

ARTICULO INVESTIGATIVO

LOS EQUIBIOTICOS: UN NUEVO TIPO DE FITOMEDICAMENTO PARA INDUCIR EL BALANCE DE LA MICROBIOTA Y EVITAR LA DISBIOSIS

EQUIBIOTICS: A NEW TYPE OF PHYT MEDICINE TO INDUCE THE BALANCE OF THE MICROBIOTA AND AVOID DYSBIOSIS

TRABAJO PRESENTADO EN EL EVENTO CNIC PRONAT 2022



Xavier Lozoya Legorreta[†] * (<https://orcid.org/0000-0002-3861-6965>)

Maricela Gascón Muro^a (<https://orcid.org/0000-0001-8208-9261>)

Juan Agüero Agüero^a (<https://orcid.org/0000-0002-3882-5521>)

^a Phytomedicamenta SA Grupo de Investigación y Desarrollo, Ciudad de México, México.

*[†] javierlozoyalegorreta@gmail.com.

Recibido: 22 de octubre de 2022;

Aceptado: 23 de noviembre de 2022;

RESUMEN

Los estudios que abordan el papel que juegan los microorganismos en el mantenimiento de la salud de los seres humanos han demostrado, en los últimos años, que existe una relación permanente de coexistencia funcional beneficiosa entre las células de determinados sistemas del cuerpo humano y los microorganismos del medio ambiente. Las evidencias sobre las funciones que cumplen los ecosistemas que forman los microorganismos presentes en la piel, el tracto gastrointestinal y los sistemas respiratorio o genitourinario, han dado paso a la actual nueva explicación sobre la relación vital que existe entre el Genoma Humano y el Microbioma Humano para conservar el equilibrio funcional o homeostasis requerida en todo individuo sano. La pérdida de ese equilibrio funcional o disbiosis explica las alteraciones del cuerpo humano que se manifiestan como trastornos infecciosos, inflamatorios, inmunológicos y metabólicos, entre otros muchos padecimientos. Se describen los estudios realizados sobre un producto natural elaborado con la mezcla de dos extractos de plantas medicinales que habían sido considerados, tradicionalmente, con una gran actividad 'antimicrobiana'. El trabajo realizado describe la utilidad de un fitomedicamento formulado a partir del extracto completo de hojas de *Psidium guajava* y de raíces de *Coptis chinensis* para el tratamiento de la dispepsia digestiva, con gastritis crónica y disfunciones intestinales comunes y frecuentes en la población. Mediante estudios preclínicos y clínicos se comprobó que estos extractos inhiben y evitan la fijación y proliferación de las cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a los antibióticos y, al mismo tiempo, favorecen el aumento y la diversidad de las familias de microorganismos benéficos presentes normalmente en el microbiota intestinal. Se demuestra que estos extractos de plantas conocidos y utilizados durante siglos por las medicinas tradicionales en diversos países juegan un papel importante en la preservación y el fortalecimiento del equilibrio o balance de las microbiotas, configurando una nueva categoría de productos medicinales de origen natural denominados Equibioticos.

Palabras claves: *Psidium guajava*, *Coptis chinensis*, Equibiotico, disbiosis, gastritis, *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

Studies that address the role played by microorganisms in maintaining the health of human beings have shown, in the last years, that there is a permanent relationship of beneficial functional coexistence between the cells of certain systems of the human body and the microorganisms of the environmental setting. The evidence on the signal interactions of the microbiota ecosystems in the skin, the gastrointestinal track, and respiratory or genitourinary systems, has given way to explain the vital relationship that exists between the Human Genome and the Human Microbiome, the set of genes of microorganisms that are signally permanently in the body of every healthy individual. The loss of functional balance between these systems gives rise to the phenomenon called dysbiosis, which explains the functional alterations manifest as infectious, inflammations, immunological and metabolic disorders of the human body. The studies reported describe the products made with mixtures of medicinal plant extracts that have a great synergistic activity inhibiting proliferation of pathogenic strains and, at the same time, promoting the increase and diversity of beneficial strains present in the microbiota of each person. These plant extracts known and used for centuries by traditional herbal medicines have an important role in preserving and strengthening the balance of the microbiota ecosystems, particularly those of the digestive tract system where they are applied. The work carried out describes the usefulness of a product formulated from complete extracts of *Psidium guajava* leaves and *Coptis chinensis* roots in the treatment of gastric, and intestinal dysfunctions, creating a new category of phytodrugs named Equibiotics.

