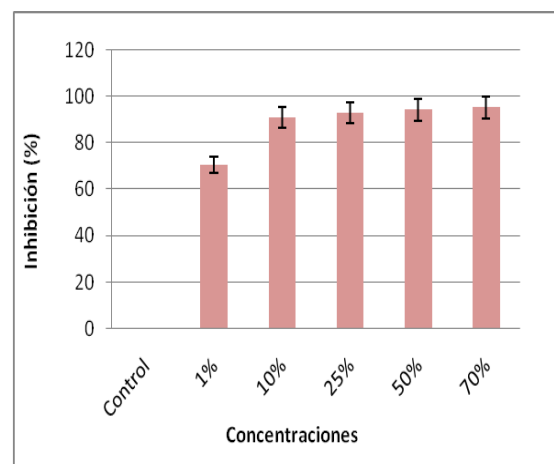
Tanto los cultivos de *T. vaginalis* como de *G. lamblia* presentaron marcada inhibición del crecimiento en presencia de los FD de *L. acidophilus*, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 33.-** Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. acidophilus* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*. Tanto *T. vaginalis* como *G. lamblia* presentan marcada inhibición en presencia de los FD de *L. acidophilus*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 34.** Comparación de la inhibición de *G. lamblia* en presencia de los FD de *L. acidophilus*

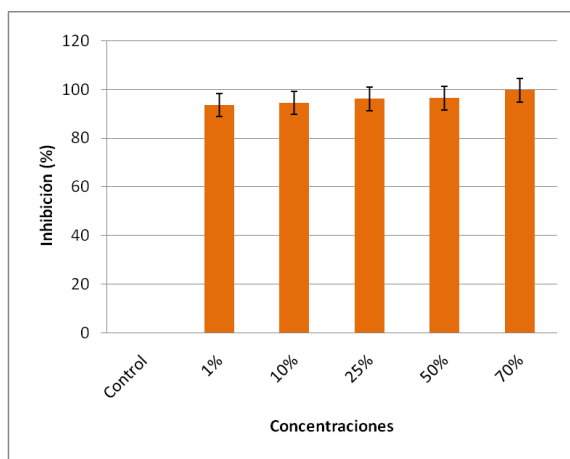


**Fig. 35.** Comparación de la inhibición de *T. vaginalis* en presencia de los FD de *L. acidophilus*

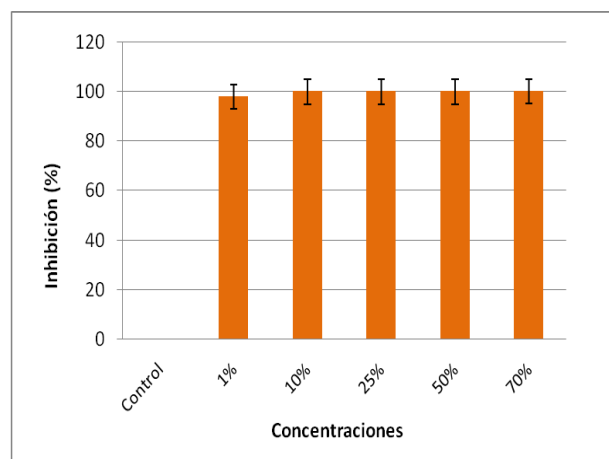
La actividad biológica de los FD de *L. plantarum* sobre los cultivos axénicos *in vitro* de *G. lamblia* a las dosis de 1, 10, 25, 50 y 70% presentaron inhibición del 93.6, 94.4, 96.1, 96.5, y 99.7% respectivamente, estos resultados no presentaron diferencia significativa (Fig. 36 y 45).

La actividad biológica de los factores difusibles de *L. plantarum* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *T. vaginalis*, muestra que a las dosis de 25, 50 y 70% se inhibe el 100% del crecimiento, pero a la dosis de 1 y 10% la inhibición es del 98 y 99.9%, estos porcentajes de inhibición no presentan diferencia significativa entre si (Fig. 37 y 46).

El cultivo axénico *in vitro* tanto de *G. lamblia* como de *T. vaginalis*, son altamente susceptibles a los factores difusibles de *L. plantarum* (Fig. 38). Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).

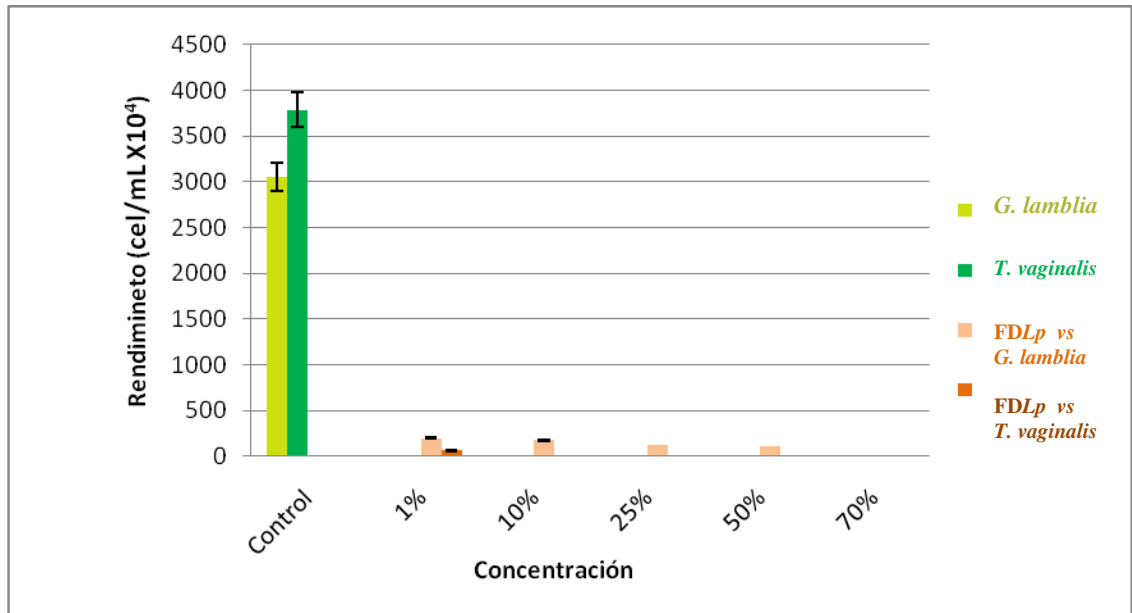


**Fig. 36.** Comparación de la inhibición de *G. lamblia* en presencia de los FD de *L. plantarum*.



**Fig. 37.** Comparación de la inhibición de *T. vaginalis* en presencia de los FD de *L. plantarum*.



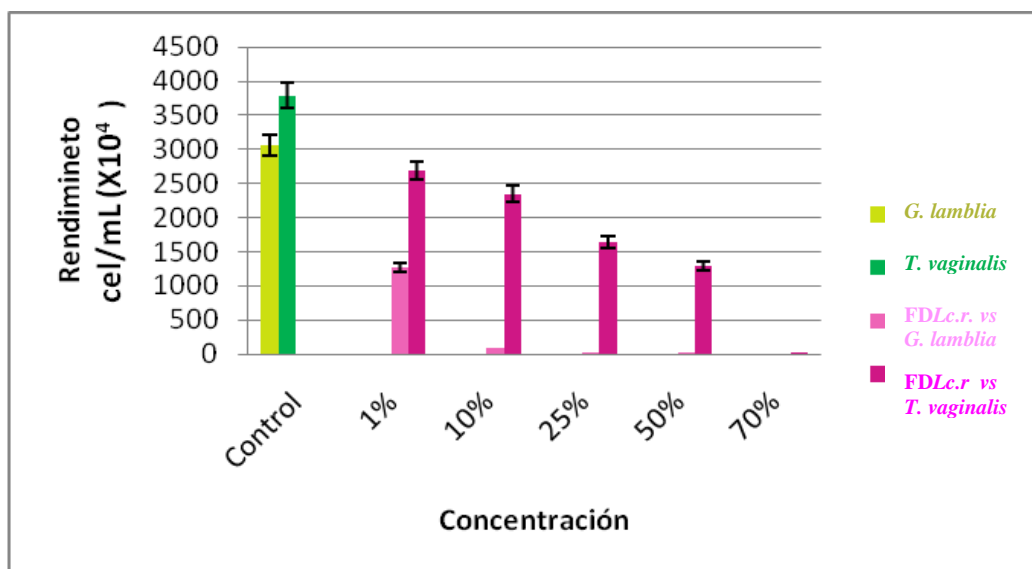


**Fig. 38.-Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. plantarum* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*.** Tanto *T. vaginalis* como *G. lamblia* presentan marcada inhibición en presencia de los FD de *L. plantarum*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar (+ DS)

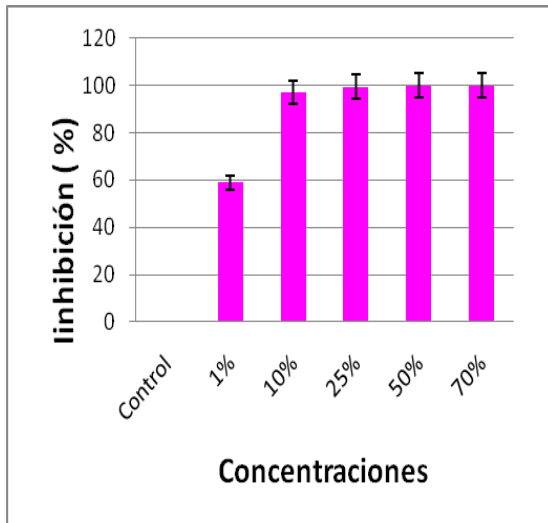
En la figura 39 se observa los resultados de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. casei rhamnosus* en el medio MPT-caldo. El cual muestra que las cinco concentraciones evaluadas tienen una marcada inhibición del crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis* en cultivo bajo condiciones axénicas *in vitro*. En los cultivos de *G. lamblia* se observa que en presencia de la dosis de 10, 25, 50 y 70% presentaron 97.3 99.4, 100 y 100% de inhibición respectivamente; a las dosis de 1 y 10% la inhibición fue de 58.9%. Estos datos presentan muy marcada diferencia significativamente con respecto al control, sin embargo a las dosis de 10, 25, 50 y 70 no presentan diferencia significativa, sin embargo si presentan diferencia significativa con respecto a la dosis del 1% (Fig. 40 y 45).

Con respecto al cultivo de *T. vaginalis*, las cinco concentraciones de los factores difusibles de *L. casei rhamnosus* presentaron inhibición del crecimiento, a la dosis 70% presentó inhibición del 99.3%, las dosis 1,10, 25 y 50% presentaron inhibición del 13, 24, 46.8 y 57.9% respectivamente, los porcentajes de inhibición a las cinco dosis evaluadas presentaron diferencia significativa entre si (Fig. 41 y 46).

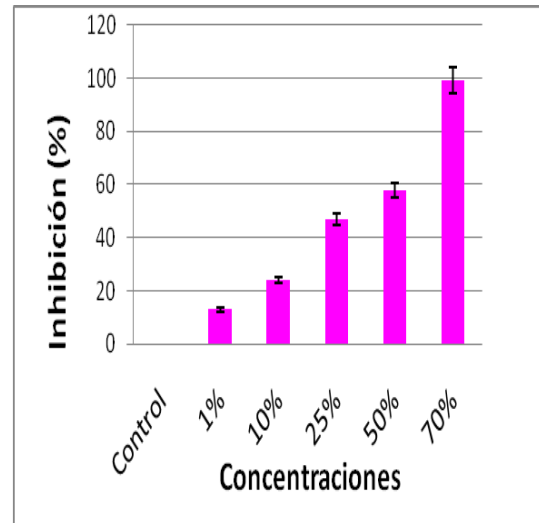
Los cultivos de *G. lamblia* son más sensibles a los FD de *L. casei rhamnosus* que los cultivos de *T. vaginalis*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 39.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. casei rhamnosus* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*.** Tanto *T. vaginales* como *G. lamblia* presentan marcada inhibición en presencia de los FD de *L. casei*, sin embargo *G. lamblia* es más sensible que *T. vaginalis*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 40.** Comparación de la inhibición de *G. lamblia* en presencia de los FD de *L. casei rhamnosus*.



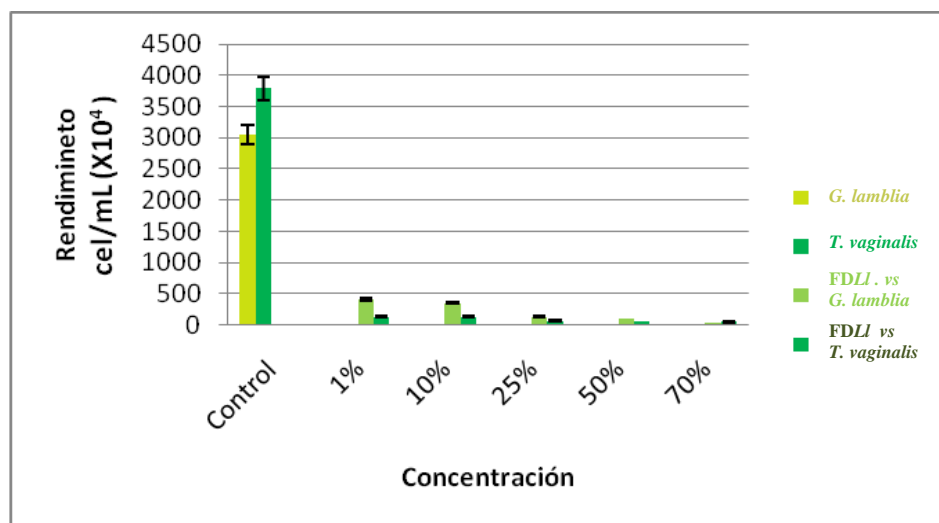
**Fig. 41.** Comparación de la inhibición de *T. vaginalis* en presencia de los FD de *L. casei rhamnosus*.

En la figura 42 se observa los resultados de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. lactis* en el medio MPT-caldo. El cual muestra que las cinco concentraciones evaluadas tienen una marcada inhibición del crecimiento de *G. lamblia* y *T. vaginalis* en cultivo bajo condiciones axénicas *in vitro* (Tabla IX y X). En los cultivos de *G. lamblia* se observa que en presencia de la dosis de 50 y 70% presentaron 96.8 y 99% de inhibición respectivamente; las dosis de 1, 10, y 25% la inhibición fue de 87, 88.6 y 95.7% respectivamente. Estos datos presentan muy marcada diferencia significativamente con respecto al control. Las dosis 1 y 10%, no presentan diferencia significativa entre sí, sin embargo presentan diferencia significativa con respecto a las dosis del 25, 50 y 70%, las cuales no muestran diferencia significativa entre si (Fig. 43, 45 y Tabla IX).

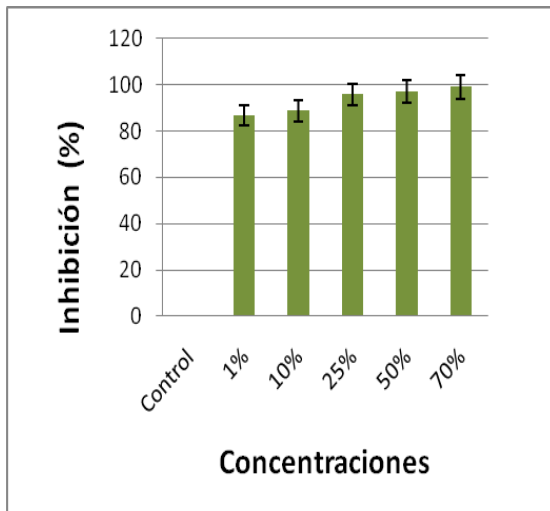
Con respecto al cultivo de *T. vaginalis*, las cinco concentraciones de los factores difusibles de *L. lactis* presentaron marcada inhibición del crecimiento, a la dosis 25, 50 y 70% presentaron inhibición del 97.8, 98 y 98.5%, las dosis 1 y 10% presentaron inhibición ambas del 95.8%. Estos

datos presentan muy marcada diferencia significativamente con respecto al control, los porcentajes de inhibición a las cinco dosis evaluadas no presentaron diferencia significativa entre sí (Fig. 44 y 46, y Tabla X).

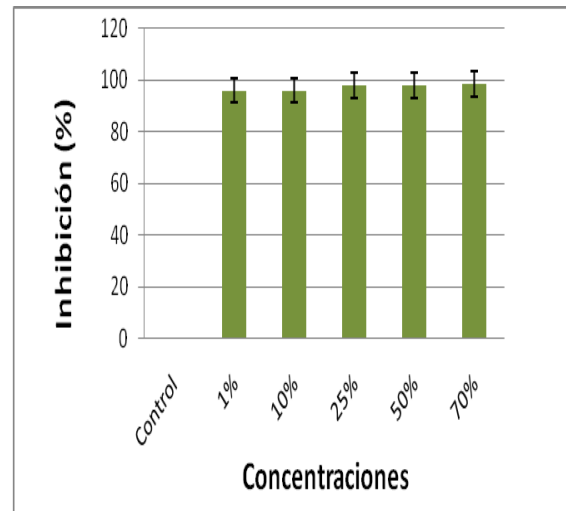
Los cultivos de *T. vaginalis* son más sensibles a los FD de *L. lactis* que los cultivos de *G. lamblia*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS)



**Fig. 42.- Comparación de la actividad biológica de los factores difusibles de *L. lactis* sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*.** Tanto *T. vaginalis* como *G. lamblia* presentan marcada inhibición en presencia de los FD de *L. lactis*, sin embargo *T. vaginalis* es más sensible que *G. lamblia*. Los bioensayos se realizaron empleando el medio MPT-caldo, cada barra representa el promedio de nueve repeticiones independientes, graficando como media la desviación estándar ( $\pm$  DS).



