

Cambios histomorfométricos y nivel de colonización de *Lactobacillus acidophilus* y *Kluyveromyces fragilis* en diferentes segmentos tracto digestivo de cuyes (*Cavia porcellus*)

Histomorphometric changes and colonisation level of *Lactobacillus acidophilus* and *Kluyveromyces fragilis* in different digestive tract segments of Guinea pigs (*Cavia porcellus*)

José Miranda-Yuquilema^{1*}, Juan Taboada-Pico², Wilfido Briñez-Zambrano³, Mercy Cuenca-Condoy⁴

¹Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ingeniería, Grupo de Producción Animal e Industrialización. Riobamba, Ecuador.

²Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuenca, Ecuador.

³Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela.

⁴Universidad Católica de Cuenca, Facultad de Ciencias Veterinarias. Cuenca, Ecuador.

*Autor para correspondencia: josee.miranda@unach.edu.ec

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo, evaluar la acción de los bioaditivos probióticos sobre los cambios histomorfométricos y nivel de colonización en diferentes segmentos de tracto digestivo en cuyes con 90 días (d) de edad. De manera aleatorizada se seleccionaron 80 cuyes de raza Kuri con 30 d de edad, 250 g de peso vivo, y se distribuyeron en cuatro grupos de 20 animales cada uno. Ctrl, Control. Bal, sustrato vinaza-melaza fermentado con *Lactobacillus acidophilus*. Lev, sustrato vinaza-melaza fermentado con *Kluyveromyces fragilis*. B+L, sustrato vinaza-melaza fermentado con *L. acidophilus* y *K. fragilis*. El Bal, Lev y B+L en su base contenía sustrato melaza - vinaza. Los parámetros evaluados fueron, lesiones macroscópicas en los órganos del tracto digestivo, cambios morfométricos y microbiota del tracto digestivo. Los órganos del tracto digestivo en cuyes del grupo control presentaron mayor ($P<0,05$) cantidad de lesiones macroscópicas; las muestras del intestino, duodeno, yeyuno e íleon de los animales que consumieron probióticos presentaron mayor ($P<0,05$) longitud; similar situación presentó los cambios histomorfométricos de tejidos intestinales en cuyes con probióticos, la carga microbiana detectada a partir del hisopado rectal en los diferentes medios de cultivos con diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$). Se concluye que la inclusión aditivo microbiano en los cuyes influyen en los cambios morfométricos sobre todo en la longitud y ancho de vellosidades intestinales, profundidad de criptas y relación longitud/profundidad a los 45 y 90 d de edad. Asimismo, se pudo verificar el nivel de colonización que realizan las cepas de los microorganismos beneficiosos en diferentes segmentos del tracto digestivo.

Palabras clave: Microbiota intestinal; probióticos; salud; vellosidades intestinales

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the action of probiotic bioadditives on histomorphometric changes and colonization levels in different segments of the digestive tract in 90-day-old guinea pigs. Eighty Kuri guinea pigs of 30 d of age, 250 g live weight were randomly selected and distributed into four groups of 20 animals each. Ctrl, Control. Bal, vinasse-molasses substrate fermented with *Lactobacillus acidophilus*. Lev, vinasse-molasses substrate fermented with *Kluyveromyces fragilis*. B+L, vinasse-molasses substrate fermented with *L. acidophilus* and *K. fragilis*. Bal, Lev and B+L contained molasses-vinasse substrate in their base. The parameters evaluated were macroscopic lesions in the digestive tract organs, morphometric changes and microbiota of the digestive tract. The organs of the digestive tract in guinea pigs of the control group presented a greater ($P<0.05$) amount of macroscopic lesions; the samples of the intestine, duodenum, jejunum and ileum of the animals that consumed probiotics presented a greater ($P<0.05$) length; similar situation presented the histomorphometric changes of intestinal tissues in guinea pigs with probiotics, the microbial load detected from the rectal swab in the different culture media with significant statistical differences ($P<0.05$). It is concluded that the inclusion of microbial additive in guinea pigs influences morphometric changes, especially in the length and width of intestinal villi, crypt depth and length/depth ratio at 45 and 90 d of age. It was also possible to verify the level of colonization carried out by the strains of beneficial microorganisms in different segments of the digestive tract.

Key words: Gut microbiota; probiotics; health; intestinal villi

INTRODUCCIÓN

En la producción animal, una de las alternativas más utilizadas en la última década, a fin de incidir favorablemente sobre el estatus nutricional y fisiológico de los animales domésticos para mejorar su desempeño productivo, fue la inclusión de aditivos a los alimentos, tales como suplementos (vitaminas, minerales, oligoelementos), sustancias auxiliares (antioxidantes, saborizantes) y los promotores de crecimiento (antibióticos, enzimas, probióticos) [1]. Entre ellos, los antibióticos promotores del crecimiento (APC) fueron los más utilizados puesto que estos cumplían también acción bactericida, para el tratamiento sub-terapéutico de algunas enfermedades provocadas por agentes patógenos de origen bacteriano [2].

El uso indebido de aditivos sintéticos, especialmente debido al descontrol en los tiempos de retiro, provoca la acumulación de residuos en los productos y subproductos de los animales tratados [1, 3]. A largo plazo, esto genera resistencia bacteriana en los consumidores [2, 4, 5], así como disbacteriosis y enteritis necrótica [6]. En los cuyes, la acumulación de estos compuestos se localiza en el hígado, músculos, riñones y tejido subcutáneo [7].