Keywords: *Psidium guajava*, *Coptis chinensis*, Equibiotics, dysbiosis, gastritis, *Helicobacter pylori*.

INTRODUCCION

Los recientes estudios en genética microbiana han puesto de manifiesto la existencia de una relación biológica positiva, permanente e indispensable, entre los microbios del medio ambiente natural y otros seres vivos. Los primeros estudios realizados sobre los microbios que habitualmente se localizan en algunos de los tejidos del ser humano partieron de la detección temprana de su presencia en el intestino grueso y en las heces fecales, lo que abrió paso a la exploración de su posible participación en el proceso de la digestión. Estudios subsecuentes dieron paso al descubrimiento y comprensión de la existencia de un muy numeroso conjunto de familias de microorganismos habitando en las mucosas de todo el tracto digestivo y cuya presencia resultaba indispensable para su buen funcionamiento. Descubrimiento fundamental, que se dio en el medio de la industria alimentaria y que contravenía a la idea casi, universalmente aceptada, de que la presencia de microbios en algún lugar del cuerpo humano solo implicaba el riesgo de haber contraído una enfermedad infecciosa. Esta circunstancia llevó a los productores de alimentos a inventar el extraño término de “flora intestinal” para describir la presencia útil de microorganismos en el aparato digestivo y promover la utilización de ciertos productos, como los lactobacilos, que benefician el proceso digestivo. (Sebastián Domingo JJ., et al., 2018)

Por otra parte, el conocimiento posteriormente adquirido y los novedosos procedimientos para determinar las características del Genoma Humano, pronto se aplicó al estudio genético de ese universo de microorganismos, detectándose su presencia no solo en el tracto digestivo sino también en el aparato respiratorio, el genitourinario y en la piel. Estos millones de microorganismos presentes en las regiones del cuerpo que mantienen contacto con el medio exterior atmosférico, exceden en número al de las células de los tejidos donde se alojan y se encuentran en una relación que, hasta hace poco, era denominada en la microbiología clásica como ‘simbiótica’. Es decir, de mutuo beneficio para los microorganismos y para el tejido ‘huésped’ donde se encuentran. Actualmente, la interpretación de tan importante convivencia biológica ha evolucionado mucho más; habitualmente conviven en un mismo “ecosistema” cerca de 10^{14} microbios junto con 10^{13} células de las mucosas de las áreas de contacto e interacción. En estos sitios, millones de colonias de muy diversas familias microbianas se alojan permanentemente estableciendo un sistema de comunicación molecular con las células humanas en una interacción, no solo normal, sino indispensable para el buen funcionamiento del cuerpo humano en su conjunto. (Sender R, et al. 2016)

Por lo consiguiente, en este novedoso campo de investigación, se define a un ecosistema como la unidad funcional compuesta por un conjunto de microbios específicos (*microbiota*) en interacción con un conjunto de células humanas (*tejido epitelial*), que comparten un *hábitat* (condiciones fisicoquímicas específicas) que garantiza su mutua interacción. El comportamiento de los microbios y el de las células está determinado por su respectivo contenido genético; por ello, al conjunto genético microbiano detectable en cada individuo se le denomina Microbioma humano, mientras que el Genoma Humano corresponde al contenido genético de sus células.

La interacción molecular o ‘comunicación’ de estos dos grandes sistemas da origen a la nueva interpretación que hoy se tiene sobre la Homeostasis o “equilibrio funcional” que caracteriza al cuerpo humano sano. Al mismo tiempo, se aplica el término Disbiosis al desbalance o desequilibrio biológico de esta interacción, para explicar el origen y causa de múltiples disfunciones crónicas, padecimientos o infecciones que actualmente están siendo reinterpretados. (Alarcón P, et al. 2016)

La formación de microbiotas específicas en cada ser humano se origina a partir de su nacimiento y primera exposición del cuerpo al medio atmosférico de su entorno. El Genoma Humano heredado en el recién nacido entra en inmediata interacción con la microbiota genitourinaria materna durante el proceso del parto y después, con el resto del entorno físico-biológico dependiendo de múltiples factores como son: el proceso de lactancia y ulterior alimentación, el contacto físico con la madre y otros humanos y animales, las características ecológicas del sitio donde se nació y se crece y, posteriormente, depende de múltiples factores, los usos y costumbres alimenticias, el lugar en donde se habita, el tipo y sitio de las actividades cotidianas, el nivel educativo y las costumbres sociales e higiénicas que se adoptan, etcétera. (Yatsunenkov T, et al. 2012)