**Fig. 43.** Comparación de la inhibición de *G. lamblia* en presencia de los FD de *L. lactis*

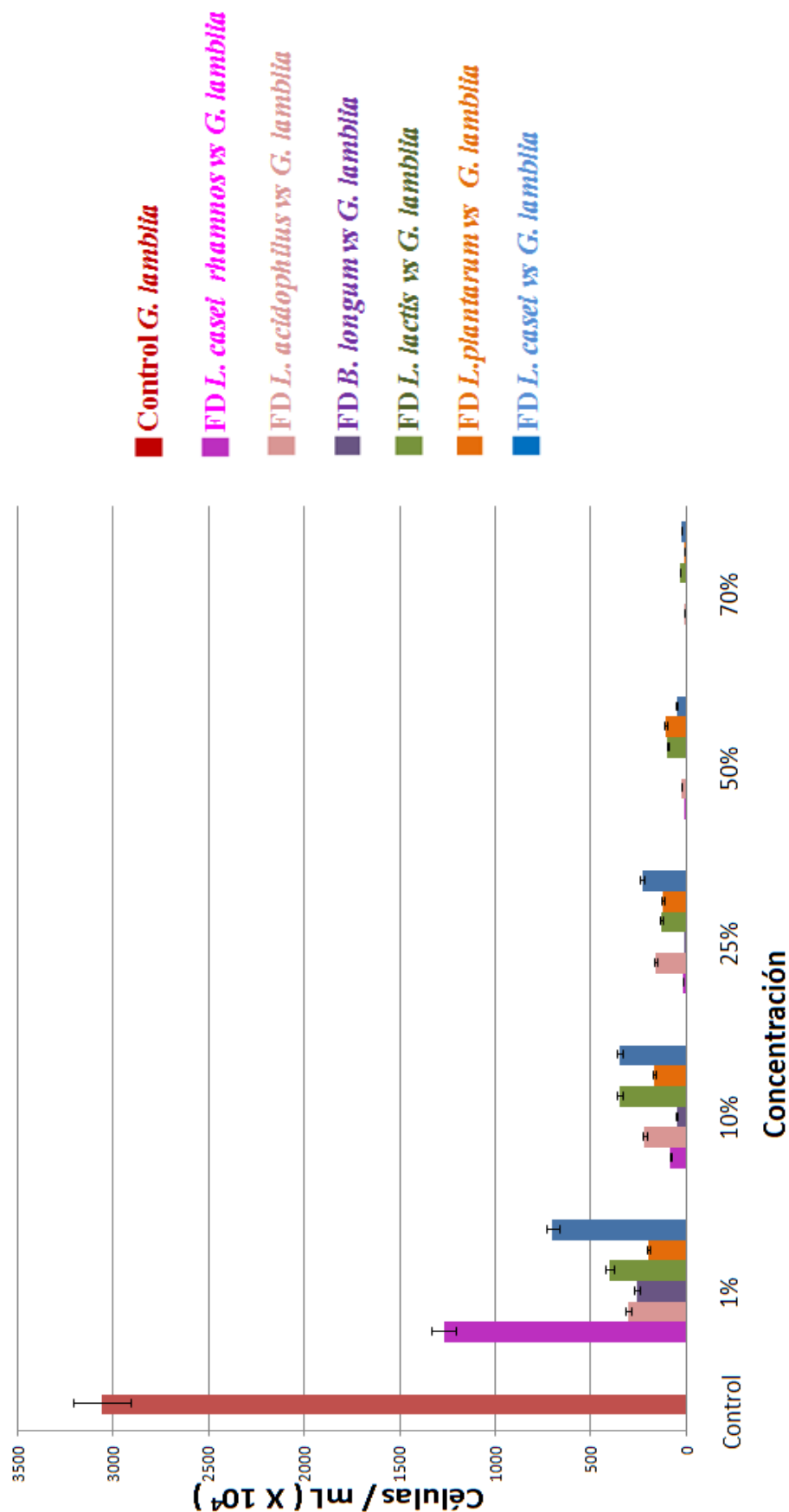


**Fig. 44.** Comparación de la inhibición de *T. vaginalis* en presencia de los FD de *L. lactis*

**Tabla IX**

Comparación del porcentaje de inhibición de los factores difusibles de probióticos sobre *Giardia lamblia*

Factor Difusible de:	Dosis(%)	Inhibición(%)
<i>L. plantarum</i>	1	<b>93.6</b>
	10	94.4
	25	96.1
	50	96.5
	70	99.7
<i>L. casei</i>	1	77.3
	10	88.7
	25	92.5
	50	98.3
	70	99.1
<i>L. casei rhamnosus</i>	1	58.9
	10	97.3
	25	99.4
	50	100.0
	70	100.0
<i>B. longum</i>	1	<b>91.7</b>
	10	98.3
	25	99.9
	50	100.0
	70	100.0
<i>L. lactis</i>	1	87.0
	10	88.6
	25	95.7
	50	96.8
	70	99.0
<i>L. acidophilus</i>	1	90.2
	10	92.9
	25	94.8
	50	99.2
	70	99.7



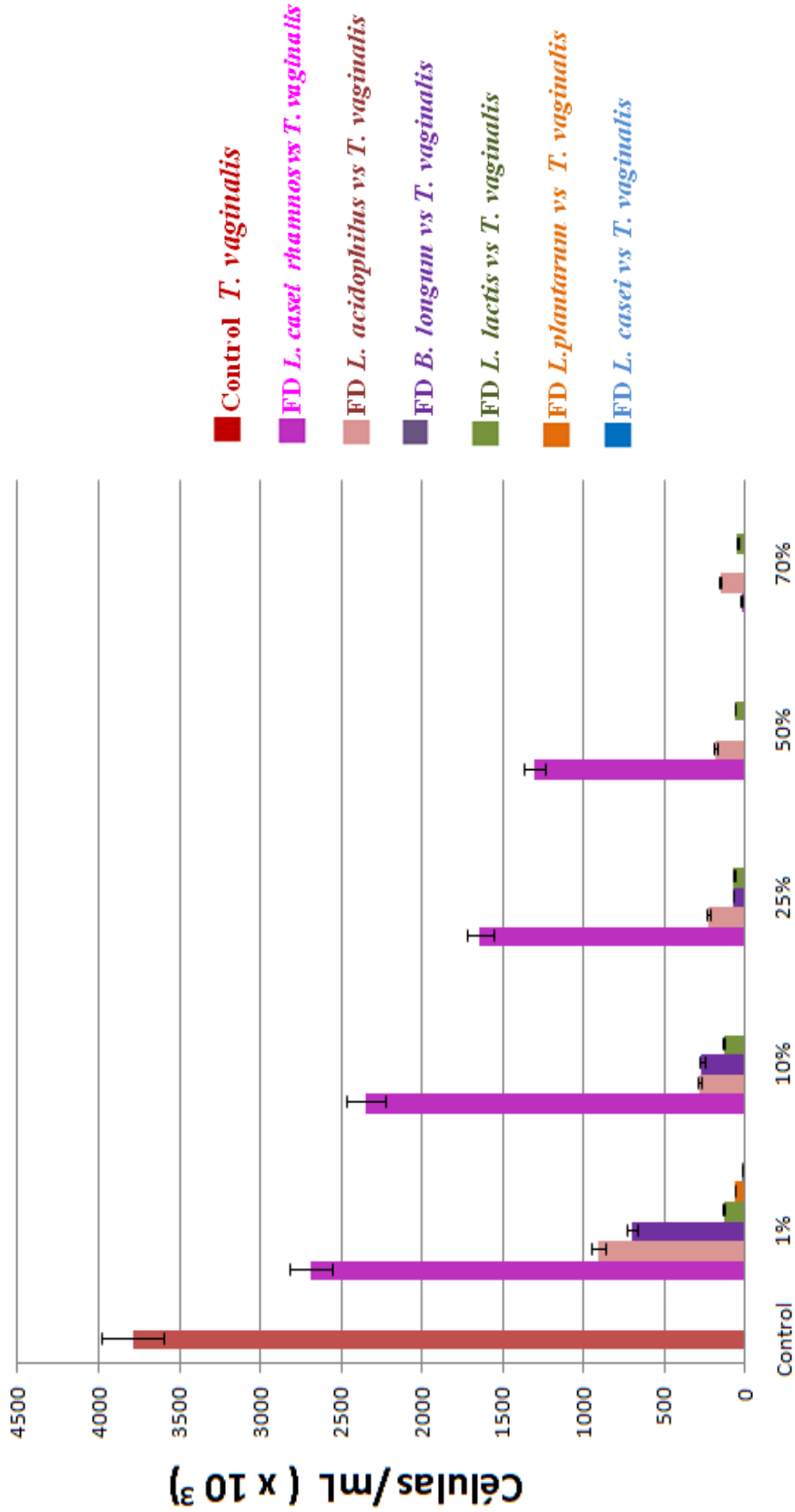
**Fig. 45- Comparación de la actividad biológica de los FDP sobre el cultivo axénico *in vitro* de *G. lambia*.** Se observó marcada inhibición del crecimiento de *G. lambia* por acción de los FDP seguido de las demás concentraciones de todos los FD de *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. longum*, *L. casei rhamnosus*. En todos los tratamientos se observa diferencia significativa con respecto al control.

**Tabla X**

Comparación del porcentaje de inhibición de los factores difusibles de probióticos sobre *T. vaginalis*

<b>Factor Difusible de:</b>	<b>Dosis(%)</b>	<b>Inhibición(%)</b>
<i>L. plantarum</i>	1	98.0
	10	99.9
	25	100.0
	50	100.0
	70	100.0
<i>L. casei</i>	1	99.5
	10	99.7
	25	100.0
	50	100.0
	70	100.0
<i>L. casei rhamnosus</i>	1	13.0
	10	24.0
	25	46.8
	50	57.9
	70	99.3
<i>B. longum</i>	1	77.4
	10	91.4
	25	97.7
	50	100.0
	70	100.0
<i>L. lactis</i>	1	95.8
	10	95.8
	25	97.8
	50	98.0
	70	98.5
<i>L. acidophilus</i>	1	70.6
	10	90.9
	25	92.8
	50	94.1
	70	95.1





### Concentración

**Fig. 46-** Comparación de la actividad biológica de los FDP sobre el cultivo axénico *in vitro* de *T. vaginalis*. Se observó marcada inhibición del crecimiento de *T. vaginalis* por acción de los FDP seguido de las demás concentraciones de todos los FD de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. longum*, *L. casei rhamnosus*. En todos los tratamientos se observa diferencia significativa con respecto al control.

#### **8.4.2. Determinación de la $CI_{50}$ de los FDP sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro***

En la determinación de la concentración inhibitoria media  $CI_{50}$  mediante el diseño estadístico PROBIT se observa que la mayor actividad giardicida la presenta el factor difusible de *L. plantarum*, ya que el  $CI_{50}$  lo presenta a la concentración  $<0.0001\%$ . El factor difusible con menor actividad giardicida fue el factor difusible de *L. casei rhamnosus* con una  $CI_{50}$  de 0.808% (Tabla XI).

En la Tabla XII se muestra el análisis mediante el diseño estadístico PROBIT de cinco concentraciones de los factores difusibles de los seis probióticos, se observa que la mayor actividad tricomonocida la presentan el factor difusible de *L. casei* y *L. lactis* con una  $CI_{50}$   $<0.0001\%$ . El factor difusible con menor actividad tricomonocida fue el factor difusible de *L. casei rhamnosus* con una  $CI_{50}$  de 8.769%.

**Tabla XI**

Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los factores difusibles de probióticos sobre *G. lamblia*

Factores difusibles de	Dosis (%)	CI <sub>50</sub>	X <sup>2</sup>	P
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1 10 25 50 70	<u>≤ 0.001%</u>	90,462.919	0.000
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 10 25 50 70	0.003%	166,761.381	0.000
<i>Lactobacillus casei</i>	1 10 25 50 70	0.105%	137,629.565	0.000
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	1 10 25 50 70	<u>0.808%</u>	2,857.406	0.000
<i>Lactococcus lactis</i>	1 10 25 50 70	0.007%	156,367.070	0.000
<i>Bifidobacterium longum</i>	1 10 25 50 70	0.041%	26,492.301	0.000
Valor de la CI <sub>50</sub> de los FDP sobre <i>G. lamblia</i> mediante el diseño estadístico PROBIT, mostrando el valor de la X <sup>2</sup> (Chi-cuadrada) y P la significancia de los resultados obtenidos				

**Tabla XII**

Determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los factores difusibles de probióticos sobre *T. vaginalis*

Factores difusibles de	Dosis (%)	CI <sub>50</sub>	X <sup>2</sup>	P
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	0.004	2223.049	0.00
	10			
	25			
	50			
	70			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	0.053	24,626.157	0.00
	10			
	25			
	50			
	70			
<i>Lactobacillus casei</i>	1	<u>&lt;0.001</u>	7,362.716	0.00
	10			
	25			
	50			
	70			
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	1	<u>8.769</u>	1,730,862.179	0.00
	10			
	25			
	50			
	70			
<i>Lactococcus lactis</i>	1	<u>&lt;0.001</u>	21,806.882	0.00
	10			
	25			
	50			
	70			
<i>Bifidobacterium longum</i>	1	0.120	150,715.042	0.00
	10			
	25			
	50			
	70			
Valor de la CI <sub>50</sub> de los FDP sobre <i>T. vaginalis</i> mediante el diseño estadístico PROBIT, mostrando el valor de la X <sup>2</sup> (Chi-cuadrada) y P la significancia de los resultados obtenidos				

## 9. DISCUSIONES

El estudio científico de los probióticos, se remontan hacia el año de 1905, cuando el ruso Elie Metchnikof, quien por entonces fuera director del Instituto Pasteur en Francia, fijó su atención en la importancia de los probióticos en la salud, llegando a describir a las personas quienes lo consumían como “personas muy pobres pero que tenían una vida larga y saludable”, característica que atribuyó a su alimentación, basada prácticamente en el consumo de derivados lácteos fermentados; y después de varios estudios llegó a identificar a los lactobacillus, como las bacterias predominantes en estos derivados lácteos. Estas observaciones fueron plasmadas en 1907 en su libro “La prolongación de la vida”, haciendo alusión al descubridor original de los probióticos, el fisiólogo búlgaro Dr. Estambre Gigorov (Anukam K,C. and Reid G., 2007).

En años recientes, a través de diversos estudios, se ha demostrado la actividad benéfica de las bacterias consideradas como probióticos en el tratamiento de diversas afecciones relacionadas con el sistema digestivo, ya que se reporta que estimulan el sistema inmune, evitan el reconocimiento de toxinas a sitios específicos en el intestino, incrementan la producción de inmunoglobulinas, entre otros. Recientes publicaciones sugieren que la restauración de las comunidades microbianas endógenas, es la solución a varios padecimientos de la mucosa intestinal e incluso vaginal (Sartor R.B., 2004 and Saggiaro A., 2004).

Sin embargo, también se han reportado graves alteraciones patológicas en diversos órganos ocasionados por bacterias consideradas como probióticos, estas alteraciones se han observado principalmente en personas con sistema inmune comprometido, así como en personas con pancreatitis aguda (Vogel G., 2008 y <http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2733.asp>). También se han relacionado a los lactobacillus y bifidobacterias, con afecciones orales en el caso de caries dental (Byun R, *et al.*, 2004).

En este trabajo evaluamos la actividad biológica de los factores difusibles de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*, sobre dos parásitos patógenos del hombre, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

*G. lamblia* es el agente causal de la giardiasis o giardiosis parasitosis que afecta principalmente a los países en vías de desarrollo, como es el caso de México, y en México una de las principales entidades que ocupa el primer lugar en casos de giardiasis es Nuevo León (Cedillo-Rivera, *et al.*, 2009).

Por otra parte, *T. vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis afección relacionada con el tracto vulvovaginal, dicha afección, de acuerdo a varios estudios está estrechamente relacionada con la ausencia del bacilo de Döderlein o *Lactobacillus acidophilus* en esta región, sin embargo en diversos estudios clínicos ginecológicos, asocian estrechamente la presencia de *T. vaginalis* con la instalación del virus del papiloma humano, el cual causa graves alteraciones fisiológicas principalmente en mujeres (Neira O., *et al.*, 2005). Además, sistemáticamente, los lactobacilos no han sido asociados con daños y por ende son considerados como miembros no patógenos de la flora intestinal y urogenital. Recientemente, el uso de probióticos *per se* y lactobacilos reciben mayor atención como una alternativa natural para restaurar y mantener la salud (Pérez-Leonard H., 2007).

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica de los factores difusibles de probióticos sobre *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, empleamos el medio de cultivo MPT-caldo, el cual sustenta el crecimiento tanto de bacterias consideradas como probióticos así como protozoarios (Barrón M.P, *et al.*, 2008). Sin embargo este medio hasta ahora sólo había sido empleado para ensayos *in vitro* con *Entamoeba histolytica*, y en este trabajo evaluamos a *G. lamblia* y *T. vaginalis*. De acuerdo a los resultados obtenidos este medio MPT-caldo sustenta el crecimiento de estos dos protozoarios patógenos (Fig. 13 y 14).

Por otra parte, se realizó la comparación del rendimiento celular *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. lactis* y *B. longum* empleando los medios MRS-caldo y los medios comerciales M17-caldo y el medio MPT-caldo. Las cinéticas de crecimiento se realizaron empleando dos métodos: Método de turbidimetría y método de recuento bacteriano en placa (RBP). De acuerdo al análisis de las cinéticas de los seis probióticos empleando la método turbidimétrica, observamos que *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* presentan mayor rendimiento en el medio MRS-caldo (Fig. 15 y 16), y sólo *B. longum* presentó mayor rendimiento en el medio MPT-caldo (Fig. 17).

También se realizó una cinética comparativa del rendimiento celular de *B. longum* cultivado tanto en presencia como en ausencia de CO<sub>2</sub> y las cinéticas indican que no existe diferencia significativa (Fig. 18 y 19). Este resultado nos indica que el medio MPT-caldo cumple con los requerimientos nutricionales de *B. longum*, dado su carácter de microorganismo anaerobio facultativo, ya que este medio de cultivo cuenta entre su formulación con agentes reductores (Ninomiya K., *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos al comparar el rendimiento celular de los probióticos empleando la método de recuento bacteriano en placa (RBP), indican que el medio MPT-agar sustenta muy bien el crecimiento de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. casei rhamnosus*, *L. acidophillus* y *L. lactis*, ya que comparando el rendimiento celular de estas bacterias en los tres medios evaluados (medios comerciales MRS-agar y M17-agar, y el medio MPT-agar) en la mayoría de los casos se obtuvo mayor rendimiento celular en el medio MPT-agar, tal como se aprecia en la Tabla VIII; observando que *B. longum* obtuvo el mayor rendimiento celular, seguido de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. casei rhamnosus*, *L. acidophillus* y *L. lactis*. Esto nos indica que el medio MPT-agar es un buen medio para el crecimiento de éstas bacterias probióticas.

Comparando los resultados obtenidos con la método de turbidimetría y con la método de recuento bacteriano en placa (RBP), se observa marcada diferencia en el rendimiento celular registrado, éstas diferencias pueden ser atribuidas a que en la método

turbidimétrica solo se registra la turbidez, teniendo como una desventaja que al momento de tomar lecturas, en el medio de cultivo se encuentran presentes metabolitos y sustancias sintetizadas por las propias bacterias, dando como resultado que la turbidez sea un método cualitativo y que no refleje datos reales del rendimiento celular de cada probiótico; sin embargo con la método de RBP sí se contabilizan las colonias presentes en cada medio de cultivo, por lo cual es una método más confiable, lo que nos da una mayor claridad de la viabilidad de las bacterias (Tabla VIII y Fig.26).