Lo anteriormente expuesto, exige la búsqueda de alternativas que mejoren el desempeño productivo de los animales de manera similar a los APC, pero sin perjudicar la salud del consumidor. Entre estas alternativas se encuentran los bioaditivos con acción pre y probiótica, los mismos que han demostrado efectos positivos en la salud humana y animal [3, 5]. Estos bioaditivos se adhieren al tracto digestivo e inhiben el crecimiento de patógenos [8], actúan como promotores naturales del crecimiento, reducen los síntomas de estrés y no requieren tiempo de retiro [3, 5, 9].

En el ser humano, los bioaditivos protegen las células intestinales Caco-2 contra el daño inducido por *Escherichia coli* F4 enterotoxigénica (ETEC) [10]. En lechones destetados, la adición de *Lactobacillus* y *Bacillus* en el alimento protege contra el daño causado por *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* KCTC 2515 y *Escherichia coli* KCTC 2571 [11]. Por lo tanto, este estudio se centró en evaluar la acción de los bioaditivos probióticos sobre los cambios histomorfométricos y el nivel de colonización en diferentes segmentos del tracto digestivo en cuyes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioética animal

Los procedimientos relacionados para la manipulación y sacrificio de los cuyes, se realizó utilizando Pentobarbital sódico (25–40 mg·kg⁻¹) administrado por vía intravenosa, siguiendo las recomendaciones para eutanasia de animales de experimentación (roedores) emitidas por Gimeno y cols. [12].

Lugar de estudio

El estudio se realizó en la Unidad de Producción Pecuaria, “La Caldera”, ubicada en la Parroquia Sidcay, Cantón Cuenca. 2.548 msnm, precipitación anual entre 300–600 mm, temperatura media de 15°C, humedad relativa anual 78 % y evapotranspiración anual 72,03.

Cepas de microorganismos empleados, activación y obtención de biomasa empleados

Se utilizaron cepas de microorganismos específicos para el estudio: *Kluyveromyces fragilis* L-4 UCLV (6,4 × 10⁸ UFC·mL⁻¹) proveniente del

banco de cepas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, y *Lactobacillus acidophilus* (5,6 × 10⁷ UFC·mL⁻¹), de la American Type Culture Collection 4356 (Global Bioresource Center, EE. UU.). Las cepas liofilizadas fueron activadas de manera individual en un matraz de 200 mL. Se adicionaron 100 mL de caldo triptona-soja (BD Difco™, Trypticase, Texas, EE. UU.) y se incubaron a 37°C para las bacterias y a 30°C para las levaduras en una estufa con agitador orbital (Inkubationshaube TH 15, GmbH, Bodelshausen, Alemania) durante 6 horas. La biomasa utilizada en el presente estudio se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Miranda y cols. [13].

Obtención de los biopreparados con acción probiótica y dosis aplicada

Todos los biopreparados evaluados en el estudio se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Miranda y cols. [13]. El biopreparado LAB contenía un sustrato de melaza-vinaza fermentado con *L. acidophilus* (8,1 × 10⁷ UFC·mL⁻¹), mientras que el biopreparado LEV estaba compuesto por un sustrato de melaza-vinaza fermentado con *K. fragilis* L-4 UCLV (7,4 × 10⁶ UFC·mL⁻¹).

La administración de los biopreparados microbianos se llevó a cabo de acuerdo con la dosis y el grupo especificado en la TABLA I. La primera dosis se administró en monodosis por vía oral, y a partir de la segunda dosis, se aplicó cada tres días (d) según el grupo asignado. El grupo control recibió 1 mL de agua destilada.

TABLA I
Tratamientos utilizados en el estudio y su formulación

Grupos	Codificación	Descripción de los aditivos
Control	Ctrl	Animales que no consumieron aditivo microbiano
Bioaditivo 1	Bal	Dieta basal + 1 mL de sustrato (melaza-vinaza) fermentados con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Bioaditivo 2	Lev	Dieta basal + 1 mL de sustrato (melaza-vinaza) fermentados con <i>Kluyveromyces fragilis</i>
Bioaditivo 3	B+L	Dieta basal + 1 mL de sustrato (melaza-vinaza) fermentados con <i>L. acidófilo</i> y <i>K. fragilis</i>

Animales empleados, alimentación suministrada, diseño de granjas y sistema de manejo

Se utilizaron 80 cuyes machos (*Cavia porcellus*), raza Kuri, de 30 ± 5 d de edad y 250 ± 30 g de peso vivo.

El alimento (dieta basal) ofrecido a los animales de estudio fue una mezcla de 20 % alfalfa (*Medicago sativa*), 25 % maralfalfa (*Pennisetum* spp.), 30 % Pasto King Grass (*Pennisetum purpureun* × *P. typhoides*), 24,97 % de alimento concentrado para cuy con el 16 % de proteína bruta y 0.03 % de vitamina C. Esta se proporcionó en dos raciones iguales cada 12 horas según lo recomendado por Miranda y cols. [14] y al Consejo Nacional de Investigación (NRC) [15]. Además, se ofrecieron 50 mL de agua diarios en bebederos automáticos de Niple.

Los cuyes se alojaron en jaulas grupales de 1,50 × 1,00 m, con cinco animales por jaula. La temperatura del galpón se controló a 14 ± 2°C. Las jaulas de cada tratamiento se colocaron a 1,50 m de distancia a ambos lados del pasillo para evitar la autoinoculación.

Manejo sanitario y escaldado de cuyes

Al término del estudio (90 d), seis animales de cada tratamiento fueron sometidos a un periodo de ayuno de 12:00 horas, según lo recomendado en la metodología utilizada por Cornejo [16] y Sánchez [17]. Al término de este periodo los cuyes fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones para eutanasia de animales de experimentación (roedores) emitidas por Gimeno y col [12], reemplazando a la normativa emitida para eutanasia de conejos y otros roedores establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio Humanitario de los Animales Domésticos y Salvajes (Humane Slaughtering Association, 2016) [18].

Evisceración de los animales

Antes de la evisceración se realizó corte en la articulación atlanto-occipital y la vértebra cervical, también un corte a la altura de la articulación carpo-metacarpiana y tarso-metatarsiana, hasta obtener una canal sin autópodos y cabeza. La evisceración se practicó mediante laparotomía para aislar los órganos del tracto gastrointestinal.

Los segmentos digestivos (páncreas, hígado, estómago, bazo, intestino grueso y delgado), se separaron cuidadosamente del mesenterio, el contenido del estómago e intestinos delgado y grueso fue eliminado, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, finalmente se pesaron en una balanza eléctrica digital (KAMRY, modelo EK5055-11, Hong Kong, China) de $5 \pm 0,010$ kg de capacidad.

Examen anatómico-patológico macroscópico de los órganos de trato digestivo

Las lesiones del estómago, intestino delgado, colon y ciego se evaluaron basándose en la técnica descrito por Mejía [19] según el grado de presentación, determinando (edema, congestión, hemorragias), además se evaluó la consistencia del contenido intestinal (acuosa, mucosa, espumosa) y el pH se midió con un pHmetro digital (Hanna®, HI 99163. USA).

Las muestras de tejido del duodeno, yeyuno e íleon, de 5 μ m de espesor e impregnadas en portaobjetos, se obtuvieron siguiendo el método descrito por Mohamed y cols. [20]. Las mediciones de la longitud y anchura de las vellosidades (μ m), así como la profundidad de las criptas (μ m), se realizaron en al menos ocho vellosidades intactas por segmento y muestra, utilizando un microscopio con lentes objetivos de 100 a 300 \times y un sistema de análisis de imágenes (cámara digital Olympus DP72; Olympus, Bélgica), según el método descrito por Hayat [21].

Obtención del mucus intestinal

Tras el aislamiento de los órganos del tracto gastrointestinal, se practicó una incisión longitudinal hasta obtener 2 cm^2 del estómago, intestino delgado, ciego y colon, después de lavar con agua destilada estéril y con buffer fosfato salino (BFS) (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,44 g, 0,2 g, KH_2PO_4 , en 1,0 L de H_2O destilada estéril) con 0,01% de gelatina pH 7,4 según la metodología utilizada por Canal y cols. [22].

A los fragmentos previamente obtenidos se les realizó un raspado profundo con una espátula de 75 mm, hasta recolectar 2,00 mL de moco, que luego fueron depositados en tubos de plástico Falcon (marca Henso, Alemania) de 15 mL de capacidad, con tapa de rosca estéril. A cada muestra se le añadieron 5 mL de BFS, según la metodología descrita por Kandler y Weiss [23]. Finalmente, se

centrifugaron en una Centrifuga Digital (Yingtai, China) a 4.582 G y 8°C durante 10 min, retirando el sobrenadante al final de cada centrifugación. Este procedimiento se repitió tres veces.

Posteriormente, se tomó 1,0 mL del moco obtenido y se añadió a un matraz Erlenmeyer de 150 mL de capacidad, que contenía 50 mL de caldo nutriente y MRS por separado. Luego, se incubó a 37°C durante 6 horas en una incubadora con agitador orbital (Inkubationshaube TH 15, Alemania) a 15 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomaron 5,0 mL de cada cultivo y se homogenizaron con solución salina fisiológica en una proporción de 1/10 (v·v⁻¹). A continuación, se realizaron diluciones seriadas 1/10 (v·v⁻¹) hasta alcanzar la escala 0,5 del esquema MacFarland.

El siguiente paso consistió en el cultivo microbiano en la superficie de placas Petri que contenían medios selectivos estériles (MRS, M17, AS y MacConkey) y un medio general (AN), utilizando el método de agotamiento por estría. Las placas se incubaron en una incubadora (Mettler, UN30plus, Alemania) a 37°C, y a 30°C para el medio AS. Las placas Petri con MRS se incubaron en condiciones anaerobias en una jarra GasPak Plus™ con 5% de CO_2 . Una vez finalizada la incubación, se procedió a la identificación de las colonias típicas, y se realizó la tinción de Gram. Finalmente, las muestras se observaron al microscopio binocular óptico (BA310 MOTIC, China) para diferenciar las características morfo-tintoriales, de acuerdo con el Manual of Systematic Bacteriology [23].

Análisis estadístico

Los datos experimentales se procesaron con el paquete estadístico Statgraphics plus ver. XV. II para Windows. Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para verificar si los datos seguían una distribución normal, requisito previo para la aplicación del ANOVA. El peso relativo de los órganos del tracto digestivo y la carga microbiana (UFC·mL⁻¹) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, utilizando un diseño completamente aleatorizado [24]. Cuando el valor de *P* fue menor a 0,05, se aplicó la prueba de comparación de medias de Duncan [25] para discriminar diferencias entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA II. se presenta los resultados del examen anatómico-patológico macroscópico de cuyes con 45 y 90 d de edad.