En cuanto la actividad biológica de los factores difusibles de los probióticos (FDP), en la figura 45 y Tabla IX se muestra la compilación de los resultados obtenidos, en el cual se observa que los seis factores difusibles (FD) de los probióticos a las 5 dosis evaluadas todos presentan actividad giardicida, presentando diferencia significativa con respecto al control, sin embargo es el FD de *L. plantarum* seguido del FD de *B. longum* presentaron la mayor capacidad giardicida, ya que desde la concentración más baja (1%) inhiben 98 y 99.5% respectivamente, sin embargo es *L. plantarum* quien presenta la menor  $CI_{50}$  sobre *G. lamblia* con un valor de  $< 0.001\%$  (Tabla XI). En el caso de la actividad biológica con el FD de *L. acidophilus* a la dosis de 1% fue de 90.2 y la  $CI_{50}$  fue de 0.003%, estos resultados concuerdan con lo reportado por Pérez P.F., *et al.*, 2001, quien reportó inhibición *in vitro* de cultivos de *G. intestinalis* por factores extracelulares de *L. acidophilus*, y menciona que la posible actividad giardicida puede estar dada por moléculas de bajo peso molecular las cuales son inactivadas por el calor.

En cuanto a la actividad biológica del FD de los seis probióticos evaluados sobre *T. vaginalis* bajo condiciones axénicas *in vitro*, se observa que a partir de la dosis al 1% del FD de cada probiótico exhiben actividad tricomonocida, sin embargo el mayor porcentaje de inhibición lo presentó el FD de *L. plantarum* con una inhibición del 99.5%, seguido del 98% por acción del FD de *L. lactis* y 95.8% de inhibición por parte del FD de *L. lactis* y se obtuvo un valor para la concentración inhibitoria media  $CI_{50}$  un valor de  $< 0.001$  tanto para el FD de *L. lactis* y para *L. casei*, seguido del 0.041% para el FD de *L. plantarum*.



Estos resultados muestran la gran actividad biológica inhibitoria de los factores difusibles de los seis probióticos sobre los cultivos de *G. lamblia* y *T. vaginalis*; éstos resultados pueden ser atribuidos a la actividad de las bacteriocinas. La acción de las bacteriocinas está determinada por la composición de la membrana plasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. También es de considerar las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida (Cintas *et al.*, 2001 y Heerklotz *et al.*, 2004).

En el caso de las bacterias Gram positivas se caracterizan por poseer un alto contenido de lípidos en su membrana, y en este caso el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos (extremo C- terminal en el caso de la nisina, o extremo N-terminal en el caso de la pediocina), después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica en el caso de la nisina esta inserción se realiza por el extremo amino terminal (Moll *et al.*, 1999). Y en el caso de la pediocina es a través de su hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar *et al.*, 2000). De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana, probablemente a la vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula (Bizani *et al.*, 2005 y González, *et al.*, 2005).

Otro aspecto importante es la inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular, como un mecanismo secundario de estos péptidos antimicrobianos (Brötz y Sahl 2000). El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos como es el caso de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* va a tener distintos comportamientos. El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cisteína y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos: a) bacteriocinas con un estrecho rango de acción restringido a microorganismos de la misma especie; b) bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y

algunas bacterias gran positivas; y c) bacteriocinas de amplio rango de acción las cuales inhiben una amplia variedad de gran positivas (Cintas *et al.*, 2001).

El protozooario *T. vaginalis* es más sensible a los FDLc. Posiblemente estos resultados estén relacionados con la localización de *L. casei* como microflora normal del tracto urogenital y microflora gastrointestinal. Además los FDLc pueden tener una interacción muy asociada a el medio donde habitan y que produzcan ciertos metabolitos y bacteriocinas específicas que dañen seriamente al trofozoíto de *T. vaginalis*. De acuerdo a la literatura (Sánchez J.A. 2008) la incidencia de *Lactobacilos acidophilus* en la región urogenital influye en la presencia de la flora vaginal considerando que la salud de la vagina se encuentra influenciada por éste probiótico, también conocido como bacilo de Döderlein. En la figura 33, se observa la actividad biológica de FD de *L. acidophilus* sobre *T. vaginalis* el cual inhibe a partir de la dosis 1% en un 70.6% y a la dosis del 70% inhibe 95.1% la población de éste protozooario, y la  $CI_{50}$  se observó en 0.053%. Los resultados obtenidos demuestran la eficiente actividad tricomonocida de los factores difusibles de *L. acidophilus*. Un posible blanco de estudio podría ser la evaluación de los FD de *L. acidophilus* en cultivos de células epiteliales en presencia del factor de desprendimiento celular (CDF) producido por *T. vaginalis*, ya que el CDF ha sido reportada como un glicoproteína inmunogénica en hombre que *in situ* ocasiona lisis celular y eritemas, *in vitro* se ha observado que éste CDF provoca el desprendimiento de la monocapa de las células epiteliales (Garber y Lemchuka-Favel, 1990).

Existen estudios basados con extractos de plantas pero las concentraciones inhibitorias del crecimiento tanto en *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginales* son dosis altas a comparación de las dosis aplicadas con medios condicionados de bacterias probióticas.

La utilización de productos fitoterapéuticos pudiera ser muy útil, sobre todo si no tuvieran efectos indeseables sobre el ser humano, y los que han sido tradicionalmente utilizados desde tiempos muy antiguos, para mejorar síntomas y eliminar infecciones, sin embargo; existe la controversia de utilizar adecuadamente las dosis, debido a que en

algunos casos también las sustancias activas de las plantas pueden ser tóxicas o dañinas para los organismos, debido a esto, se debe mencionar que los probióticos son microorganismos que se encuentran en el ser humanos como microflora nativa y que tienen múltiples beneficios para la salud, y para el bienestar del ser humano. Estos estudios demuestran la importancia de los probióticos sobre el ser humano.

Recientes investigaciones, de biotecnología en alimentos, han visto la necesidad de mantener vivas las bacterias probióticas para que lleguen al intestino, y se observa que han modificado cepas para la resistencia de las condiciones normales del tracto gastrointestinal, en éste trabajo se utilizó todos los factores difusibles del medio de cultivo.

En la literatura, mencionan cepas probióticas muestran característica de producción de ácido láctico, ácido acético, ácidos grasos de cadena corta, también producen bacteriocinas. En la naturaleza existen una enorme diversidad de éstas proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o de especies diferentes, pero falta mucho por investigar porque en la actualidad solo se sabe que la mayoría de las bacterias producen bacteriocinas pero no se han estudiado con profundidad ni se han aislado o purificado.

La ausencia de antecedentes acerca de la actividad biológica de los factores difusibles de probióticos, sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis*, destaca la importancia de éste trabajo, ya que los efectos colaterales indeseables de los tratamientos usados actualmente, podrían ser evitados a través del consumo de los probióticos. En base a estos resultados, evidenciamos la actividad biológica de los factores difusibles de probióticos tienen actividad inhibitoria sobre los protozoarios parásitos patógenos *G. lamblia* y *T. vaginalis*.

## 10. CONCLUSIONES

- En el medio de cultivo MPT-caldo y MPT-agar es posible cultivar las bacterias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Lactococcus lactis*.
- En el medio de cultivo MPT-caldo es posible cultivar protozoarios parásitos patógenos: *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* en condiciones axénicas *in vitro* y con rendimiento óptimos.
- En el medio de cultivo MPT-caldo y MPT-agar es posible cultivar *Bifidobacterium longum*, sin necesidad de otras condiciones anaeróbicas ajenas a las propias del medio de cultivo.
- Los factores difusibles de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* presentan mayor actividad giardicida.
- Los factores difusibles de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* presentan mayor actividad tricomonocida.
- Los cultivos de *G. lamblia* mostraron mayor susceptibilidad a los factores difusibles de probióticos a comparación de los cultivos *T. vaginalis*.

- Los factores difusibles de los seis probióticos (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacilus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis*) a las cinco dosis evaluadas presentan actividad biológica inhibitoria sobre cultivos de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* en condiciones axénicas *in vitro*.

## 11. PERSPECTIVAS

La importancia de la giardiasis y tricomonosis como problema de salud pública y la falta de tratamiento efectivos contra éstas enfermedades a llevado a necesidad de realizar trabajos encaminados a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuricas que sean efectivas y que presenten el mínimo de efectos secundarios adversos al paciente.

En el presente trabajo, se evaluó la actividad biológica de factores difusibles de probióticos sobre *G. lamblia* y *T. vaginalis* y los resultados obtenidos demuestran el potencial tanto giardicida como tricomonocida de los factores difusibles de los seis probióticos evaluados.

El uso de los probióticos como parte de los alimentos, es una área en franco desarrollo en la industria de alimentos lo que origina un marcado interés por los porbióticos y sus metabolitos. Además, en el campo de la salud humana, resulta interesante analizar el uso de las bacteriocinas de los probióticos como una alternativa.

Sin embargo, hacen falta más trabajos de investigación, para determinar si cada unos de los probióticos pueden ser utilizados como agentes preventivos, determinar la eficacia de cada uno de los probióticos que están actualmente en el mercado, y así también determinar sus metabolitos que cada una de éstos probióticos sintetizan. Con ellos nos encamina la investigación de la naturaleza de sus factores activos en estudios posteriores a través de aislar, purificar e identificar el o los componentes responsables de la actividad biológica inhibitoria de los factores difusibles de probióticos sobre protozoarios.

Con lo descrito en este trabajo se puede ver que el reciente desarrollo de la investigación de bacterias probióticas, que ha permitido conocer su mecanismo de acción y su actividad biológica sobre cultivos de protozoarios parásitos patógenos, por ende un

mejor conocimiento de la forma en que lo probióticos inhiben a otros microorganismos pudiendo ser una de las causas de sus efectos benéficos para la salud. Además, cada día se descubren más bacteriocinas y se analizan sus mecanismos de acción a nivel molecular. No cabe duda que en los próximos años se tendrá un mejor entendimiento de estos péptidos que permitan aprovechar al máximo su potencial en beneficio del hombre. Éstos bioensayos deben establecer su eficacia como profiláctico más que como agente terapéutico.

## 12. LITERATURA CITADA

- Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF (2002). *In vitro* activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 49:103-111
- Adam RD, Nash TE, Wellems TE. (1998). The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Research* **16**:4555-4567.
- Adam RD. (1992). Chromosome-size variation in *Giardia lamblia*: the role of rDNA repeats *Nucleic Acids Research* **20**:3057-3061.
- Adam RD (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Review*; **14**: 447-475.
- Alderete JF, Arroyo DC, Dailey J, Engbring MA, Khoshnan L, Lehker MW. (1992). Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Molecular Cell Biology* **1**:173-202.
- Alderete JF, Arroyo R, Lehker M. (1994). Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence. *Methods Enzymol* **236**: 318-33.
- Ali SA, Hill DR. (2003). *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **16**:453-460.
- Amores, R.,A. Calvo, J. R. Maestre y D. Martínez-Hernandez-2004. Probiotics. Review. *España Quimioterapia*. **17**:131-139.



- Anderssen EL, DB Diep, IF Ness IF, VGH Eijsink and J Nissen-Meyer. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 2269-2272.
- Ángeles –López, M., García-Cano E. y Aquino C. S. (2001). Hydrogen peroxide production and resistance to nonoxil in *Lactobacillus* spp. Isolated from the vagina of reproductive age women. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **43** (4): 171-176.
- Antonio, M. A. D., Hawes, S. E. y Hillier S. L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *Journal Infectious Diseases* **180**:1950-1956.
- Anukam K. C., Reid. G. (2007). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A*. Méndez-Vilas. Edición 466.
- Aparicio Tijeras C, Ezquerro Gadea J, López Larrayoz I, Sánchez Ruiz JC. (2004). Dolor abdominal en infección por *Giardia lamblia* Aten Primaria **34**:104.
- Araya-Kojima T, Yaeshima T, Ishibashi N, Shimamura S and Hayasawa H. (1995). Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria and Microflora*. **14**:(2), 59-66.
- Arroyo R, Alderete JF. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection Immunology* **57**: 2991-97.

- Arroyo RA, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo, Alderete JF. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesión synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology* **7**:299-309.
- Atias A. (1994). *Parasitología clínica*. 3 ed. España: Publicaciones Métodos Mediterraneo; p. 367-373.
- Aure JC, Gjonnaess H. (1969). Metronidazole treatment of trichomonal vaginitis. A comparison of cure rates in 1961 and 1967. *Acta Obstetricia and Gynecology Scandinavia* **48**:440-45
- Barrón-González, M.P., Serrano Vázquez G.C, Villarreal- Treviño, L., Verduzco-Martínez, Mata Cárdenas B.D. y Morales Vallarta M.R. (2008). Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos, *Revista Ciencia-UANL*, Vol 11, No 3
- Beaver P, Jung RC, Cupp WC. (1994). *Parasitología clínica*. 2 ed. España: Salvat.
- Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. (1984). *Clinical Parasitology*, 9th edition, Philadelphia: Lea and Febiger; 52-56.
- Bechtold E, Reicher NB. (1991). The relationship of *Trichomonas vaginalis* infections to false diagnosis of squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 442-47.
- Benazet F, Gillaume L. (1971). Induction of *in vivo* resistance of *Trichomonas vaginalis* to nitrimidazine. *Lancet* **2**: 982-3.
- Benchimol M, Batista C, de Souza W. (1990). Fibronectin- and laminin-mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Journal Submicrosc Cytology and Pathology* **22**:39-45.

- Benchimol M, De Souza W. (1995). Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Parasitology Research* **81**:459-64.
- Begley M.,C. Hill y C.G.M. Grahan. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.***72**:1729-1738.
- Berg R.D. (1998). Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? *Trends in Microbiology*.**6**:89-92
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. (2002). Effects of stunting, diarrhoeal Disceases, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* **359**:564-571.
- Black FT, Einersson K, Lidbeck A, Orrhage K, Nord CE. (1991). Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. *Scand Journal Infetion Disceases* **23**:247-54
- Borchardt KA, Smith RF. (1991). An evaluation of an in pouch TV culture method for diagnosis *Trichomonas vaginalis* infection. *Genitourin Medical* **67**(2):149-52.
- Bizani D., Motta, A., Morrissy, A., Terra, R., Souto, A. & Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*, *International. Microbiology.*, **8**:125-131.
- Brötz H., Sahl, H. G., (2000). New insights into the mechanism of action of lantibiotics- diverse biological effects by binding to the same molecular target, *Journal Antimicrobiolgy. Chemother*, **46**:1-6.
- Bujalance C., Moreno, E., Jimenez-Valera, M., Ruiz-Bravo, A. (2007). A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *International Journal of Food Microbiology*, **113**: 28-34.

- Buret A., Hardin JA, Olson ME, Gall DG. (1992). Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology* **103**:506-513.
- Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal Clinical Microbiology* **42**: 3128–3136
- Carey JC, Klebanoff MA. (2001). Bacterial vaginosis and other asymptomatic vaginal infections in pregnancy, *Current Women Health Report* **1**(1): 14-9.
- Carroccio A, Montalto G, Iacono G, Ippolito S, Soresi M, Notarbartolo A. (1997). Secondary impairment of pancreatic function as a cause of severe malabsorption in intestinal giardiasis: a case report. *American Journal Tropical Medical Hygiene* **56**:599-602.
- Casas Castellanos E., Barrón M. P., Villarreal Treviño L., Verduzco Martínez J. A., Mata Cárdenas B. y Morales Vallarta M.R., 2006. Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de *Lactobacillus casei rhanosus* y *Lactobacillus plantarum*. Tesis de Licenciatura. FCB, UANL
- Cerkasovova A, Cerkasov J, Kulda J. (1986). Resistance of trichomonas to metronidazol. *Acta Universitaria* **30**: 485-503.
- Cetina-Sauri G, Basto GS. (1989). Evaluación terapéutica de *Saccaromyces boulardii* en niños con diarrea aguda. *Tribunal Medical* **56**: 111-115.
- Chapoy P. (1985). Treatment of acute infantile diarrhea: Controlled trial of *Saccharomyces boulardii*. *Annals of Pediatrics (Paris)* 561-563.

- Cintas L M, Casaus P, Fernandez M F, Hernandez P E. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborn pathogenic bacteria. *Food Microbiology*. **15**:289-298.
- Colombel JF, Cortot A, Neut C, Romond C. (1987). Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet*.ii:43.
- Costa e Silva Filho F, de Souza W, Lopes JD. (1988). Presence of laminin-binding proteins in Trichomonads and their role in adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**:8042-6.
- Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sex Transmision Diseases*. **24**:1-8.
- Cox FEG. (2002 a). History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Review* **15**:595–612.
- Cox FEG. (2002 b). Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends Parasitology* **18**:108.
- Crossnoe CR, Germanas JP, Le Magueres P, Mustata G, Krause KL. (2002). The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides in sight into metronidazole activation. *Journal Molecular Biology*. **318**(2): 503-17.
- Cu-Uvin S, Ko H, Jamieson DJ. (2002). Prevalence, incidence and persistence or recurrence of tricomoniasis among human immunodeficiency virus (HIV)-positive women and among HIV negative women at high risk for HIV infection. *Clinical Infection Diseases* **34**:1406-11.

- Daly JJ, Sherman JK, (1999). Green L, Hostetler TL. Survival of *Trichomonas vaginalis* in human semen. *Genitourin Medical* **65**:106-8.
- De Carli GA, Brasseur P, Rott M, da Silva A, Wendorff A. (1994). Hemolytic activity of various strains and clones of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas suis*. *Review Latinoamerica Microbiology*. **36**:207-11.
- De Man, J.C.; Rogose, M.; Sharp, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacillus. *Journal Applied Bacteriology* **23**:130-135
- Demirci M, Delibas N, Altuntas I, Oktem F, Yonden Z. (2003). Serum iron, zinc and copp levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis. *Journal Health Population Nutrition* **21**:72-75.
- Dias Filho BP, Andrade AF, de Souza W, Esteves MJ, Angluster J. (1992). Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Microbios* **71**:55-64.
- Diaz E, Mondragon J, Ramirez E, Bernal R. (2003). Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **68**:384-385.
- Diddle AW. (1969). *Trichomonas vaginalis*: resistance to metronidazole. *American Journal Obstetric Gynecology* **98**:583-85
- Donné DIE. (1836). Animacules observes dans les matieres purulents et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme. *C R Academy Society* **3**:385-86.
- Donohue, D.C., and Salminen, S. 1996). Safety of Probiotic Bacteria. *Asia Praticce Journal of Clinical Nutrition*. **5**: 25-28.