Se observó diferencia estadística entre los tratamientos ($P < 0,05$), los animales que consumieron los biopreparados microbianos con acción probiótica (Ba, Lev y B+L), presentaron menor cantidad de lesiones en los tejidos de los órganos del tracto digestivo.

Los efectos positivos de los probióticos sobre la salud de los animales no solo se han observado en la reducción de la presentación y frecuencia de las diarreas sino también en el alivio de sus síntomas, consecuencias y repercusiones de su curso, reseñándose dichos resultados con la utilización de preparados a base de *Bacillus licheniformis* o de *B. toyonensis* [8, 11, 26].

Se ha indicado que el tiempo de tránsito gastrointestinal del bolo alimenticio o algún aditivo empleado con la dieta, comprende entre 2 y 4 horas independientemente del individuo; considerándose que la acidificación contribuye a la modulación de la motilidad intestinal ayudando a que se mejore la digestión, incrementando la capacidad del intestino para digerir y absorber los nutrientes, al implantarse las

TABLA II
Evaluación macroscópica de los órganos de cuyes machos que consumieron preparados probióticos, 45 y 90 d de edad

Órganos	Edad (días)	Tratamientos, (n=7/grupo)				EE	P-valor
		Ctrl	Bal	Lev	B+L		
Pulmones	45	0,2 ^a	0,2 ^a	0,1 ^a	0,01	0,12	0,621
	90	2,5 ^a	0,3 ^b	0,2 ^b	0,02 ^b	0,02	0,021
Hígado	45	0,5 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,01	0,08	0,578
	90	2,8 ^a	0,5 ^b	0,6 ^b	0,02 ^b	0,11	0,037
Estomago	45	0,3 ^a	0, ^a	0,1 ^a	0,01	0,13	0,638
	90	1,5 ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,02 ^b	0,09	0,012
Intestino Delgado	45	1,8 ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,01 ^b	0,05	0,008
	90	2,8 ^a	0,3 ^c	0,25 ^b	0,02 ^c	0,09	0,007
Intestino grueso	45	1,2 ^a	0,2 ^c	0,17 ^b	0,02 ^c	0,11	0,012
	90	2,5 ^a	0,3 ^c	0,28 ^b	0,01 ^c	0,08	0,006
Colon	45	1,4 ^a	0,2 ^b	0,3 ^b	0,02 ^b	0,08	0,048
	90	2,7 ^a	0,1 ^b	0,2 ^b	0,01 ^b	0,05	0,008
Ciego	45	2,8 ^a	0,2 ^c	0,15 ^b	0,01 ^c	0,12	0,002
	90	3,0 ^a	0,3 ^b	0,2 ^b	0,01 ^b	0,04	0,001
Riñones	45	2,1 ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,02 ^c	0,07	0,001
	90	2,6 ^a	0,25 ^b	0,26 ^b	0,1 ^c	0,08	0,012

^{a, b, c}: Las letras en superíndice diferentes en la misma fila difieren a $P < 0,05$, mediante la comparación de proporciones medias. Ctrl: control dieta basal sin aditivo. Bal: dieta basal + probiótico fermentado con *Lactobacillus acidophilus*. Lev: dieta basal + probiótico fermentado con *Kluyveromyces marxianus* subsp. *fragilis*. B+L: dieta basal + probiótico fermentado con *L. acidophilus* y *K. marxianus* subsp. *fragilis*. EE: error estándar. d: días. Lesiones: ausente (0), leve (1), leve–moderada (2), moderada–severa (3), severa (4)

cepas probióticas en la mucosa intestinal, lo cual se ha reportado con la utilización de bacterias ácido lácticas como probióticos [27].

Por lo general, la adición de dos o más microorganismos probióticos en la ración alimenticia de los animales mejora su comportamiento productivo y potencia el sistema inmunológico, quizá por exclusión competitiva de los probióticos sobre los patógenos, ejerciendo así, un efecto antimicrobiano [27, 28, 29].

Referente a la longitud del intestino, se demostró que los cuyes del tratamiento control (Bal) presentaron menor longitud del intestino tanto a los 45 como a los 90 d de edad, comparado con los cuyes que fueron suplementados con los bioaditivos probióticos (Lev = 256cm, B+L= 263cm).

Canal y cols. [22] observaron correlación directa entre el buen aprovechamiento de nutrientes y la citoarquitectura de las vellosidades

intestinales. Por lo tanto, el estudio de la histomorfometría de las vellosidades intestinales a nivel de la mucosa es importante a considerar cuando se evalúa la eficacia de los procesos digestivos en animales, tal como se evaluó el efecto de Bioaditivos probióticos sobre el desempeño productivo y sobre parámetros histomorfométricos de segmentos intestinales en cuyes en diferentes fases de producción [10, 26, 28, 30].

Los cambios morfométricos de los órganos de los cuyes con 45 y 90 d de edad se presentan en la TABLA III.