- Dorea RC, Salata E, Padovani CR, dos Anjos GL. (1996). Control of parasitic infections among school children in the peri-urban area of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *Review Social Brasil Medical Tropical* **29**:425-430.
- Dragsted D, Farholt S, Lind I. (2001). Occurrence of trichomoniasis in women. *Sex Transmission Diseases* **28**(3): 326-9.
- Drassar y M.J. Hill. (1974). *Human intestinal flora*, Academic Press, London and New York pp. 193–225.
- Douglas L. C., Sanders M.E. (2008). Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *Journal of the American Dietetic Association*. **8**: 510-519.
- Dunne, C.,L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M.M. Quigley, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan y J.K. Collins. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*. **76**:279-292.
- Dunne RL, Dunn LA, Upcroft PO, Donoghue PJ, Upcroft JA. (2003). Drug resistance in the sexually transmitted protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* **13**: 239-49.
- Ertan, P., K. Yereli, O. Kurt, I.C. Balcioglu and A. Onag. 2002. Serological levels of zinc and iron element among *Giardia lamblia* injected children in Turker *Pediatrics International*., **44**:286-288.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. y Ishizaki A., (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Reviews*. **24**:85-106.
- Eschenbach D. A., (2001). *Infectious vaginitis de Gynecology and Osetrecs on CD-ROM*, Ciarra J. J. Sin país. Lippincott Williams & Wilkins.

- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B.L. Seymour, K. J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M., y Holmes, K. K., (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal woman and woman with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* **27**:251-256.
- FAO/OMS. (1992). Informal consultation on intestinal protozoal infections. México DF:OPS; (WHO/CDI/IPI/92.2).
- FAO/OMS (2001). Consulta Experta en Evaluación de las Propiedades de la Salud y Nutrición de los Probióticos en Alimentos Incluuyendo Leche en polvo con bacterias ácido lácticas vivas, Octubre.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluaction of probiotics in foofs Disponible en: <http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood-probio-en.stm>.
- Farthing MJG, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA (1986). Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *American Journal of Clinical Nutrition*; **43**:395–405.
- Farthing MJG. (1996). Giardiasis. *Gastroenterology Clinical North American*. **25**:493-515.
- Faubert G. (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Review* **13**:35-54.
- Femia, A. P., C. Luceri, P. Dolara, A. Giannini, A. Biggeri, M. Salvadori, Y. Clune, K. J. Colli, M. paglieani y C. Caderni. (2002). Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. **23**:1953-1960.



- Fooks L. J. y Gibson G.R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. **88**:539-549.
- Fuller R., Gibson GR. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal Gastroenterology Supplement*. **222**:28-31.
- Furness BW, Beach MJ, Roberts JM. (2000). Giardiasis surveillance- United States, 1992- 1997. *Morb Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ*; **49** (SS-7):1-16.
- Gamiño-Aroyo A. E., Anaya-Velazquez F. y Padilla-Vaca F- (2004). Servicio social profesional en investigación. Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.
- Garber GE, Lemchuk-Favel L (1989). Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Canadian Journal Microbiology* **35**: 903-09.
- Garber GE, Lemchuk-Favel L. (1990). Association of Production of Cell Detaching Factor With the Clinical Presentation of *Trichomonas vaginalis*. *Journal Clinical Microbiology* **28**(11): 2415-17.
- Garber GE, Lemchuk-Favel L, Rousseau R. (1991) Effect of beta-estradiol on production of the celldetaching factor of *Trichomons vaginalis*. *Journal Clinical Microbiology*. **29**:1847-9.
- Gardner TB, Hill DR. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Review* **14**:114-128.
- Gendrel D, Treluyer JM, Richard-Lenoble D. (2003). Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundam Clinical Pharmacology* **17**:189-197.

- Gilman RH, Marquis GS, Miranda E, Vestegui M, Martinez H. (1988) Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet* **1**: 343–345.
- Gold D, Ofek I. (1992). Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces requirement for energy and serum constituents. *Parasitology* **105**:55-62.
- González-Martínez B.E., Gómez-Treviño Maribel y Jiménez-Salas Zacarías, (2005). Bacteriocinas de probióticos: Característica, propiedades antibacterianas y modos de acción. Facultad de Salud Pública y Nutrición y Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. *Mundo alimentario*, Nov/Dic., 14-19.
- Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. (2003). Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. *American Journal Tropical Medical Hygiene* **68**:228–232.
- Gram IT, Macaluso M, Churchill J, Stalsberg H. (1992). *Trichomonas vaginalis* and *Human papillomavirus* Infection and Incidence of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade III. *Cancer Causes Control* **3**:231-36.
- Grant J, Mahanty S, Khadir A, MacLean JD, Kokoskin E y Yeager B. (2001). Wheat germ supplement reduces cyst and trophozoite passage in people with giardiasis. *American Journal Tropical Medical Hygiene* **65**:705-710.
- Gretchen Vogel. (2008). Deaths Prompt a Review of Experimental Probiotic Therapy. *Science*, Volume. 319 no. 5863 p. 557.
- Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. (1993). Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *American Journal Epidemiology* **137**:577-584.

- Grossman JH, Galask RP. (1990). Persistent vaginitis caused by metronidazole-resistant trichomonas. *American Journal of Obstetric and Gynecology* **76**: 521-2.
- Guarner F. (2002). El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana *Nutritional Hospital* **17**(2):7-10.
- Harmsen H.J.M., A.C.M. Wilderboer-Veloo G.C. Raangs, A.A. Wagendorp N.Klijn, J.G. Bindels, and G.W. Welling. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*. **30**:61-67.
- Hawrelak J. (2003). Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Alternative Medicine Review*; **8**:129-142.
- Heerklotz H., Wieprecht, T., Seelig, J. (2004). Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR, *Journal of Physical Chemical*. **108**:4909-4915,
- Heine P, McGregor JA. (1993). *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clinical obstetrics and gynaecology* **36**:137-44.
- Heller F, Duchmann R. (2003). Intestinal flora and mucosal immune responses. *International Journal Medical Microbiology* **293**:77-86.
- Hertzler S.R. and Clancy S.M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* **103**: 582-587.
- Hill DR. (1993). Giardiasis Issues in diagnosis and management. *Infection Diseases Clinical North American* **7**:503-525.

- Hill Gaston JS, Lillicrap MS. (2003). Arthritis associated with enteric infection. Best Practice and Research. Clinical Rheumatology **17**:219-239.
- Hillier S. L. Krohn M. A., Rabe L. K., Klebanoff S. J. y Eschenbach D. A. (1993). The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant woman. Clinical Infectious Diseases **16**(Suppl 4): S273-281.
- Hoffmann, K. (1966). Untersuchungen über die Zusammensetzung der Stuhlflora während eines langdauernden Ernährungsversuches mit kohlenhydratreicher, mit fettreicher und mit eiweißreicher Kost (Studies on the composition of the faecal flora during a long-term test with high-carbohydrate, high-fat, and high-protein diets). Zentrablatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Series A **192**:500-508.
- Honigberg BM, Brugerolle G. (1990). Structure. En: Honigberg BM, editor. Trichomonads parasitic in humans. New York: Springer-Verlag. Pp 5-35.
- Hynie J., Peter R., Vesely K. (1960). Pseudo cervical blockade by trichomonosis. International Journal Fertil **5**:66-70.
- Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanauke P., Koivula T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. Pediatrics **88**: 90-97.
- Isolauri E., Kaila M., Mykkanen H., Ling WH., Salminen S. (1994). Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. Digestive Diseases Society; **39**:2595-2600.
- Isolauri E., Y. Siitas, P. Kanlaanpää, H. Arvilommi y S. Salminen. (2001). Probiotics: effects on immunity. American Journal Clinical Nutrition **73**(Suppl 1):444S-450S.

- Jaminson JH, Kaplan DW, Eagar R, Douglas JR. (1995). Spectrum of genital human papillomavirus infection in female adolescent population. *Sex Transmission Diseases* **22**:236-43.
- Jarecki-Black JC., Lushbaugh WB., Golosov I. (1998). *Trichomonas vaginalis*. Preliminary characterization of a sperm motility inhibiting factor. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. **18**:484-6.
- Jong E. (2002). Intestinal parasites. *Primary Care Clinical Office Practice* **29**:857-877.
- Joyner JL, Douglas JM, Raysdale S, Forter M, Judson FM. (2000). Comparative prevalence of infection with *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases. *Sex Transmission Diseases* **27**(5):236-40.
- Kaloud H y Stögmann W, (1968). Eine Bifidum-Milchnahrung im klinischen Versuch. *Archive. Kinderheilkunde* **177**:1-8.
- Kane PO, McFadzean JA, y Squires S. (1961). Absorption and excretion of metronidazole. Part II. Studies on primary failures. *British Journal Venereal Diseases*. **37**: 276-7.
- Kappus KD, Lundgren RG, Juranek DD, Roberts JM, Spencer HC. (1994). Intestinal Parasitism in the United States: Update on a continuing problem. *American Journal Tropical Medical Hygiene* **50**:705-713.
- Keith CL, Radecki SV, Lappin MR. (2003). Evaluation of fenbendazole for treatment of *Giardia* infection in cats concurrently infected with *Cryptosporidium parvum*. *American Journal Veterinary Research*. **64**:1027-1029.

- Kilic E, Yazar S, (2004). Saraymen R. Responsiveness of total content changes of magnesium and zinc status in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Biology Trace Element Research*. **96**:153-158.
- Klebanoff S. J. y Coombs R. W. (1991). Viridicial effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: posible role in heterosexual transmission. *The Journal of Experimental Medicine* **174**: 282 -292.
- Klein Günter, Alexander Pack, Christine Bonaparte and Gerhard Reuter. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **41**(2):103-125.
- Klupsch H.J. (1984). *Fermented Milk Products, Beverages and Desserts* (in German). Gelsenkirchen, Germany: Verlag Thomas Mann.
- Kon VB, Papadimitriou JM, Robertson TA, Warton A. (1988). Quantitation of concanavalin A and wheat germ agglutinin binding by two strains of *Trichomonas vaginalis* of differing pathogenicity using gold particle-conjugated lectins. *Parasitology Research* **75**:7-13.
- Korner B, Jensen HK. (1976). Sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole, tinidazole and nifuratel *in vitro*. *British Journal Venereal Diseases*. **52**: 404.
- Krieger JN. (1984). Prostatitis syndromes: pathophysiology, differential diagnosis and treatment. *Sex Transmision Diseases*. **11**:100-12.
- Kurnatowska A. (1969). Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* Donne. *Wiad Parazytol* **15**:399-401

- Laga M, Nzila N, Goeman J. (1991). The interrelationship of sexually transmitted Diseases and HIV infection: implications for the control of both epidemics in Africa. *AIDS* **5** (Suppl 1): S55-S63.
- Lane S, y Lloyd D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Review Microbiology*. **28**:123-47.
- Le Leu, R. K., I. L. Brown , Y. Hu, A. R. Bird, M. Jackson, A. Esterman y G. P. Young. (2005). A symbiotic combination of resisrant starch and *Bifidocaterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damagen cell in rat colon. *Journal Nutriology*. **135**: 996- 1001.
- Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. (2002). Microbial agents associated with waterborne. *Diseases Critical Review Microbiology* **28**:371-409.
- Legator MS., Connor TH., Stockel M. (1975). Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. *Science.*, **188**: 1118-1119.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux J, Grain J, Honigberg BM, (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *Journal Protozool* **27**:37–58.
- Lilly DM, Stillwell RH. (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. **147**:747-748.
- Lo M, Reid M, Brokenshine M. (2002). Resistance of *Trichomonas vaginalis* infections to metronidazole in Auckland sexual health clinics: report of two cases. *Medical Journal* **115** (1160):147.
- Lossick JG, Kent HL. (1991). Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. *American Journal Obstetric and Gynecology* **165**:1217-22

- Lunn PG, Erinoso HO, Northrop-Clewes CA, Boyce SA. (1999). *Giardia intestinalis* is unlikely to be a major cause of the poor growth of rural Gambian infants. *Journal Nutriology* **129**:872-877.
- Madigan MT. (2005). Imagen tomada de *Microbial Interactions with Humans*, Brock *Biology of Microorganisms*.
- Macfarlane, G.T. and J.H. Cummings (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *British Medical Journal*. **318**: 999-1003.
- Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T: (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition*; **20**:333- 339.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega YR, Sterling CR. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Review*. **10**:67-85.
- Marteau, P., P. Seksik y R. Jian. (2002). Probiotics and health: new facts and ideas *Current Opinion in Biotechnology*. **13**:486-489.
- Martin RD, Kaufman RH, Burns M. (1967). *Trichomonas vaginalis*: a statistical evaluation of diagnostic methods. *American Journal Obstetric and Gynecology* **87**:1024-7.
- Martinez V, Caume E. (2001). Metronidazole: Pharmacology. *Ann Dermatol Venereol* **28**(89): 903-9.
- Martínez, M. J. (2001). Agentes probióticos y patología intestinal. *An Esp Peditry* **54**(Supl3):15-16.



- Mateos JA. (2002). Bacterias y salud. Jornadas de Alimentos Funcionales (23-24 de mayo de Centre Innovació. Fundació Bosch i Gimpera. Universidad de Barcelona.
- Mc Cann JS. (1974). Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis. *British Journal of venereal diseases*. **50**:450-2.
- Meingassner JG, Thurner J. (1979). Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazole. *Antimicrob Agents Chemother*. **15**:254-57.
- Meri T, Jokiranta T, Suhonen L, Meri S. (2000). Resistance of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *Journal Clinical Microbiology*. **38**: 763-7.
- Minkoff H, Grunebaum AN, Schwarz RH, Feldman J, Cummings M, Crumbleholm W, (1984). Risk factors for prematurity and premature rupture of membrane: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *American Journal Obstetric Gynecology*. **150**: 965-72.
- Mitsuoka T., (1984). Taxonomy and ecology of bifidobacteria, bifidobacteria microflora. **3**(1): 11-28.
- Mitsuoka, T., Y. Hata, and Y. Takahashi. (1986). Effects of long term intake of neosugar on intestinal flora and serum lipids. In: 3rd Neosugar Conference, Tokyo.
- Moitinho M, Bértoli, M, Guedes TA, Ferreira S. (1999). Influence of refrigeration and formalin on the floatability of *Giardia duodenalis* cysts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:571-574.

- Moll GN, EVD Akker, HH Hauge, J Nissen-Meyer, IF Nes, WN Konings and AJ Driessen (1999). Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *Journal Bacteriology*. **181** (16): 4848-4852.
- Moreau, M.C., Gaboriau-Routhiau, V., (2001). Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue.
- Moro, E., (1900). Ueber den *Bacillus acidophilus* n. spec. Ein Beitrag zur Keuntness dernormalen Darmbakterien des Sauglings, *Jb. Kinderhdkk*, **52**: 38
- Moya-Camarena SY, Sotelo N, Valencia ME. (2002). Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican children. *Am Journal Tropical Medic Hygiene* **66**:255-259.
- Muller M. (1986). Reductive activation of nitroimidazoles in aerobic microorganisms. *Biochemical Pharmacology* **35**:37-41.
- Muller M. (1987). Hydrogenosomes of trichomonad flagellates. *Acta Univ Carol (Biol)* 30:249- 60.
- Muller M. (1992). Resistance to 5-nitroimidazoles in pathogenic microorganisms. En: Breccia A, Cavalleri B, Adams GE, editores. *Nitroimidazoles*. New York: Plenum; 133- 48.
- Muller M, Lossick JG, Gorrell TE. (1988). *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal tricomoniasis. *Sex Transm Disceases* **15**: 17-24.

- Muniz-Junqueira MI, Queiróz EFO. (2002). Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. Review Society Brasil Medical Tropical; **35**:133-141.
- Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. (2004). Quantitative Analysis of Diverse Lactobacillus Species Present in Advanced Dental Caries. Journal Clinical Microbiology, Vol.42,**7**: 3128-3136).
- Nain CK, Dutt P, Vinayak VK. (1991). Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. Ann Tropical Medical Parasitology **85**:515-522.
- Navarrete-Vázquez G, Yépez L, Hernández-Campos A, Tapia A, Hernández-Luis F, Cedillo R, (2003). Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. Bioorg Medical Chemical **11**:4615-4622.
- Neira O., Patricia (2005). frecuencia de infección por trichomonas vaginalis en atención primaria de salud. *Revista chilena. Obstetric and. gynecology*. vol.70, n.3 ISSN 0717-7526.Similaridad:0.306264
- Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr LL, Lorntz B, Lima AA, (2002). Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. American Journal Tropical Medical Hygiene; **6**:590-593.
- Ninomiya K, Matsuda K, Kawahata T, Kanaya T, Kohno M, Katakura Y, Asada M, Shioya S. (2009). Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the growth and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium longum* cultivated under anaerobic conditions. Journal Bioscience and Bioenginer. **107**(5):535-7.

- Novotny TE, Hopkins RS, Shillam P, Janoff EN. (1990). Prevalence of *Giardia lamblia* and risk factors for infection among children attending day-care facilities in Denver. *Public Health Reports* **105**:72-75.
- O'Handley RM, Olson ME, McAllister TA, Morck DW, Jelinski M, Royan G, (1997). Efficacy of fenbendazole for treatment of giardiasis in calves. *American Journal Veterinary Research* **58**:384-8.
- Okhuysen PC. (2001). Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clinical Infection Diseases* **33**:110-114.
- Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Rodríguez G, Clavel A. (2003). Serum mineral levels in children with intestinal parasitic infection. *Digestive Disease* **21**:258-261.
- Ondarza Benítez, M. A. (2007). Universidad Autónoma de Tamaulipas. Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Rodhe temas actuales de alimentos y nutrición cd. Reynosa, Tamaulipas., Actualidades Sobre Prebióticos y Probióticos.
- Organización Mundial de la Salud. (OMS) 1995. Salud sexual y reproductiva. Washington, DC. OPS.OMS. Comunicación para la salud (**8**): 17-8.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 1997. Amoebiasis-An expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra, Abril.
- Ontiveros Moreno L.H., Morales Vallarta M., Barrón González M.P., (2008). Efecto del liofilizado del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* sobre el enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Orla-Jensen S.: (1924). Classification des bactéries lactiques. *Lait*, , **4**, 468-474.

Orla-Jensen. (1939). The ripening process of hard cheese. Proc. 3rd International Congress. Microbiology.

Orla Jensen, S., Olsen, E., and Geill, T. (1945). Senility and intestinal flora. Kgl. Danske Vidensk. Selskab. Biology. Skifter **3**:3-38.

Orrhage K., Sjöstedt S., Nord C.; (2000). “Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil”; Journal. Antimicrobial Chemotherapy; **46**: 603-611.

Ortega YR, Adam RD. (1997). *Giardia*: Overview and Update. Clinical Infection Disceases; **25**:545-550.

Ortega YR, Bonavia D. (2003). *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient Peruvians. Journal Parasitology 89:635–636.

Ouwehand A. C. (1999). La microflora fecal normal no afecta la adhesión de las bacterias probióticas *in vitro*: Federation Europea of Microbiology Science Microbiology Letters **177** (1): 35-38.

Ouwehand A. C., S. Salminen E. Isolauri. (2002). Probiotics : an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek. **82**:279-289.

Padilla-Raigoza N. (1999). Amibiasis en edad pediátrica, cuarta reunión de expertos en amibiasis. SEARLE, primera edición 47-55.

Pant A.R, Graham SM, Allen SJ (1996):. *Lactobacillus GG* and acute diarrhoea in young children in the tropics. Journal Tropical Medical **42**: 162-165.

- Perdigon, G., Fuller, R. (Eds.), Probiotics 3: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 69–114.
- Pérez-Leonard Heidy. (2007). Lactobacillus Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales. BioTecnología, Vol. 11 No. 1
- Perez PF, Minnaard J, Rouvet M, Knabenhans C, Brassart D, De Antoni GL, (2001). Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli*: an *in vitro* study. Applied Environment Microbiology; **67**:5037-5042.
- Pérez-Tamayo, R. 1986. Pathology of amebiasis. En: Amebiasis. Martínez-Palomo, ed. Elsevier, Amsterdam. pp 45-94.
- Peterson KM, Alderete JF. (1982) Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. Infection Immunology **37**:755-62.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clinical Microbiology Review **11**: 300-17.
- Pindak FF, Mora de Pindak M, Hide BM, Gardner JR. (1998). Acquisition and retention of viruses by *T. vaginalis*. Genitourinary Medical **3**:336-71.
- Podolsky, S. (1998). Cultural divergence: Elie Metchnikoff's *Bacillus bulgaricus* therapy and his underlying concept of health. Bulletin of History Medical. **72**:1-27.
- Price M, Zimba D, Hoffman IF. (2003), Addition of treatment for trichomoniasis to syndromic management of urethritis in Malawi: a randomized clinical trial. Sex Transmission Diseases **30**:516-22.

- Procop GW. (2001). Gastrointestinal Infections. *Infection Diseases Clinical North American* **15**:1073-1108.
- Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection Immunology* 1995; 63:3388-95.
- Puertollano E., Puertollano MA, Cruz Chericorro L., Alvarez de Cienfuegos G. y de Pablo MA., 2005. Acción de los concentrados proteicos de *Lactobacillus plantarum* sobre una línea leucémica humana. Universidad de Jaén. Área de microbiología, 23071.
- Quon DV, D'Olivera CE, Johson PJ. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resist. *Recent Res. Devel. Microbial.* **9**:97ant *T. vaginalis*. *Proc Natl Acad Society USA* 1992; 89:4402-6.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S. and Mendzhitov R., 2004 Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**: 229-241.
- Ramos- Cormenzana, A., S. Fuentes, R. Ferrer-Cebrian y M. Monteoliva-Sánchez. 2005. Probiotics and biotherapy-127.
- Rasic, J. L., 1983. The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria In nutrition and health. *European Dairy Journal* **4**, 80-88.
- Rasic, JL, Kurmann, JA., (1998). Bifidobacteria and their Role. *Microbiological, Nutritional-Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. Experientia Suppl.* **39**: 1-295.

- Rasic, JL, Kurmann, JA (1983). Bifidobacteria and their Role. Microbiological, Nutritional-Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. *Experientia Suppl.* **39**: 1-295.
- Rastall, R.A. (2004) Bacteria in the gut; friends and foes and how to alter the balance, *Journal Nutritional*; **134**: 2022S-2026S.
- Raza S, Graham SM, Allen SJ, Sultana S, Cuevas L, Hart CA (1995). *Lactobacillus GG* promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatrics Infecton Discease Journal* **14**: 107-111.
- Reid, G. (2004). When microbe meets human. *Clinical infectious Disceases* **39**(6):827-830.
- Reid, G., Burton, J. y Devillard E. (2004). The Rationale for probiotics in Female urogenital Healthcare. *Medscape General Medicine* **6**(1) 1-9.
- Robertson LJ, Gjerde B. (2001). Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal Food Prot*; **64**:1793–1798.
- Rojas L, Solano R, Sariego I. (1999). Frecuencia de Trichomonosis vaginal en mujeres supuestamente sanas. *Revista Cubana Higiene Epidemiología*; **37**(3): 66-70.
- Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. (2002). Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *Journal Infecton Disaease* **185**:1692.
- Rowland, I. R., y P. Grasso. (1975). Degradation of *N*-nitrosamines by intestinal bacteria. *Applied Enviroment. Microbiology.* **29**:7-12.



- Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH: (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **344**:1046-1049.
- Sackey ME, Weigel MM, Armijos RX. (2003). Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *Journal Tropical Pediatrics*; **49**:7-23.
- Saggiaro A. (2004). Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *Journal Clinical Gastroenterology*; **38**(Suppl 6):S104-6).
- Salminen, S., Deighton, M., and Gorbach, S., (1993). Lactic acid bacteria in health and Diseases, en: lactic acid bacteria (S. Salminen and Von Wright, E.D.S.) pp 199-225, Marcel Decker, inc. New York.
- Salminen, Seppo; Gueimonde, Miguel; Isolauri, Erika. (2005). Probiotics that modify Disease risk; *American Society for Nutritional Sciences*; 1294-1297.
- Samarawickram, N.A., D.M. Brown, J.A . Upcroft, N. Thammapalerd and P. Upcroft. (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metranizole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal Antimicrobials Hemother* **40**:833-840.
- Sánchez J.A., Coyotécatl L.L., Enríquez M.A., Mendoza E., Muñoz G., Rivera J.A., (2008) Incidencia del bacilo de Döderlein y su influencia en la presencia de otros microorganismos en el canal vaginal. Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

- Sartor RB. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel Diseases: antibiotics, probiotics, and Prebiotics. *Gastroenterology*. **126**:1620-33.
- Saurina GR, McCormack WM. (1997). Tricomoniasis in pregnancy. *Sex Transm Diseases* **24**:361-2.
- Savage, O. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review. Microbiology* **31**: 107-133.
- Savioli L, Bundy DAP, Tomkins A. (1992). Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **86**:353-4.
- Saxelin M., (1997). *Lactobacillus* GG.-human probiótico strain with through clinical documentation. *Food Review. International*. **13**(2):293-313.
- Scardovi, V., (1984). Genus Bifidobacterium Orla-Jensen 1924 - 472. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Williams, 1986, vol.1, pp.1418-1434 .
- Schaudinn, (1903). in *Euphractus sexcinctus* (armadillo) kept in captivity. *Arq. Brasil. Medicine. Veterinary. Zoo.* [online]. 2000, vol. 52, no. 3 [cited 2008 03-12], pp. 208- 209.
- Schmid G, Marcisi E, Mosure D, Secor WE, Higgins J, Moreno H. (2001). Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology Clinical. *Journal Reproduction Medical* **46**(6):545-9.
- Schnitzer RJ, Kelly DR, Leiwant B. (1950). Experimental studies in tricomoniasis. 1. The pathogenicity of trichomonad species for mice. *Journal Parasitology*; **36**: 343-49.

- Schultz M, Linde HJ, Lehn N, Zimmermann K, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J. (2003). Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *Journal Dairy Research* **70**: 165-173.
- Schwebke , J.R. y Weiss, H.( 2001). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal
- Sepp E, Tamm E, Torm S, Lutsar I, Mikelsaar M, Salminen S: (1995). Impact of a *Lactobacillus* probiotic on the faecal microflora in children with *Shigellosis*. *Microecology Ther* **23**: 74-80.
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2004). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. **99**(3): 493-501.
- Singer SM, Nash TE. (2000 b). The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *Journal Infection Disceases*; **181**:1510-1512.
- Skerk V, Schonwald S, Krhen I. (2002). Aetiology of chronic prostatitis. *International Journal Antimicrobiology Agents* **19**: 471-4.
- Smalheiser NR. (2004). Bath toys—a source of gastrointestinal infection. *New England Journal Medical* 350:521.
- Smith LM, Wang M, Zangwaill K, Yeh S. (2002). *Trichomonas vaginalis* infection in a premature newborn. *Journal Perinatology*. **22**(6) 502-3.
- Sobel JD. (1997). Vaginitis. *New England Journal Medical*; **337**: 1896-1903.
- Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV and African Americans. *Emergen Infection Diseases*. **7**:927-32.

- Tannock, G. W. (2004) A special fondness for Lactobacilli. *Applied Environment Microbiology*. **70**: 3189-3194.
- Tellez A, Winiiecka-Krusnell J, Paniagua M, Linder E. (2003). Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scand Journal Infection Diseases*; **35**:322-325.
- Ter Meuien J, Eberhardt HC, Luande J. (1992). *Human papillomavirus* (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania. *East Africa International Journal Cancer*; **51**: 515-21.
- Thompson RCA.(2000); Giardiasis as a re-emerging infectious Diseases and its zoonotic potential. *International Journal Parasitology* **30**:1259-1267.
- Tissier, H. (1900). Recherchers sur la flora intestinale normale et pathologique du nourisson. Thesis, University of Paris, Paris, France.
- Tissier, H. (1906). Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Critical Reviews of the Society for Biology* **60**:359-361.
- Tocher JH, Edwards DI. (1994). Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochemical Pharmacology*. **48**:1089-94.
- Torres MA, Uetanabaro APT, Costa AF, Alves CA, Farias LM, Bambirra EA, (2000). Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal Medical Microbiology*. **49**:209-215.
- Uproft J, Uproft P. (1998). My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays* **20**:256-263.

- Upcroft P, Upcroft JA. (2001a). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Review* **14**:150-164.
- Upcroft JA, Upcroft P. (2001b). Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1810-4.
- Valencia ME, McNeill G, Haggarty P, Moya SY, Pinelli A, Quihui L, (1995). Energetic consequences of mild *Giardia intestinalis* infestation in Mexican children. *American Journal Clinical. Nutriology* **61**:860–865.
- Van-der Weiden RMF, Van-der Meijden WI. (1990). Treatment failure in trichomoniasis and persistence of the parasite after Lactobacillus immunotherapy; two cases reports. *Europe Journal Obstetric Gynecology Reproduction Biology*. **34**:171-8.
- Vanderhoof JA, Young RJ. (1998). Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *Journal Pediatrics Gastroenterology Nutriology*. **27**:323-332.
- Viikki M, Pukkala E, Hakama M. (2000). Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol* **39**:71-5.
- Vogel, G. (2008). Deaths prompt a review of experimental probiotic therapy. *Science* **319**: 557.
- Wallace RM, Hale RB, Utz CG, Olson EP, Earlat CK. (2002). Sexually transmitted Diseases. *Clinical Infection Diseases* **34** (15):5-10.
- Wantor A, Honigberg BM. (1983). Analysis of surface saccharides in *Trichomonas vaginalis* strains with various pathogenicity levels by fluorescein-conjugated plan lectins. *Z Parasitenkd* **69**:149-59.

- Watts, DH., Fazarri, M., Minkoff, H., Hillier, S. L. Sha, B., Glesby, M., Levine, A. M., Burk, R., Palefsky, J. M., Moxley, M., Andieh- Grant, L. y Strickler, H. D. (2005). Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1-Infected and High-Risk HIV-1-Uninfected Woman. *Journal Infection Disceases* **191**(7) : 1129-1139.
- Wendel KA. (2003)Tricomoniiasis: what's new? *Curr Infection Diseases*; **5**(2): 129-34.
- Wijtzes, T., Bruggeman, M.R., Nout, M.J.R., Zwietering, M.H. (1997). A computerised system for the identification of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **38**, 65–70.
- World Health Organization ,WHO (1990). Informal Consultation on Intestinal helminth Infections. Geneva: World Health Organization, (WHO/CDS/IPI/90.1).
- World Health Organization WHO/PAHO. (1992). Informal consultation on intestinal protozoal infections. Mexico DF: OPS, (WHO/CDI/IPI/92.2).
- World Health Organization. (1997). Global Program of AIDS. Geneva
- Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I (1989). Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus SF68* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *Journal International Medical Research*. **17**: 333- 338.102.
- Yeung, P.S.M., Sanders, M.E., Kitts, C.L., Cano, R., Tong, P.S., (2002). Species-specific identification of commercial probiotic strains. *Journal. Dairy Society*. **85**: 1039–1051.

Zajac AM, LaBranche TP, Donoghue AR, Chu TC. (1998). Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental *Giardia* infection in dogs. American Journal Veterinary Research, **59**:61-63.

Zhang ZF, Beng CB. (1994). Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. International Journal Epidemiology, **23**: 682-90.

Zamora Herrera F.G., Morales Vallarta M., Barrón González M.P., (2007). Efecto del liofilizado del medio condicionado con el probiótico *Bifidobacterium sp.* Sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Material electrónico**

<http://www.CDC.com> (revisado el 11 mayo 2011)

<http://www.cdc.gov/std/> (revisado el 11 mayo 2011)

<http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood-probio-en.stm>. FAO/WHO. (2002).  
Guidelines for the Evaluation of probiotics in foofs (revisado en febrero 2011)

<http://www.graphpad.com/manuals/PrismUsersGuide.pdf> ((revisado en mayo 2011)

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2733.asp> "Comparison of early enteral nutrition  
in severe acute pancreatitis with prebiotic fiber supplementation versus standard  
enteral solution: A prospective randomized double-blind study" World Journal  
Gastroenterology (revisado en febrero 2011)

<http://www.yacult.com.mx> (revisado en septiembre 2010)

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2733.asp> (revisado en mayo 2011)



### 13. A N E X O S

```
PROBIT MuertasLcasei OF TotalLcasei WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:17:00
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLcasei OF TotalLcasei WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.203
	Tiempo transcurrido	00:00:00.235

[Conjunto\_de\_datos0]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	13	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.692	.001	1019.202	.000
	Intersección	.679	.001	905.780	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.691	.694
	Intersección	.678	.679

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

		Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	137629.565	3	.000 <sup>b</sup>

- a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.
- b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3087500	2385648	2319593.271
i 2	1.000	3087500	2737407	2824466.645
m 3	1.398	3087500	2856018	2933651.140
e 4	1.699	3087500	3036111	2989312.036
n 5	1.845	3087500	3060648	3009618.323
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	66054.729	.751
i 2	-87059.645	.915
m 3	-77633.140	.950
e 4	46798.964	.968
n 5	51029.677	.975
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup> dimen .010	.000	.000	.006	-4.340

tion1	.020	.000	.000	.010	-3.946
	.030	.000	.000	.014	-3.696
	.040	.000	.000	.019	-3.508
	.050	.000	.000	.023	-3.355
	.060	.001	.000	.028	-3.225
	.070	.001	.000	.033	-3.111
	.080	.001	.000	.038	-3.009
	.090	.001	.000	.043	-2.916
	.100	.001	.000	.049	-2.831
	.150	.003	.000	.080	-2.477
	.200	.006	.000	.119	-2.195
	.250	.011	.000	.168	-1.954
	.300	.018	.000	.230	-1.737
	.350	.029	.000	.307	-1.536
	.400	.045	.000	.405	-1.346
	.450	.069	.000	.530	-1.161
	.500	.105	.000	.694	-.980
	.550	.159	.000	.911	-.798
	.600	.243	.000	1.209	-.614
	.650	.377	.001	1.630	-.423
	.700	.599	.003	2.262	-.223
	.750	.987	.013	3.293	-.006
	.800	1.720	.059	5.236	.236
	.850	3.288	.318	10.136	.517
	.900	7.428	1.789	34.394	.871
	.910	9.044	2.474	50.709	.956
	.920	11.201	3.380	80.495	1.049
	.930	14.171	4.567	139.520	1.151
	.940	18.427	6.132	268.779	1.265
	.950	24.863	8.250	590.623	1.396
	.960	35.350	11.262	1545.939	1.548
	.970	54.487	15.930	5230.193	1.736
	.980	96.845	24.338	27435.886	1.986
	.990	239.753	45.295	391858.129	2.380

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

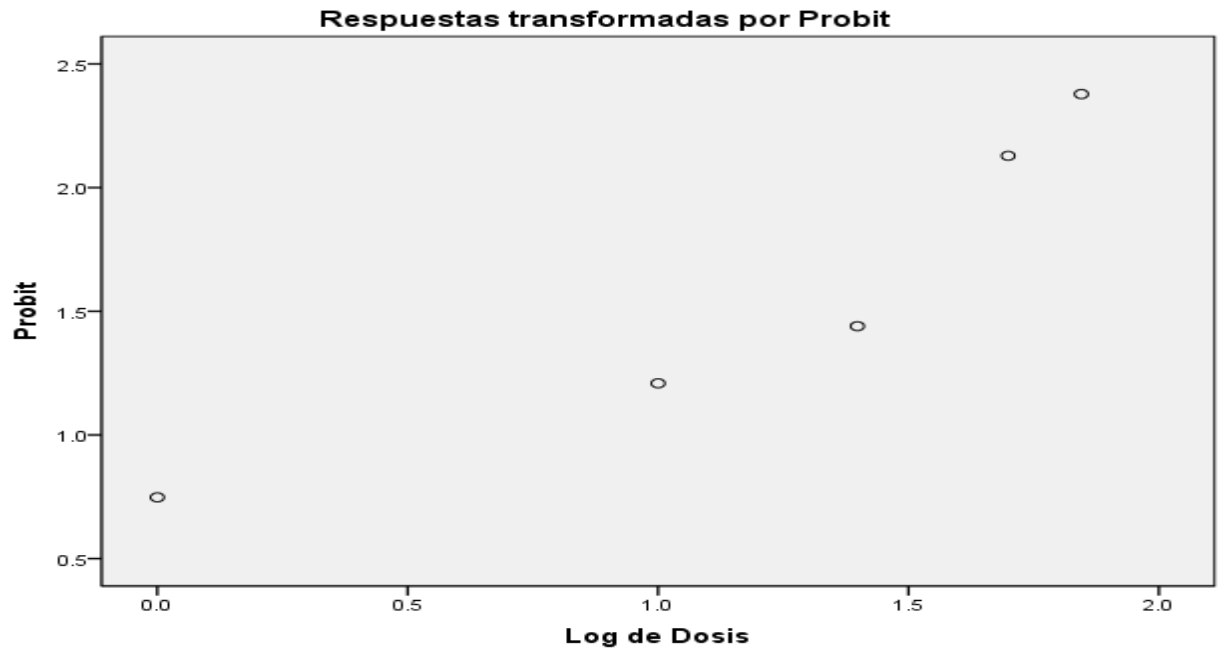
b. Base del logaritmo = 10.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>		
.010	-14.835	-2.231
.020	-13.649	-1.992
.030	-12.897	-1.840
.040	-12.331	-1.726
.050	-11.871	-1.633
.060	-11.479	-1.554
.070	-11.136	-1.484
.080	-10.829	-1.422
.090	-10.550	-1.365
.100	-10.292	-1.313
.150	-9.228	-1.096
.200	-8.384	-.923
.250	-7.659	-.773
.300	-7.010	-.639
.350	-6.409	-.513
dimen sion1		
.400	-5.839	-.393
.450	-5.289	-.275
.500	-4.749	-.159
.550	-4.211	-.040
.600	-3.666	.082
.650	-3.107	.212
.700	-2.522	.355
.750	-1.901	.518
.800	-1.229	.719
.850	-.498	1.006
.900	.253	1.536
.910	.393	1.705
.920	.529	1.906
.930	.660	2.145
.940	.788	2.429
.950	.916	2.771

.960	1.052	3.189
.970	1.202	3.719
.980	1.386	4.438
.990	1.656	5.593

- Se utiliza un factor de heterogeneidad.
- Base del logaritmo = 10.