Se ha reportado que las características morfo–tintoriales de las células crecidas en los diferentes medios de cultivos pueden correlacionarse con la implantación en los diferentes segmentos del tracto digestivo de los microorganismos introducidos con la dieta. Así, en cerdas reproductoras y sus crías, el suministro de alimento

TABLA III
Cambios morfométricos de cuyes alimentados con dietas que contienen diferentes Biopreparados con microorganismos con capacidad probiótica

Indicadores	Edad, d	Tratamientos, (n=7/grupo)				EE	P-valor
		Ctrl	Bal	Lev	B+L		
Longitud del intestino, cm	45	125 ^b	158 ^a	162 ^a	164 ^a	0,12	0,038
	90	204 ^b	252 ^a	256 ^a	263 ^a	0,06	0,042
Longitud de duodeno, %	45	14,64 ^a	11,58 ^b	11,30 ^b	11,16 ^b	0,07	0,032
	90	8,17 ^a	7,26 ^b	7,15 ^b	6,96 ^c	0,12	0,012
Longitud de yeyuno, %	45	34,80 ^a	27,53 ^b	26,85 ^b	26,52 ^b	0,21	0,013
	90	19,42 ^a	17,26 ^b	16,99 ^c	16,54 ^c	0,12	0,031
Longitud de ileon, %	45	30,56 ^a	24,18 ^b	23,58 ^b	23,29 ^b	0,13	0,001
	90	17,05 ^a	15,16 ^b	14,92 ^{bc}	14,52 ^c	0,08	0,024

^{a, b, c}: Las letras en superíndice diferentes en la misma fila difieren a $P < 0,05$, mediante la comparación de proporciones medias. Ctrl: control dieta basal sin aditivo. Bal: dieta basal + probiótico fermentado con *Lactobacillus acidophilus*. Lev: dieta basal + probiótico fermentado con *Kluyveromyces marxianus* subsp. *fragilis*. B+L: dieta basal + probiótico fermentado con *L. acidophilus* y *K. marxianus* subsp. *fragilis*. EE: error estándar. d: días

con aditivos probióticos a base de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *K. marxianus* subsp. *fragilis* (L-4 UCLV) mejoró la colonización del tracto digestivo de estos microorganismos, encontrando similitud de características morfológicas entre las cepas intestinales y las cepas comerciales suministradas [3, 14, 31, 32].

En cuanto al porcentaje del número de cuyes que presentaron mayor longitud del duodeno, se registró el porcentaje más bajo en el tratamiento control, con (14,64 %) al d 45 y (8,17 %) al d 90 de edad de los cobayos, encontrando mayor porcentaje en aquellos animales que fueron suplementados con los bioaditivos: Lev (11,30 % a los 45 d y 7,15 % a los 90 d) y en B+L (11,16 % al d 45 y 6,96 % al d 90).

Con respecto a las evaluaciones histomorfométricas de los tejidos intestinales de cuyes, en la TABLA IV se presentan los resultados obtenidos a los 45 y 90 d de edad, encontrando mayor diferencia estadística ($P < 0,05$) en el d 45 de edad de los cuyes en todas las variables de morfometría intestinal sobre todo a nivel del duodeno,

con excepción de la longitud de vellosidades / profundidad cripta Lieberkühn. Los valores más altos se registraron en cuyes que recibieron los bioaditivos a través del alimento.

Datos similares son reportados en diversos estudios, donde se refiere que las bacterias ácido-lácticas, evitan la toxicidad sobre las membranas del intestino de los animales mejorando las variables de morfometría intestinal [7, 9, 33].

En la TABLA V se presenta la carga microbiana detectada a partir del hisopado rectal en los diferentes medios de cultivo. En la evaluación realizada en cuyes al momento del destete, se registró diferencia significativa en el conteo celular ($P < 0,05$) entre tratamientos; siendo mayor la carga microbiana en las placas que contenían MRS, M17 y AS de las muestras provenientes de los tratamientos Bal y Lev, frente al grupo control. Mientras que, en las placas que contenían el medio de cultivo general (AN) la carga microbiana no varió entre tratamiento.

TABLA IV
Variables histomorfométricas a los 45 y 90 días de edad de los cuyes en experimentación