```

PROBIT MuertasBLongum OF TotalBLongum WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

```

**Análisis probit****Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:21:11
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasBLongum OF TotalBLongum WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.203
	Tiempo transcurrido	00:00:00.264

[Conjunto\_de\_datos0]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0

La transformación log no se puede realizar	0
Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	19	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.982	.002	649.456	.000
Intersección	1.359	.001	1351.898	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.979	.985
Intersección	1.358	1.360

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	26492.301	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3087500	2829861	2818657.420
i 2	1.000	3087500	3035722	3057845.550
m 3	1.398	3087500	3083333	3077793.692



e 4	1.699	3087500	3087500	3083701.468
n 5	1.845	3087500	3087500	3085160.537
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	11203.580	.913
i 2	-22123.550	.990
m 3	5539.308	.997
e 4	3798.532	.999
n 5	2339.463	.999
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup> .010	.000	.000	.004	-3.751
.020	.000	.000	.006	-3.474
.030	.001	.000	.007	-3.298
.040	.001	.000	.009	-3.165
dimen .050	.001	.000	.011	-3.058
sionl .060	.001	.000	.013	-2.966
.070	.001	.000	.014	-2.885
.080	.002	.000	.016	-2.813
.090	.002	.000	.018	-2.748
.100	.002	.000	.020	-2.688

.150	.004	.000	.029	-2.438
.200	.006	.000	.040	-2.240
.250	.009	.000	.053	-2.070
.300	.012	.000	.067	-1.917
.350	.017	.000	.085	-1.775
.400	.023	.000	.105	-1.641
.450	.031	.001	.130	-1.511
.500	.041	.001	.160	-1.383
.550	.056	.002	.197	-1.255
.600	.075	.004	.244	-1.125
.650	.102	.007	.305	-.991
.700	.141	.012	.386	-.849
.750	.201	.022	.500	-.697
.800	.297	.045	.672	-.527
.850	.470	.100	.959	-.328
.900	.834	.265	1.557	-.079
.910	.958	.332	1.766	-.019
.920	1.114	.422	2.038	.047
.930	1.315	.544	2.407	.119
.940	1.582	.714	2.933	.199
.950	1.954	.955	3.745	.291
.960	2.504	1.308	5.133	.399
.970	3.397	1.849	7.877	.531
.980	5.095	2.763	14.744	.707
.990	9.652	4.789	43.055	.985

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

#### Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>		
.010	-7.264	-2.442
dimen		
.020	-6.751	-2.251
sionl		
.030	-6.426	-2.129
.040	-6.181	-2.038

.050	-5.982	-1.963
.060	-5.813	-1.900
.070	-5.664	-1.844
.080	-5.531	-1.795
.090	-5.411	-1.749
.100	-5.299	-1.708
.150	-4.839	-1.535
.200	-4.474	-1.397
.250	-4.160	-1.278
.300	-3.879	-1.172
.350	-3.619	-1.073
.400	-3.372	-.978
.450	-3.134	-.887
.500	-2.899	-.797
.550	-2.666	-.706
.600	-2.428	-.613
.650	-2.184	-.516
.700	-1.928	-.413
.750	-1.652	-.301
.800	-1.349	-.173
.850	-1.000	-.018
.900	-.577	.192
.910	-.479	.247
.920	-.375	.309
.930	-.265	.381
.940	-.146	.467
.950	-.020	.573
.960	.117	.710
.970	.267	.896
.980	.441	1.169
.990	.680	1.634

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```
PROBIT MuertasLlactis OF TotalLlactis WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados	26-may-2011 19:23:03	
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis	PROBIT MuertasLlactis OF TotalLlactis WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).	
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.172
	Tiempo transcurrido	00:00:00.235

[Conjunto\_de\_datos0]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	14	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.475	.001	662.189	.000
	Intersección	1.022	.001	1225.477	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.473	.476
	Intersección	1.022	1.023

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

		Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	156367.070	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número		Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT	d 1	.000	3087500	2685555	2614188.316
	i 2	1.000	3087500	2737037	2879995.320
	m 3	1.398	3087500	2954629	2945714.737
	e 4	1.699	3087500	2989358	2983357.734

n s i o n l	5	1.845	3087500	3055092	2998418.443
----------------------------	---	-------	---------	---------	-------------

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT dimen sionl	d 1	71366.684	.847
	i 2	-142958.320	.933
	m 3	8914.263	.954
	e 4	6000.266	.966
	n 5	56673.557	.971

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup> dimen sionl	.010	.000	.	-7.057
	.020	.000	.	-6.483
	.030	.000	.	-6.118
	.040	.000	.	-5.844
	.050	.000	.	-5.621
	.060	.000	.	-5.431
	.070	.000	.	-5.265
	.080	.000	.	-5.116
	.090	.000	.	-4.980
	.100	.000	.	-4.855
	.150	.000	.	-4.339
.200	.000	.	-3.928	
.250	.000	.	-3.576	

.300	.001	.	.	-3.260
.350	.001	.	.	-2.967
.400	.002	.	.	-2.688
.450	.004	.	.	-2.419
.500	.007	.	.	-2.155
.550	.013	.	.	-1.890
.600	.024	.	.	-1.621
.650	.045	.	.	-1.343
.700	.089	.	.	-1.049
.750	.185	.	.	-.733
.800	.416	.	.	-.381
.850	1.071	.	.	.030
.900	3.517	.	.	.546
.910	4.687	.	.	.671
.920	6.404	.	.	.806
.930	9.026	.	.	.955
.940	13.241	.	.	1.122
.950	20.501	.	.	1.312
.960	34.260	.	.	1.535
.970	64.413	.	.	1.809
.980	149.092	.	.	2.173
.990	559.652	.	.	2.748

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	.	.
.010	.	.
.020	.	.
.030	.	.
dimen	.	.
sion1	.	.
.040	.	.
.050	.	.
.060	.	.
.070	.	.



.080	.	.
.090	.	.
.100	.	.
.150	.	.
.200	.	.
.250	.	.
.300	.	.
.350	.	.
.400	.	.
.450	.	.
.500	.	.
.550	.	.
.600	.	.
.650	.	.
.700	.	.
.750	.	.
.800	.	.
.850	.	.
.900	.	.
.910	.	.
.920	.	.
.930	.	.
.940	.	.
.950	.	.
.960	.	.
.970	.	.
.980	.	.
.990	.	.

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```

PROBIT MuertasLacido OF TotalLacido WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

```

**Análisis probit****Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:26:23
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLacido OF TotalLacido WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.187
	Tiempo transcurrido	00:00:00.233

[Conjunto\_de\_datos0]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	16	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.487	.001	605.557	.000
	Intersección	1.197	.001	1322.083	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.485	.488
	Intersección	1.196	1.197

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	166761.381	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT	d 1	.000	3087500	2785714	2730150.748
	i 2	1.000	3087500	2869642	2945006.795
	m 3	1.398	3087500	2926785	2994095.473

e 4	1.699	3087500	3062857	3021108.109
n 5	1.845	3087500	3077500	3031630.967
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	55563.252	.884
i 2	-75364.795	.954
m 3	-67310.473	.970
e 4	41748.891	.978
n 5	45869.033	.982
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup> .010	.000	.	.	-7.237
.020	.000	.	.	-6.677
.030	.000	.	.	-6.321
.040	.000	.	.	-6.054
.050	.000	.	.	-5.837
dimen .060	.000	.	.	-5.652
sionl .070	.000	.	.	-5.489
.080	.000	.	.	-5.344
.090	.000	.	.	-5.212
.100	.000	.	.	-5.090
.150	.000	.	.	-4.587
.200	.000	.	.	-4.187

.250	.000	.	.	-3.843
.300	.000	.	.	-3.535
.350	.001	.	.	-3.249
.400	.001	.	.	-2.978
.450	.002	.	.	-2.716
.500	.003	.	.	-2.458
.550	.006	.	.	-2.200
.600	.012	.	.	-1.937
.650	.022	.	.	-1.666
.700	.042	.	.	-1.381
.750	.085	.	.	-1.072
.800	.187	.	.	-.729
.850	.469	.	.	-.329
.900	1.495	.	.	.175
.910	1.978	.	.	.296
.920	2.681	.	.	.428
.930	3.746	.	.	.574
.940	5.443	.	.	.736
.950	8.334	.	.	.921
.960	13.749	.	.	1.138
.970	25.441	.	.	1.406
.980	57.652	.	.	1.761
.990	209.301	.	.	2.321

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

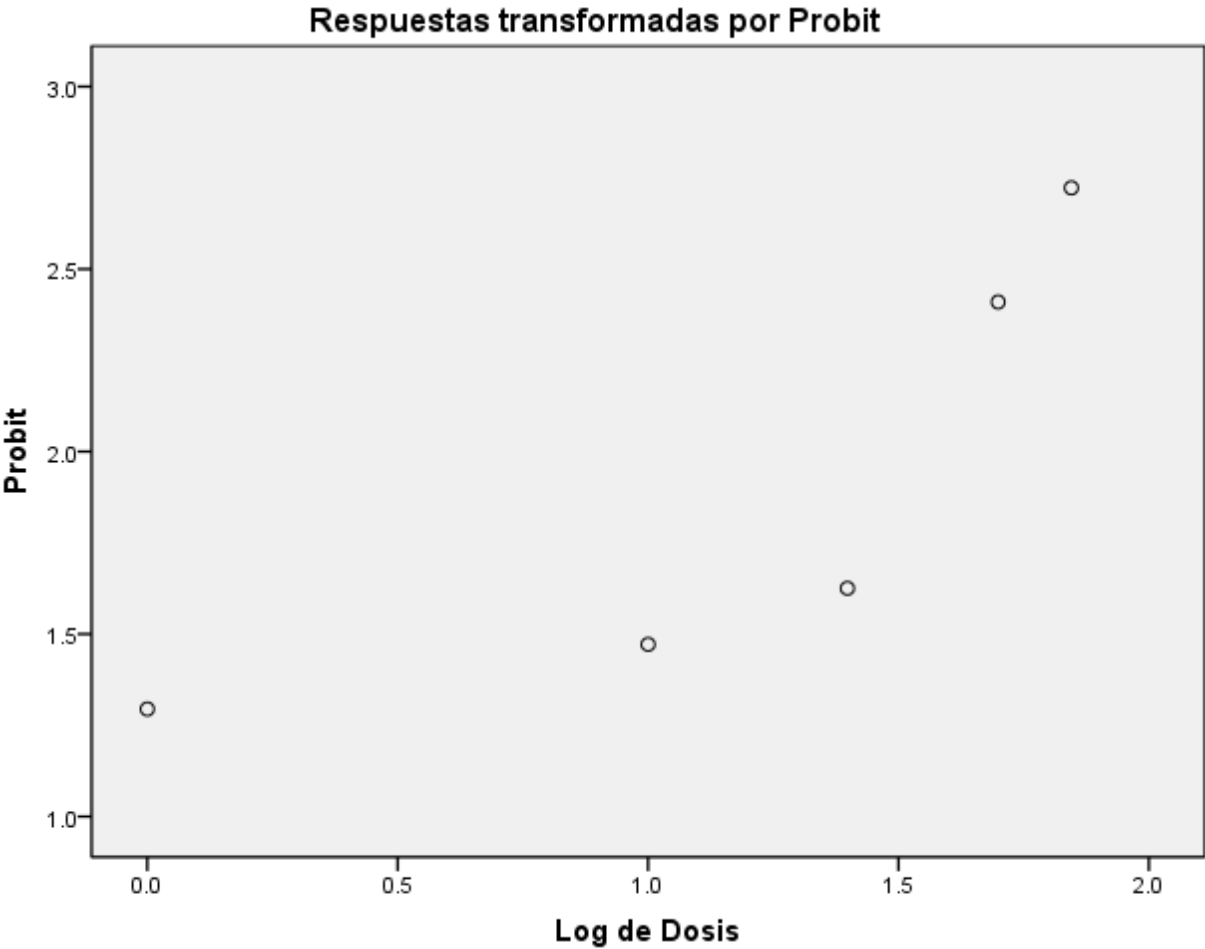
b. Base del logaritmo = 10.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> .010	.	.
.020	.	.
dimen .030	.	.
sion1 .040	.	.
.050	.	.
.060	.	.

.070	.	.
.080	.	.
.090	.	.
.100	.	.
.150	.	.
.200	.	.
.250	.	.
.300	.	.
.350	.	.
.400	.	.
.450	.	.
.500	.	.
.550	.	.
.600	.	.
.650	.	.
.700	.	.
.750	.	.
.800	.	.
.850	.	.
.900	.	.
.910	.	.
.920	.	.
.930	.	.
.940	.	.
.950	.	.
.960	.	.
.970	.	.
.980	.	.
.990	.	.