Indicadores	Edad, d	Tratamientos, (n=7/grupo)				EE	P-valor
		Ctrl	Bal	Lev	B+L		
Duodeno, μm							
Longitud vellosidades	45	443,2 ^c	548,4 ^b	576,8 ^{ab}	586,7 ^a	0,07	0,112
	90	735,2 ^a	873,1 ^a	884,3 ^a	893,6 ^a	0,12	0,058
Ancho vellosidades	45	97,6 ^c	112,3 ^b	119,4 ^b	121,4 ^a	0,11	0,035
	90	155,3 ^a	187,6 ^a	189,2 ^a	188,9 ^a	0,13	0,053
Ancho cripta Lieberkühn	45	42,3 ^b	48,5 ^b	50,4 ^a	51,1 ^a	0,05	0,049
	90	89,8 ^c	113,7 ^b	115,8 ^b	128,5 ^a	0,08	0,007
Profundidad cripta Lieberkühn	45	213,2 ^b	264,3 ^{ab}	273,2 ^a	269,2 ^a	0,10	0,004
	90	315,2 ^b	463,1 ^a	456,7 ^a	464,5 ^a	0,06	0,012
Longitud de vellosidades / profundidad cripta Lieberkühn	45	2,08 ^a	2,07 ^a	2,11 ^a	2,18 ^a	0,06	0,056
	90	2,33 ^a	1,89 ^a	1,94 ^a	1,92 ^a	0,08	0,059
Yeyuno, μm							
Longitud vellosidades	45	410,3 ^b	538,7 ^{ab}	563,1 ^a	572,2 ^a	0,13	0,038
	90	798,1 ^b	987,3 ^a	991,3 ^a	982,2 ^a	0,08	0,012
Ancho vellosidades	45	143,4 ^a	155,3 ^a	158,6 ^a	160,1 ^a	0,06	0,058
	90	188,2 ^c	312,7 ^b	319,5 ^b	356,8 ^a	0,09	0,009
Ancho cripta Lieberkühn	45	42,8 ^a	52,3 ^a	58,2 ^a	57,8 ^a	0,10	0,054
	90	102,6 ^b	138,9 ^a	143,8 ^a	144,2 ^a	0,12	0,039
Profundidad cripta Lieberkühn	45	173,6 ^a	189,7 ^a	195,9 ^a	191,7 ^a	0,10	0,052
	90	375,2 ^b	452,3 ^a	461,7 ^a	469,2 ^a	0,11	0,008
Longitud de vellosidades / profundidad cripta Lieberkühn	45	2,39 ^a	2,84 ^a	2,87 ^a	2,98 ^a	0,08	0,082
	90	2,13 ^a	2,18 ^a	2,15 ^a	2,09 ^a	0,03	0,213
Íleon, μm							
Longitud vellosidades	45	362,3 ^a	401,6 ^a	408,3 ^a	411,8 ^a	0,08	0,053
	90	703,6 ^c	912,5 ^b	918,7 ^a	921,3 ^a	0,12	0,012
Ancho vellosidades	45	119,4 ^a	146,3 ^a	151,4 ^a	157,3 ^a	0,03	0,054
	90	298,2 ^a	287,2 ^a	291,4 ^a	288,6 ^a	0,06	0,612
Ancho cripta Lieberkühn	45	45,3 ^a	58,2 ^a	56,9 ^a	59,4 ^a	0,09	0,354
	90	102,1 ^a	112,3 ^a	118,5 ^a	116,8 ^a	0,11	0,087
Profundidad cripta Lieberkühn	45	155,7 ^a	172,9 ^a	169,1 ^a	173,4 ^a	0,08	0,073
	90	296,5 ^b	362,5 ^a	379,8 ^a	388,9 ^a	0,07	0,021
Longitud de vellosidades / profundidad cripta Lieberkühn	45	2,33 ^a	2,32 ^a	2,41 ^a	2,37 ^a	0,03	0,124
	90	2,37 ^a	2,52 ^a	2,42 ^a	2,3 ^a	0,08	0,342

^{a, b, c}: Las letras en superíndice diferentes en la misma fila difieren a $P < 0,05$, mediante la comparación de proporciones medias. Ctrl: control dieta basal sin aditivo. Bal: dieta basal + probiótico fermentado con *Lactobacillus acidophilus*. Lev: dieta basal + probiótico fermentado con *Kluyveromyces marxianus* subsp. *fragilis*. B+L: dieta basal + probiótico fermentado con *L. acidophilus* y *K. marxianus* subsp. *fragilis*. EE: error estándar. d: días

TABLA V
Carga microbiana rectal de cuyes de 45 y 90 días de edad, en diferentes medios de cultivo

Edad, d	Medios de cultivos	Tratamientos, (n=10/grupo)				EE	P-valor
		Ctrl*	Bal*	Lev*	B+L*		
45	MRS	5,89 ^b	7,07 ^a	7,15 ^a	7,45 ^a	0,10	0,011
	M17	5,47 ^b	7,15 ^a	6,95 ^a	7,1 ^a	0,13	0,005
	AN	6,37 ^a	6,12 ^a	6,97 ^a	7,2 ^a	0,11	0,062
	AS	2,37 ^c	4,40 ^b	6,07 ^a	6,17 ^a	0,12	<0,001
	MacConkey	6,87 ^a	3,30 ^b	3,52 ^b	3,72 ^b	0,12	0,007
90	MRS	4,77 ^b	6,02 ^a	6,11 ^a	6,21 ^a	0,11	<0,001
	M17	3,97 ^b	7,02 ^a	6,98 ^a	7,1 ^a	0,12	<0,001
	AN	6,31 ^a	6,1 ^a	6,03 ^a	6,13 ^a	0,10	0,301
	AS	3,01 ^a	3,04 ^a	3,98 ^a	4,1 ^a	0,08	0,081
	MacConkey	7,87 ^a	5,07 ^b	3,01 ^c	3,15 ^c	0,12	<0,001

^{a, b, c}: Superíndices diferentes en las barras difieren a $P < 0,05$, según Duncan (1955). Ctrl, control dieta basal sin aditivo. Bal, dieta basal + probiótico fermentado con *Lactobacillus acidophilus*. Lev, dieta basal + probiótico fermentado con *Kluyveromyces marxianus* subsp. *fragilis*. B+L, dieta basal + probiótico fermentado con *L. acidophilus* y *K. marxianus* subsp. *fragilis*. d: días. EE: error estándar. AN: agar nutriente. AS: agar Sabouraud. *: Estos valores corresponden a escalas logarítmicas (\log^{-1})

Se ha reportado que las características morfo-tintoriales de las células crecidas en los diferentes medios de cultivo, pueden correlacionarse con la implantación en los diferentes segmentos del tracto digestivo de los microorganismos introducidos con la dieta. La utilización de aditivos probióticos a base de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *K. marxianus* subsp. *fragilis* (L-4 UCLV), en cerdas reproductoras y sus crías permitió la colonización intestinal de estos microorganismos, que presentaron características morfológicas similares a las bacterias propias del intestino [3, 27, 28].

Las BAL son Gram positivas, ácido tolerante, soportan rangos de pH entre 4,8 y 9,6, lo que les permite sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no lo soportarían [26, 33], su colonización inicial es de gran importancia para la composición final de la flora permanente en adultos [10]; mientras que, las bacterias ácido-lácticas, no lácticas y levaduras benéficas deben de sobrevivir a las condiciones ambientales del tracto digestivo hasta llegar al colon y mantenerse el tiempo suficiente para ejercer su efecto beneficioso como probiótico [5]; supuesto que fue corroborado en el presente estudio al obtener mayor carga microbiana en placas Petri que contenían medios selectivos de crecimiento para bacterias ácido-lácticas (*L. acidophilus*) y levaduras (*K. marxianus* subsp. *fragilis* L-4 UCLV) al cultivar las muestras provenientes del hisopado en cuyes.

CONCLUSIÓN

La inclusión de bioaditivos con acción probiótica en la alimentación de cuyes, influye de forma positiva sobre las variables de morfometría intestinal e incrementa el nivel de colonización de microorganismos benéficos a nivel del intestino disminuyendo significativamente la carga de microorganismos patógenos.

Conflicto de interés

Los autores declaran no presentar conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug. Resist.* [Internet]. 2015; 8:49-61. doi: <https://doi.org/gkkmzm>
- Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* [Internet]. 2015; 33(10):692-699. doi: <https://doi.org/f2wkvd>
- Miranda-Yuquilema J, Taboada J, Once V, Coyago M, Briñez W. Effect of agroindustrial waste substrate fermented with lactic acid bacteria and yeast on changes in the gut microbiota of guinea pigs. *Microorganisms* [Internet]. 2024; 12(1):133. doi: <https://doi.org/g8t3c4>
- Gatica-Eguiguren MA, Rojas H. Gestión sanitaria y resistencia a los antimicrobianos en animales de producción. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* [Internet]. 2018; 35(1):118-125. doi: <https://doi.org/g8t3c5>
- Kamruzzaman SM, Kabir SML, Rahman MM, Islam MW, Reza MA. Effect of probiotics and antibiotic supplementation on body weight and haemato-biochemical parameters in broilers. *Bangl. J. Vet. Med.* [Internet]. 2005; 3(2):100-104. doi: <https://doi.org/g8t3c6>
- Hou Q, Zhao F, Liu W, Lv R, Thwe-Khine WW, Han J, Sun Z, Lee YK, Zhang H. Probiotic directed modulation of gut microbiota is basal microbiome dependent. *Gut Microbes* [Internet]. 2020; 12(1):1736974. doi: <https://doi.org/gpxw6f>
- Ampuero-Riega J, Morales-Cauti S. Determinación de residuos de antibióticos en músculo, hígado y riñón de cuyes comercializados en cuatro ciudades del Perú. *Rev. Investig. Vet. Perú* [Internet]. 2021; 32(1):e19508. doi: <https://doi.org/nv9g>
- Tellez G, Pixley C, Wolfenden RE, Layton SL, Hargis BM. Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. *Food Res. Int.* [Internet]. 2012; 45(2):628-633. doi: <https://doi.org/bb3tgb>
- Ciro-Galeano JA, López-Herrera A, Parra-Suescún J. La adición de cepas probióticas modula la secreción de mucinas intestinales en ileon de cerdos en crecimiento. *Rev. CES Med. Vet. Zootec.* [Internet]. 2015 [consultado 12 May. 2024]; 10(2):150-159. Disponible en: <https://goo.su/XK0Ejbe>
- Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aiello V, Romano B, De Lorenzo A, Izzo AA, Capasso R. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients* [Internet]. 2019; 11(11):2690. doi: <https://doi.org/gmctqd>