- a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.  
b. Base del logaritmo = 10.





```
PROBIT MuertasLplan OF TotalLplan WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:27:45
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLplan OF TotalLplan WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.188
	Tiempo transcurrido	00:00:00.187

[Conjunto\_de\_datos0]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0

La transformación log no se puede realizar	0
Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	17	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.289	.001	347.020	.000
Intersección	1.446	.001	1423.021	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.287	.290
Intersección	1.445	1.447

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	90462.919	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3087500	2889285	2858821.709
i 2	1.000	3087500	2916071	2959709.735
m 3	1.398	3087500	2966071	2988135.329

e 4	1.699	3087500	2978036	3005984.029
n 5	1.845	3087500	3076964	3013631.384
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	30463.291	.926
i 2	-43638.735	.959
m 3	-22064.329	.968
e 4	-27948.029	.974
n 5	63332.616	.976
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
	PROBIT <sup>a</sup>			
	.010	.000	.	-13.071
	.020	.000	.	-12.126
	.030	.000	.	-11.527
	.040	.000	.	-11.076
	.050	.000	.	-10.710
	.060	.000	.	-10.397
dimen	.070	.000	.	-10.124
sion1	.080	.000	.	-9.879
	.090	.000	.	-9.656
	.100	.000	.	-9.451
	.150	.000	.	-8.602
	.200	.000	.	-7.927
	.250	.000	.	-7.348

.300	.000	.	.	-6.827
.350	.000	.	.	-6.346
.400	.000	.	.	-5.888
.450	.000	.	.	-5.446
.500	.000	.	.	-5.011
.550	.000	.	.	-4.575
.600	.000	.	.	-4.133
.650	.000	.	.	-3.676
.700	.001	.	.	-3.194
.750	.002	.	.	-2.674
.800	.008	.	.	-2.095
.850	.038	.	.	-1.420
.900	.269	.	.	-.570
.910	.431	.	.	-.365
.920	.720	.	.	-.142
.930	1.267	.	.	.103
.940	2.379	.	.	.376
.950	4.880	.	.	.688
.960	11.353	.	.	1.055
.970	32.054	.	.	1.506
.980	127.389	.	.	2.105
.990	1121.036	.	.	3.050

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

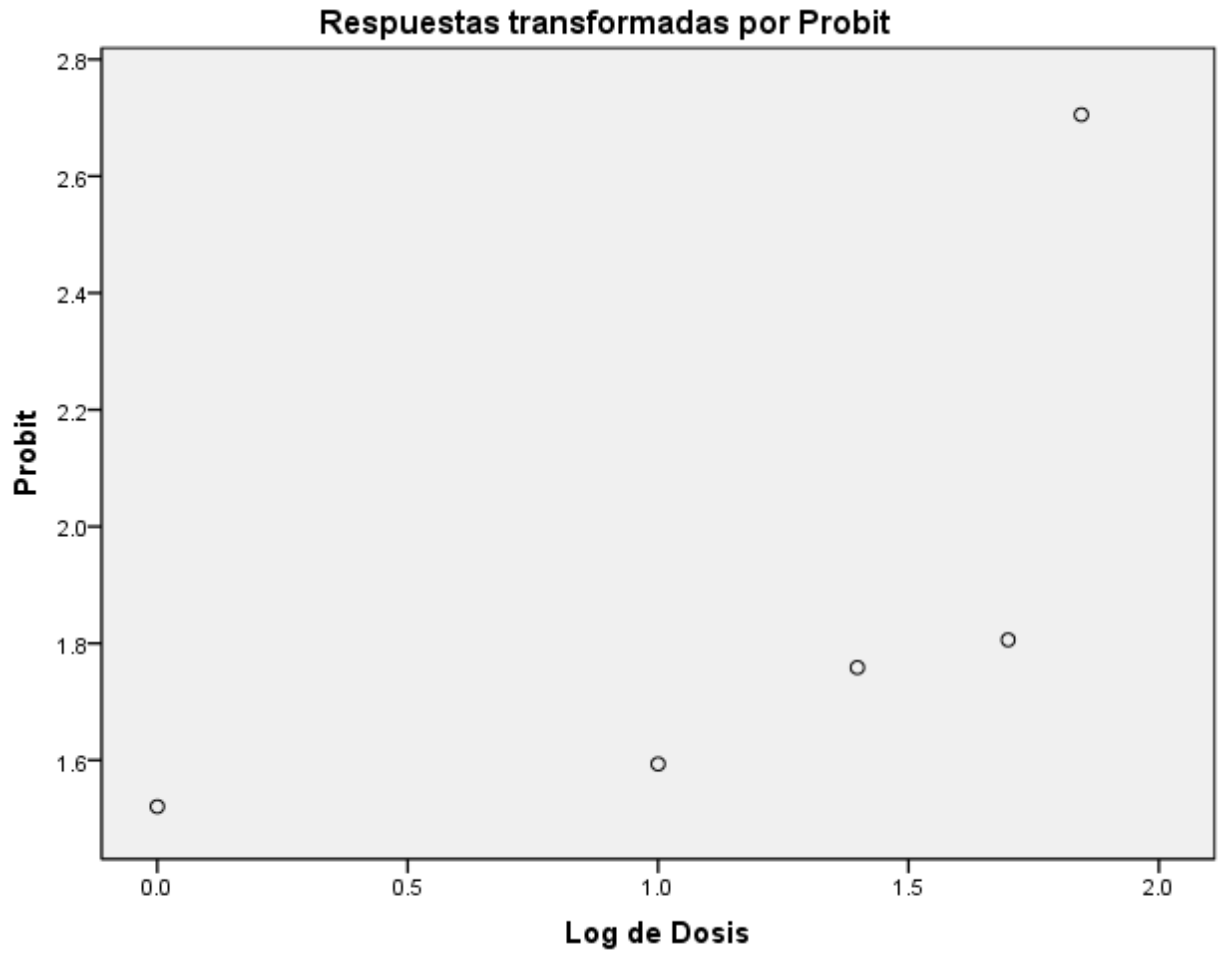
**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	.	.
.010	.	.
.020	.	.
.030	.	.
dimen	.	.
sion1	.	.
.040	.	.
.050	.	.
.060	.	.
.070	.	.

.080	.	.
.090	.	.
.100	.	.
.150	.	.
.200	.	.
.250	.	.
.300	.	.
.350	.	.
.400	.	.
.450	.	.
.500	.	.
.550	.	.
.600	.	.
.650	.	.
.700	.	.
.750	.	.
.800	.	.
.850	.	.
.900	.	.
.910	.	.
.920	.	.
.930	.	.
.940	.	.
.950	.	.
.960	.	.
.970	.	.
.980	.	.
.990	.	.

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```
PROBIT MuertasLcr OF TotalLcr WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:31:36
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos0
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLcr OF TotalLcr WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.187
	Tiempo transcurrido	00:00:00.250

[Conjunto\_de\_datos0]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas >	0
Número de sujetos	
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	16	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	1.734	.001	1375.173	.000
Intersección	.160	.001	218.838	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	1.731	1.736
Intersección	.160	.161

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	2857.406	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	2915000	1644583	1643133.068
i 2	1.000	2915000	2830138	2830132.877
m 3	1.398	2915000	2896944	2900760.593
e 4	1.699	2915000	2913611	2912233.799



n 5	1.845	2915000	2915000	2913860.271
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT	d 1	1449.932	.564
	i 2	5.123	.971
	m 3	-3816.593	.995
	e 4	1377.201	.999
	n 5	1139.729	1.000
s			
i			
o			
n			
l			

**Límites de confianza**

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup>  dimen sionl	.010	.037	.027	.048	-1.434
	.020	.053	.040	.068	-1.277
	.030	.066	.051	.084	-1.177
	.040	.079	.061	.099	-1.102
	.050	.091	.071	.113	-1.041
	.060	.102	.080	.127	-.989
	.070	.114	.090	.140	-.944
	.080	.125	.100	.153	-.903
	.090	.136	.109	.165	-.866
	.100	.147	.119	.178	-.832
	.150	.204	.168	.242	-.690
.200	.264	.222	.309	-.578	
.250	.330	.281	.381	-.482	

.300	.403	.347	.460	-.395
.350	.484	.423	.548	-.315
.400	.577	.509	.647	-.239
.450	.684	.608	.761	-.165
.500	.808	.725	.893	-.092
.550	.955	.863	1.049	-.020
.600	1.132	1.029	1.237	.054
.650	1.348	1.233	1.469	.130
.700	1.622	1.489	1.763	.210
.750	1.980	1.821	2.152	.297
.800	2.472	2.273	2.695	.393
.850	3.202	2.931	3.515	.505
.900	4.433	4.019	4.933	.647
.910	4.796	4.335	5.357	.681
.920	5.224	4.705	5.860	.718
.930	5.738	5.147	6.469	.759
.940	6.373	5.690	7.226	.804
.950	7.183	6.376	8.201	.856
.960	8.267	7.288	9.519	.917
.970	9.826	8.585	11.437	.992
.980	12.364	10.667	14.606	1.092
.990	17.758	15.007	21.497	1.249

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

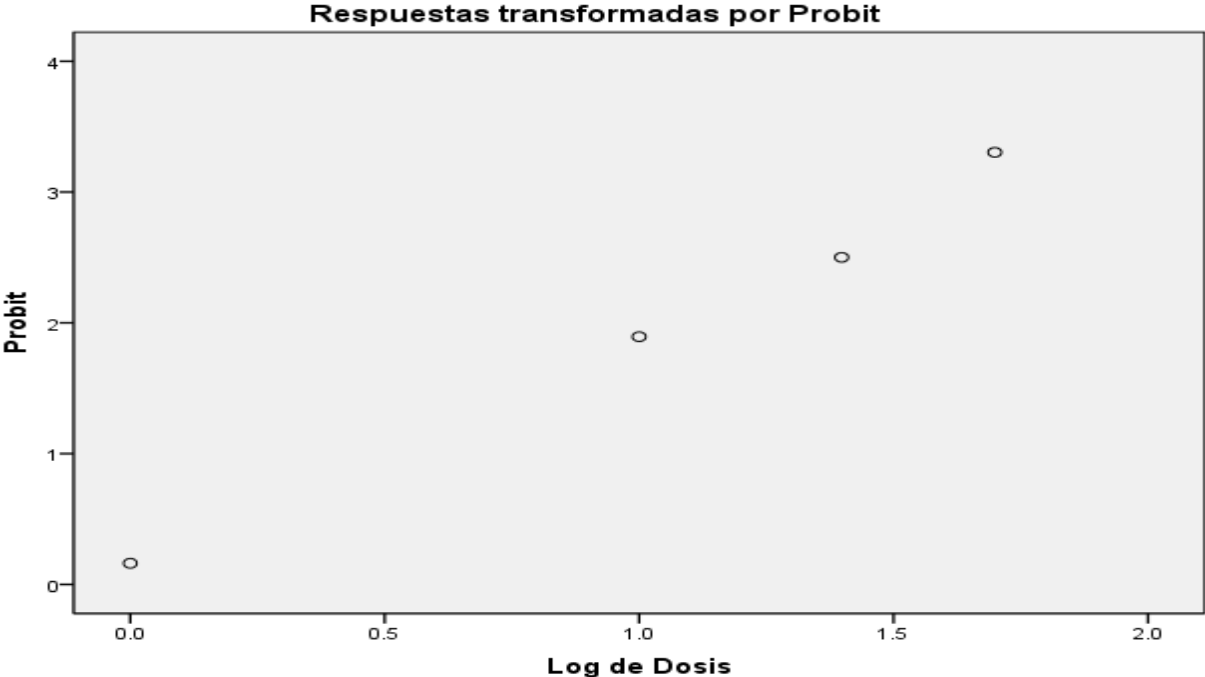
#### Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>		
.010	-1.572	-1.314
.020	-1.403	-1.167
.030	-1.296	-1.074
dimen .040	-1.215	-1.003
sionl .050	-1.150	-.946
.060	-1.094	-.897
.070	-1.045	-.855
.080	-1.002	-.816

.090	-.962	-.781
.100	-.925	-.749
.150	-.774	-.616
.200	-.654	-.511
.250	-.551	-.420
.300	-.459	-.338
.350	-.374	-.261
.400	-.294	-.189
.450	-.216	-.119
.500	-.140	-.049
.550	-.064	.021
.600	.013	.092
.650	.091	.167
.700	.173	.246
.750	.260	.333
.800	.357	.431
.850	.467	.546
.900	.604	.693
.910	.637	.729
.920	.673	.768
.930	.712	.811
.940	.755	.859
.950	.805	.914
.960	.863	.979
.970	.934	1.058
.980	1.028	1.165
.990	1.176	1.332

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



SAVE OUTFILE='C:\Users\Dra. Porfiria Barrón\Desktop\Lesli\Resultado Probit de G.lamblii.sav'  
/COMPRESSED.

```

NEW FILE.
DATASET NAME Conjunto_de_datos1 WINDOW=FRONT.
PROBIT MuertasLcasei OF TotalLcasei WITH Dosis
  /LOG 10
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
  /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
    
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:41:34
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLcasei OF TotalLcasei WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.172
	Tiempo transcurrido	00:00:00.218

[Conjunto\_de\_datos1]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

	Nº de casos
Válidos	5
Rechazados Perdidos	0

La transformación log no se puede realizar	0
Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	20	No <sup>a</sup>

a. Las estimaciones de los parámetros no han convergido.

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.388	.003	144.020	.000
	Intersección	2.629	.003	1006.612	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.383	.394
	Intersección	2.626	2.632

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	7362.716	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3789028	3775028	3772803.979

i	2	1.000	3789028	3779028	3784198.275
m	3	1.398	3789028	3787653	3786159.794
e	4	1.699	3789028	3787903	3787122.663
n	5	1.845	3789028	3788278	3787472.984
s					
i					
o					
n					
l					

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT	d 1	2224.021	.996
	i 2	-5170.275	.999
	m 3	1493.206	.999
	e 4	780.337	.999
	n 5	805.016	1.000
s			
i			
o			
n			
l			

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
				Estimación
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	
PROBIT <sup>a</sup>	.010	.000	.	-12.757
	.020	.000	.	-12.056
	.030	.000	.	-11.610
	.040	.000	.	-11.275
dimen	.050	.000	.	-11.003
sion1	.060	.000	.	-10.771
	.070	.000	.	-10.568
	.080	.000	.	-10.386
	.090	.000	.	-10.220
	.100	.000	.	-10.068

.150	.000	.	.	-9.437
.200	.000	.	.	-8.935
.250	.000	.	.	-8.505
.300	.000	.	.	-8.118
.350	.000	.	.	-7.760
.400	.000	.	.	-7.421
.450	.000	.	.	-7.092
.500	.000	.	.	-6.768
.550	.000	.	.	-6.445
.600	.000	.	.	-6.116
.650	.000	.	.	-5.776
.700	.000	.	.	-5.418
.750	.000	.	.	-5.032
.800	.000	.	.	-4.602
.850	.000	.	.	-4.100
.900	.000	.	.	-3.469
.910	.000	.	.	-3.317
.920	.001	.	.	-3.151
.930	.001	.	.	-2.969
.940	.002	.	.	-2.766
.950	.003	.	.	-2.534
.960	.005	.	.	-2.261
.970	.012	.	.	-1.926
.980	.033	.	.	-1.481
.990	.166	.	.	-.779

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

**Límites de confianza**

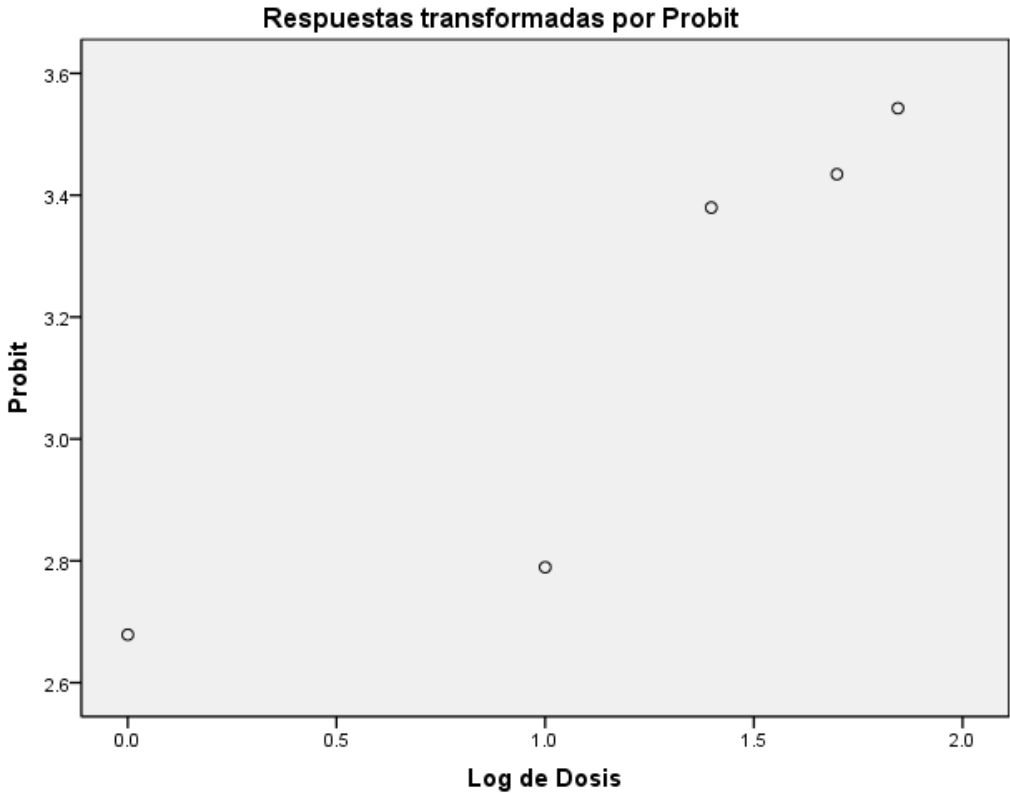
Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> .010	.	.
dimen .020	.	.
sion1 .030	.	.
.040	.	.



.050	.	.
.060	.	.
.070	.	.
.080	.	.
.090	.	.
.100	.	.
.150	.	.
.200	.	.
.250	.	.
.300	.	.
.350	.	.
.400	.	.
.450	.	.
.500	.	.
.550	.	.
.600	.	.
.650	.	.
.700	.	.
.750	.	.
.800	.	.
.850	.	.
.900	.	.
.910	.	.
.920	.	.
.930	.	.
.940	.	.
.950	.	.
.960	.	.
.970	.	.
.980	.	.
.990	.	.

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```

PROBIT MuertasBlongum OF TotalBlongum WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
    
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:43:40
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasBlongum OF TotalBlongum WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.172
	Tiempo transcurrido	00:00:00.235

[Conjunto\_de\_datos1]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas >	0
Número de sujetos	
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	15	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.908	.001	1138.451	.000
Intersección	.837	.001	1163.304	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.906	.909
Intersección	.837	.838

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	150715.042	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3789028	3091111	3026784.700
i 2	1.000	3789028	3522153	3635653.757
m 3	1.398	3789028	3717278	3722394.701

e 4	1.699	3789028	3789028	3756195.598
n 5	1.845	3789028	3789028	3766301.789
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	64326.300	.799
i 2	-113500.757	.960
m 3	-5116.701	.982
e 4	32832.402	.991
n 5	22726.211	.994
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup> .010	.000	.000	.013	-3.485
.020	.001	.000	.020	-3.185
.030	.001	.000	.027	-2.995
.040	.001	.000	.033	-2.851
.050	.002	.000	.039	-2.735
dimen .060	.002	.000	.045	-2.635
sionl .070	.003	.000	.051	-2.548
.080	.003	.000	.057	-2.471
.090	.004	.000	.064	-2.400
.100	.005	.000	.070	-2.334
.150	.009	.000	.103	-2.064
.200	.014	.000	.142	-1.850

.250	.022	.000	.186	-1.666
.300	.032	.000	.237	-1.500
.350	.045	.000	.298	-1.347
.400	.063	.000	.371	-1.202
.450	.087	.000	.460	-1.061
.500	.120	.000	.569	-.923
.550	.164	.001	.706	-.784
.600	.227	.001	.882	-.643
.650	.318	.003	1.117	-.498
.700	.452	.008	1.445	-.345
.750	.661	.022	1.935	-.180
.800	1.011	.063	2.750	.005
.850	1.657	.201	4.395	.219
.900	3.085	.730	9.382	.489
.910	3.585	.956	11.745	.554
.920	4.220	1.255	15.316	.625
.930	5.049	1.649	21.047	.703
.940	6.170	2.169	30.941	.790
.950	7.753	2.866	49.693	.889
.960	10.141	3.829	90.035	1.006
.970	14.107	5.247	194.782	1.149
.980	21.876	7.615	569.048	1.340
.990	43.679	12.885	3277.440	1.640

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

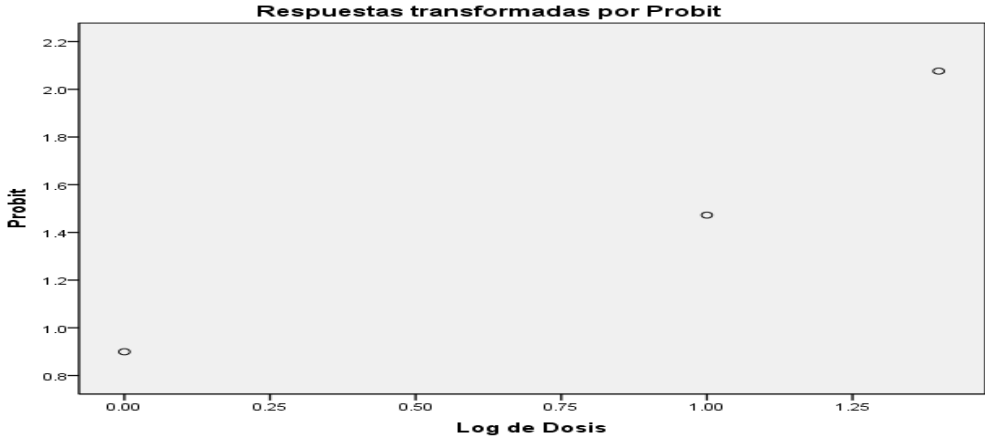
#### Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>		
.010	-10.374	-1.877
.020	-9.573	-1.690
.030	-9.065	-1.571
dimen sion1		
.040	-8.682	-1.481
.050	-8.372	-1.408
.060	-8.107	-1.345
.070	-7.875	-1.291

.080	-7.668	-1.242
.090	-7.479	-1.197
.100	-7.306	-1.156
.150	-6.587	-.985
.200	-6.017	-.849
.250	-5.529	-.731
.300	-5.091	-.624
.350	-4.685	-.525
.400	-4.302	-.430
.450	-3.931	-.337
.500	-3.568	-.245
.550	-3.206	-.151
.600	-2.839	-.055
.650	-2.463	.048
.700	-2.071	.160
.750	-1.653	.287
.800	-1.199	.439
.850	-.696	.643
.900	-.137	.972
.910	-.019	1.070
.920	.099	1.185
.930	.217	1.323
.940	.336	1.491
.950	.457	1.696
.960	.583	1.954
.970	.720	2.290
.980	.882	2.755
.990	1.110	3.516