- [11] Ahmed ST, Hoon J, Hong-Seok M, Chul-Ju Y. Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus* based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *Afr. J. Microbiol. Res.* [Internet]. 2014;8(1):96-104. doi: <https://doi.org/g8t3c7>
- [12] Gimeno-Fórner L, Gimeno-Fórner LO, Cejalvo-Lapeña D, Calvo-Bermúdez MA, Bolant-Hernández B, Lloris-Carsí JM. Anestesia en el Animal de Laboratorio. Parte 2 Valencia. *Res. Surgery.* [Internet]. 1990 [consultado 12 May. 2024]; (5):36-44. Disponible en: <https://goo.su/nlRywgW>
- [13] Miranda-Yuquilema JE, Marin-Cárdenas A, Valle-Cepeda A, Barros-Rodríguez M, Marrero-Suárez LI, Hidalgo-Almeida L, Rivera-Guerra V. Wastes of agroindustry an alternative to develop biopreparates with probiotic capacity. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* [Internet]. 2018;21(1):46-52. doi: <https://doi.org/g8t3c8>
- [14] Miranda-Yuquilema J, Taboada-Pico J, Briñez-Briñez W. Efecto de bioaditivos en indicadores bioproducidos de cobayas (*Cavia porcellus*) nuliparas y sus crías. *Rev. MVZ Córdoba* [Internet]. 2024;27(3): e2547. doi: <https://doi.org/g8t3c9>
- [15] National Research Council (NRC). Nutrient requirements of poultry. 10th Rev. ed. Washington, DC: The National Academies; 2012. 450 p.
- [16] Cornejo-Espinoza JG, Rodríguez-Ortega LT, Pro-Martínez A, González-Cerón F, Conde-Martínez VF, Ramírez-Guzmán ME, López-Pérez E, Hernández-Cázares AS. Efecto del ayuno ante mortem en el rendimiento de la canal y calidad de la carne de conejo. *Arch. Zootec.* [Internet]. 2016 [consultado 12 Mar. 2024]; 65(250):171-175. Disponible en: <https://goo.su/3R4NrA>
- [17] Sánchez-Macías D, Cevallos-Velastegui L, Nuñez-Valle D, Morales-delaNuez A. First report of *postmortem* pH evolution and *rigor mortis* in guinea pigs. *Livest. Sci.* [Internet]. 2019; 229:22-27. doi: <https://doi.org/g8t3db>
- [18] Norma Oficial Mexicana. NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres [Internet]. Ciudad de México: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; 1996 [consultado 12 Mar. 2024]. 18 p. Disponible en: <https://goo.su/NGhmlS>
- [19] Mejía-Medina J, Rincón-Ruiz J, Gutiérrez-Vergara C, Correa-Londoño G, López-Herrera A, Parra-Suescún J. Valoración de parámetros clínicos y lesiones en órganos de cerdos durante el período posdestete. *Acta Agron.* [Internet] 2012; [consultado 12 Mar. 2024]; 61(1):61-68. Disponible en: <https://goo.su/ozDzf>
- [20] Mohamed MA, El-Daly EF, El-Azeem NA, Youssef A, Hassan HMA. Growth performance and histological changes in ileum and immune related organs of broilers fed organic acids or antibiotic growth promoter. *Int. J. Poult. Sci.* [Internet] 2014;13(10): 602-610. doi: <https://doi.org/g8t3dc>
- [21] Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. 4th ed. New York (USA): Cambridge University Press; 2000. 178 p.
- [22] Canal A, Cubillos V, Zamora J, Reinhardt G, Paredes E, Ildelfonso R, Alberdi A. Lesiones macro y microscópicas de intestino delgado de cerdos neonatos sin calostrar inoculados experimentalmente con cepas de *E. coli* fimbriadas. *Arch. Med. Vet.* [Internet]. 1999; 31(1):69-79. doi: <https://doi.org/d8jknq>
- [23] Kandler O, Weiss N. Regular nonsporng Gram-positive rods. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 10th ed. Baltimore (USA): Williams and Wilkins; 1986. p.1208-1234.
- [24] Steel R, Torrie J, Dickey D. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd ed. New York (USA): McGraw Hill; 1997. 666 p.
- [25] Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* [Internet]. 1955; 11(1):1-42. doi: <https://doi.org/fhcz8h>
- [26] Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: a review. *J. Food Drug Anal.* [Internet]. 2018; 26(3):927-939. doi: <https://doi.org/gfzjrv>
- [27] Khailova L, Baird CH, Rush AA, McNamee EN, Wischmeyer PE. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves outcome in experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: Potential role of regulatory T cells. *Shock* [Internet]. 2013; 40(6):496-503. doi: <https://doi.org/g8t3dd>
- [28] Alcon-Giner C, Dalby MJ, Caim S, Ketskemety J, Shaw A, Sim K, Lawson MAE, Kiu R, Leclaire C, Chalklen L, Kujawska M, Mitra S, Fardus-Reid F, Belteki G, McColl K, Swann JR, Kroll JS, Clarke P, Hall LJ. Microbiota supplementation with *bifidobacterium* and *Lactobacillus* modifies the preterm infant gut microbiota and metabolome: An observational study. *Cell Rep. Med.* [Internet]. 2020; 1(5):100077. doi: <https://doi.org/fv3j>
- [29] Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* [Internet]. 2017; 4:14. doi: <https://doi.org/gktjhb>
- [30] Mukherjee S, Hanidziar D. More of the gut in the lung: how two microbiomes Meet in ARDS. *Yale J. Biol. Med.* [Internet]. 2018 [consultado 25 Abr. 2024]; 91(2):143-149. PMID: 29955219. Disponible en: <https://goo.su/ztSc>
- [31] Al-Dury S, Marschall HU. Ileal bile acid transporter inhibition for the treatment of chronic constipation, cholestatic pruritus, and NASH. *Front. Pharmacol.* [Internet]. 2018; 9:931. doi: <https://doi.org/gd8whr>
- [32] Araújo MM, Sousa TMM, Teixeira PC, Figueiredo ACMG, Botelho PB. The effect of probiotics on postsurgical complications in patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* [Internet]. 2023;81(5):493-510. doi: <https://doi.org/g8t3df>
- [33] Etareri-Evivie S, Abdelazez A, Li B, Bian X, Li W, Du J, Huo G, Liu F. *In vitro* organic acid production and *in vivo* food pathogen suppression by probiotic *S. Thermophilus* and *L. Bulgaricus*. *Front. Microbiol.* [Internet]. 2019;10:782. doi: <https://doi.org/g8t3dg>