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.





```

PROBIT MuertasLlactis OF TotalLlactis WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

```

**Análisis probit****Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:47:54
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLlactis OF TotalLlactis WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.187
	Tiempo transcurrido	00:00:00.235

[Conjunto\_de\_datos1]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	19	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.208	.001	230.252	.000
	Intersección	1.770	.001	1572.935	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.206	.210
	Intersección	1.769	1.771

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

		Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	21806.882	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número		Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT	d 1	.000	3789028	3660278	3643708.653
	i 2	1.000	3789028	3660278	3698217.763
	m 3	1.398	3789028	3721528	3714506.909
	e 4	1.699	3789028	3726528	3725116.675

n 5	1.845	3789028	3742778	3729782.903
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

	Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT	d 1	16569.347	.962
	i 2	-37939.763	.976
	m 3	7021.091	.980
	e 4	1411.325	.983
	n 5	12995.097	.984
s			
i			
o			
n			
l			

**Límites de confianza**

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup>	.010	.000	.	.	-19.711
	.020	.000	.	.	-18.399
	.030	.000	.	.	-17.567
	.040	.000	.	.	-16.941
	.050	.000	.	.	-16.432
	.060	.000	.	.	-15.998
dimen	.070	.000	.	.	-15.618
sion1	.080	.000	.	.	-15.278
	.090	.000	.	.	-14.969
	.100	.000	.	.	-14.684
	.150	.000	.	.	-13.504
	.200	.000	.	.	-12.567
	.250	.000	.	.	-11.763

.300	.000	.	.	-11.040
.350	.000	.	.	-10.371
.400	.000	.	.	-9.736
.450	.000	.	.	-9.122
.500	.000	.	.	-8.517
.550	.000	.	.	-7.913
.600	.000	.	.	-7.298
.650	.000	.	.	-6.663
.700	.000	.	.	-5.994
.750	.000	.	.	-5.272
.800	.000	.	.	-4.468
.850	.000	.	.	-3.530
.900	.004	.	.	-2.351
.910	.009	.	.	-2.066
.920	.018	.	.	-1.757
.930	.038	.	.	-1.416
.940	.092	.	.	-1.036
.950	.250	.	.	-.603
.960	.806	.	.	-.094
.970	3.408	.	.	.532
.980	23.156	.	.	1.365
.990	474.596	.	.	2.676

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

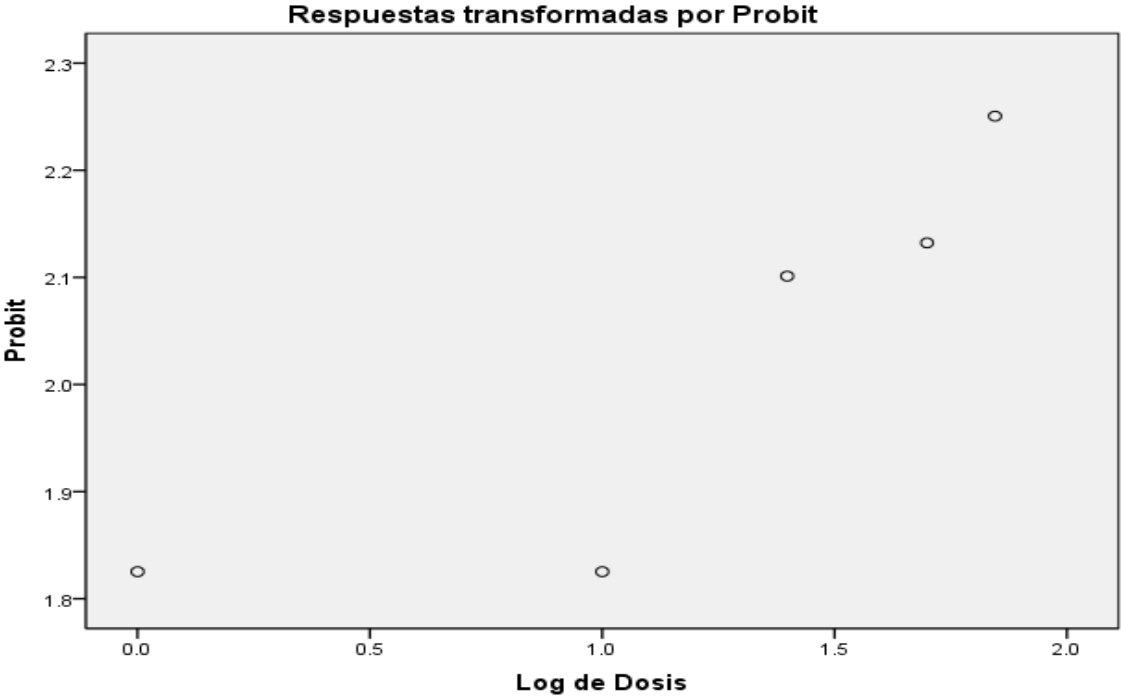
**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	.	.
.010	.	.
.020	.	.
.030	.	.
dimen	.	.
sion1	.	.
.040	.	.
.050	.	.
.060	.	.
.070	.	.

.080	.	.
.090	.	.
.100	.	.
.150	.	.
.200	.	.
.250	.	.
.300	.	.
.350	.	.
.400	.	.
.450	.	.
.500	.	.
.550	.	.
.600	.	.
.650	.	.
.700	.	.
.750	.	.
.800	.	.
.850	.	.
.900	.	.
.910	.	.
.920	.	.
.930	.	.
.940	.	.
.950	.	.
.960	.	.
.970	.	.
.980	.	.
.990	.	.

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```
PROBIT MuertasLacid OF TotalLacid WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:49:42
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLacid OF TotalLacid WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.172
	Tiempo transcurrido	00:00:00.234

[Conjunto\_de\_datos1]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	13	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.580	.001	998.356	.000
	Intersección	.739	.001	1089.891	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.579	.581
	Intersección	.739	.740

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	24626.157	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3789028	2880278	2918207.069
i 2	1.000	3789028	3506528	3434721.616



m	3	1.398	3789028	3567778	3559648.949
e	4	1.699	3789028	3606528	3628850.059
n	5	1.845	3789028	3636528	3655747.109
s					
i					
o					
n					
l					

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	-37929.069	.770
i 2	71806.384	.906
m 3	8129.051	.939
e 4	-22322.059	.958
n 5	-19219.109	.965
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup>	.010	.000	.000	-5.285
	.020	.000	.000	-4.815
	.030	.000	.000	-4.517
	.040	.000	.000	-4.293
	.050	.000	.000	-4.111
dimen	.060	.000	.000	-3.955
sionl	.070	.000	.000	-3.819
	.080	.000	.000	-3.697
	.090	.000	.000	-3.586
	.100	.000	.000	-3.484
	.150	.001	.000	-3.062

.200	.002	.000	.013	-2.726
.250	.004	.000	.022	-2.438
.300	.007	.000	.035	-2.179
.350	.012	.001	.053	-1.939
.400	.019	.002	.080	-1.712
.450	.032	.003	.120	-1.491
.500	.053	.006	.178	-1.275
.550	.087	.013	.264	-1.058
.600	.145	.026	.395	-.838
.650	.245	.053	.601	-.610
.700	.426	.113	.939	-.371
.750	.773	.254	1.532	-.112
.800	1.500	.616	2.683	.176
.850	3.251	1.668	5.354	.512
.900	8.603	5.214	14.319	.935
.910	10.882	6.687	18.645	1.037
.920	14.048	8.661	25.130	1.148
.930	18.601	11.367	35.330	1.270
.940	25.450	15.203	52.355	1.406
.950	36.391	20.915	83.045	1.561
.960	55.393	30.044	144.588	1.743
.970	92.846	46.316	289.470	1.968
.980	184.476	81.252	738.119	2.266
.990	544.387	193.712	3283.038	2.736

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

#### Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>		
.010	-7.815	-3.884
.020	-7.155	-3.518
dimen		
.030	-6.737	-3.286
sionl		
.040	-6.422	-3.112
.050	-6.166	-2.969
.060	-5.948	-2.849

.070	-5.757	-2.742
.080	-5.586	-2.647
.090	-5.431	-2.561
.100	-5.287	-2.481
.150	-4.695	-2.152
.200	-4.225	-1.889
.250	-3.821	-1.664
.300	-3.459	-1.461
.350	-3.124	-1.273
.400	-2.806	-1.095
.450	-2.499	-.921
.500	-2.198	-.750
.550	-1.897	-.579
.600	-1.591	-.403
.650	-1.277	-.221
.700	-.948	-.027
.750	-.596	.185
.800	-.210	.429
.850	.222	.729
.900	.717	1.156
.910	.825	1.271
.920	.938	1.400
.930	1.056	1.548
.940	1.182	1.719
.950	1.320	1.919
.960	1.478	2.160
.970	1.666	2.462
.980	1.910	2.868
.990	2.287	3.516

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```
PROBIT MuertasLplan OF TotalLplan WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:51:52
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLplan OF TotalLplan WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.203
	Tiempo transcurrido	00:00:00.250

[Conjunto\_de\_datos1]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	20	No <sup>a</sup>

a. Las estimaciones de los parámetros no han convergido.

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.907	.003	281.829	.000
	Intersección	2.145	.002	1339.096	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

	Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.901	.913
	Intersección	2.144	2.147

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	2223.049	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número		Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
	Dosis			

PROBIT	d 1	.000	3789028	3727653	3728550.161
	i 2	1.000	3789028	3786403	3784724.555
	m 3	1.398	3789028	3787778	3787811.155
	e 4	1.699	3789028	3787778	3788596.555
	n 5	1.845	3789028	3788778	3788773.731
	s				
	i				
	o				
	n				
	l				

### Residuos y frecuencias de casillas

	Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT	d 1	-897.161	.984
	i 2	1678.445	.999
	m 3	-33.155	1.000
	e 4	-818.555	1.000
	n 5	4.269	1.000
	s		
	i		
	o		
	n		
	l		

### Límites de confianza

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
		PROBIT <sup>a</sup>	.010	.000	.000
	.020	.000	.000	.000	-4.630
	.030	.000	.000	.000	-4.440
	dimen sionl .040	.000	.000	.001	-4.296
	.050	.000	.000	.001	-4.180
	.060	.000	.000	.001	-4.080
	.070	.000	.000	.001	-3.993

.080	.000	.000	.001	-3.915
.090	.000	.000	.001	-3.844
.100	.000	.000	.001	-3.779
.150	.000	.000	.002	-3.509
.200	.001	.000	.003	-3.294
.250	.001	.000	.005	-3.110
.300	.001	.000	.006	-2.944
.350	.002	.000	.008	-2.791
.400	.002	.000	.011	-2.645
.450	.003	.000	.014	-2.504
.500	.004	.000	.018	-2.366
.550	.006	.000	.023	-2.227
.600	.008	.001	.029	-2.086
.650	.011	.001	.038	-1.941
.700	.016	.002	.050	-1.787
.750	.024	.004	.066	-1.622
.800	.037	.007	.092	-1.438
.850	.060	.013	.136	-1.223
.900	.112	.032	.221	-.953
.910	.130	.040	.249	-.887
.920	.153	.051	.283	-.816
.930	.183	.065	.327	-.738
.940	.223	.087	.383	-.651
.950	.281	.119	.461	-.552
.960	.367	.173	.574	-.435
.970	.511	.273	.757	-.292
.980	.792	.489	1.114	-.101
.990	1.583	1.127	2.229	.200

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

#### Límites de confianza

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$	
		Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	dimen .010	-7.212	-3.720



tion1	.020	-6.779	-3.489
	.030	-6.504	-3.343
	.040	-6.297	-3.233
	.050	-6.128	-3.144
	.060	-5.985	-3.068
	.070	-5.859	-3.001
	.080	-5.747	-2.941
	.090	-5.645	-2.887
	.100	-5.551	-2.837
	.150	-5.161	-2.629
	.200	-4.851	-2.464
	.250	-4.586	-2.323
	.300	-4.347	-2.196
	.350	-4.126	-2.078
	.400	-3.917	-1.966
	.450	-3.714	-1.858
	.500	-3.515	-1.751
	.550	-3.315	-1.645
	.600	-3.113	-1.536
	.650	-2.904	-1.424
	.700	-2.683	-1.305
	.750	-2.446	-1.177
	.800	-2.182	-1.034
	.850	-1.874	-.867
	.900	-1.489	-.656
	.910	-1.396	-.604
	.920	-1.296	-.548
	.930	-1.185	-.486
	.940	-1.063	-.416
	.950	-.923	-.336
	.960	-.761	-.241
	.970	-.564	-.121
	.980	-.311	.047
	.990	.052	.348

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.



```
PROBIT MuertasLcr OF TotalLcr WITH Dosis
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

**Análisis probit**

**Notas**

Resultados creados		26-may-2011 19:53:12
Comentarios		
Entrada	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Peso	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	6
Tratamiento de los valores perdidos	Definición de perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratarán como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos se basan en todos los casos con datos válidos para todas las variables en el modelo.
Sintaxis		PROBIT MuertasLcr OF TotalLcr WITH Dosis /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:00.203
	Tiempo transcurrido	00:00:00.235

[Conjunto\_de\_datos1]

**Advertencia**

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

**Información sobre los datos**

		Nº de casos
Válidos		5
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0

Número de respuestas >	0
Número de sujetos	
Grupo control	1

**Información sobre la convergencia**

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	11	Sí

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.869	.000	1798.131	.000
Intersección	-.820	.001	-1269.848	.000

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Estimaciones de los parámetros**

Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> Dosis	.868	.870
Intersección	-.820	-.819

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + \text{BX}$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	1730862.179	3	.000 <sup>b</sup>

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas
PROBIT d 1	.000	3789028	1102917	781239.139
i 2	1.000	3789028	1441806	1969474.096
m 3	1.398	3789028	2147778	2477204.698

e 4	1.699	3789028	2489028	2820897.856
n 5	1.845	3789028	3766653	2968948.774
s				
i				
o				
n				
l				

**Residuos y frecuencias de casillas**

Número	Residuos	Probabilidad
PROBIT d 1	321677.861	.206
i 2	-527668.096	.520
m 3	-329426.698	.654
e 4	-331869.856	.744
n 5	797704.226	.784
s		
i		
o		
n		
l		

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación
PROBIT <sup>a</sup> .010	.018	.	.	-1.733
.020	.038	.	.	-1.419
.030	.060	.	.	-1.221
.040	.085	.	.	-1.071
.050	.112	.	.	-.949
dimen .060	.143	.	.	-.846
sionl .070	.176	.	.	-.755
.080	.212	.	.	-.673
.090	.252	.	.	-.599
.100	.294	.	.	-.531
.150	.563	.	.	-.249
.200	.944	.	.	-.025

.250	1.469	.	.	.167
.300	2.186	.	.	.340
.350	3.160	.	.	.500
.400	4.482	.	.	.652
.450	6.286	.	.	.798
.500	8.769	.	.	.943
.550	12.232	.	.	1.087
.600	17.154	.	.	1.234
.650	24.331	.	.	1.386
.700	35.168	.	.	1.546
.750	52.335	.	.	1.719
.800	81.479	.	.	1.911
.850	136.502	.	.	2.135
.900	261.274	.	.	2.417
.910	305.632	.	.	2.485
.920	362.394	.	.	2.559
.930	437.049	.	.	2.641
.940	538.745	.	.	2.731
.950	683.914	.	.	2.835
.960	905.191	.	.	2.957
.970	1277.622	.	.	3.106
.980	2020.004	.	.	3.305
.990	4158.356	.	.	3.619

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

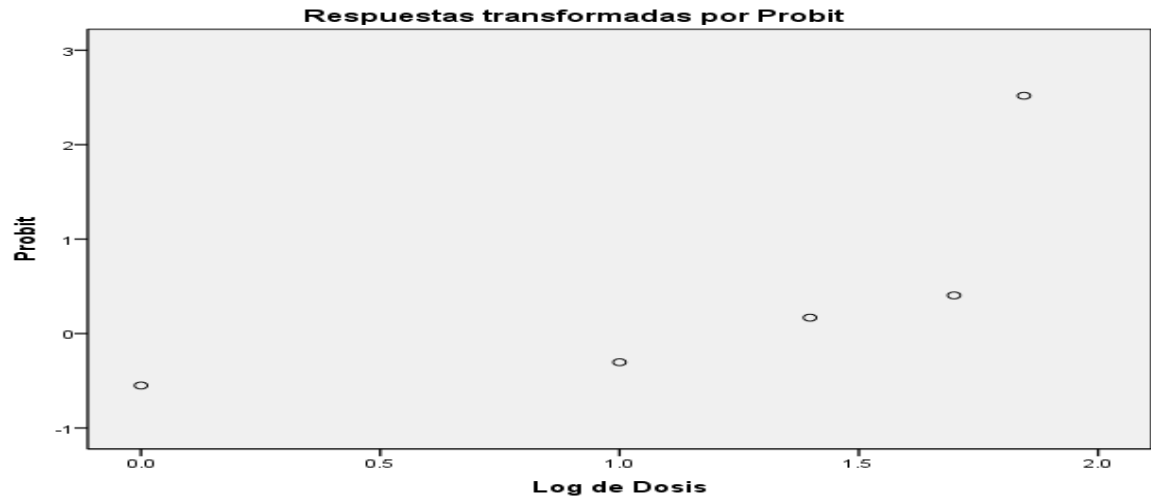
b. Base del logaritmo = 10.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^b$	
	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> .010	.	.
.020	.	.
dimen .030	.	.
sion1 .040	.	.
.050	.	.
.060	.	.

.070	.	.
.080	.	.
.090	.	.
.100	.	.
.150	.	.
.200	.	.
.250	.	.
.300	.	.
.350	.	.
.400	.	.
.450	.	.
.500	.	.
.550	.	.
.600	.	.
.650	.	.
.700	.	.
.750	.	.
.800	.	.
.850	.	.
.900	.	.
.910	.	.
.920	.	.
.930	.	.
.940	.	.
.950	.	.
.960	.	.
.970	.	.
.980	.	.
.990	.	.

- a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.  
b. Base del logaritmo = 10.



```
SAVE OUTFILE='C:\Users\Dra. Porfiria Barrón\Desktop\Lesli\Resultado Probit T. vaginalis.sav'  
/COMPRESSED.
```