Cada conjunto de colonias microbianas en el aparato digestivo no solo transforma químicamente los alimentos que allí se encuentran, propiciando la adecuada asimilación de algunos nutrientes tanto para ellas como para las células humanas, sino que, también, sintetizan compuestos bioactivos (moléculas mensajeras que informan de procesos, que alertan respuestas inmunológicas frente a variantes patogénicas, activan genes, etc.) y que, una vez establecida la cadena de señales, actúan a distancia sobre otros órganos del cuerpo humano para generar el estado de equilibrio, producto de la convivencia autorregulada que denominamos: “estar sano”. (Grenham S, et al. 2011)

Cuando se altera ese equilibrio, las consecuencias sobre el organismo humano son inmediatas. Por ejemplo, en la boca, la alteración en el contenido y proporción de la microbiota local producirá alteraciones con trastornos como son: la halitosis, la inflamación del tejido, las caries dentales, la periodontitis; en el estómago, el desequilibrio generará: gastritis, acidez estomacal, úlceras e inflamación; en el intestino, la disbiosis provocará: diarrea, colitis, mala absorción, inflamación e infecciones crónicas, etc. Las alteraciones en la microbiota

intestinal darán origen a condiciones disfuncionales actualmente muy comunes, como el síndrome de colon irritable, la diarrea crónica, el estreñimiento, la diverticulitis, que, con el tiempo, dan paso a padecimientos más complejos como la obesidad, alteraciones del metabolismo y diversos trastornos del sistema nervioso central. Otro tanto puede decirse de la microbiota respiratoria, de la cutánea y la genitourinaria y de las consecuencias que su alteración o desequilibrio provocan en la generación de padecimientos comunes; no obstante, se reconoce que la microbiota del tracto digestivo juega un papel primordial para entender el funcionamiento de todo el Microbioma Humano.

Por otra parte, el anterior paradigma infeccioso de mantener la salud del cuerpo humano en condiciones casi asépticas, mediante la aniquilación sistemática de los microbios patógenos, utilizando potentes antibióticos y antisépticos de todo tipo, ha resultado contraproducente. Hoy se observa en todo el mundo la reaparición de padecimientos infecciosos que, si bien antes eran controlados con antibióticos, ahora resultan ineficaces debido a la formación de cepas microbianas resistentes a estos medicamentos y, también, por el surgimiento de variantes genéticas de microbios patógenos antes inexistentes. Pero, además, porque también ocurrieron cambios y excesos en la producción industrializada de alimentos (cárnicos, lácteos, cereales y verduras) al haber incorporado en su elaboración el uso de hormonas, antibióticos, antisépticos, antioxidantes y preservativos químicos de toda índole. Ello ha provocado importantes cambios en las microbiotas de los animales y los vegetales, que afectan, a su vez a las poblaciones humanas. Aunado a esto, la contaminación ambiental atmosférica, los frecuentes trastornos biológicos que se observan por la rápida y masiva transportación humana y de convivencia temporal en diferentes ecologías y ámbitos de la sociedad actual, también han contribuido a la disbiosis de los colectivos, convirtiéndola en el origen de múltiples padecimientos crónicos y alteraciones funcionales. (Lynch SV, et al. 2016)

Así, todo parece indicar que, una gran parte de los padecimientos más comunes de la población actual del mundo se debe, en gran medida, a la alteración en la constitución de las microbiotas. Algunas se manifiestan como trastornos del metabolismo (diabetes, obesidad, desnutrición), otras como padecimientos del sistema nervioso central (insomnio, enfermedad de Alzheimer, demencia, retraso mental, estrés crónico) o como descontrol del sistema nervioso autónomo (disritmias respiratoria y cardíaca, asma) o alteraciones del sistema inmunológico (inmunodeficiencias, alergias). El equilibrio entre el microbioma y el genoma humano está siendo alterado en las poblaciones de todo el mundo.

En las últimas décadas, han surgido opciones que buscan mejorar las condiciones de la microbiota intestinal de grandes colectivos humanos. Los llamados *prebióticos* (nutrientes específicos para los microbios del tracto digestivo) han ido adquiriendo importancia en la producción de alimentos funcionales que benefician al organismo gracias a la estimulación del crecimiento y la actividad de determinadas cepas de bacterias presentes en el intestino. De igual manera los llamados *probióticos*, alimentos adicionados con microorganismos vivos que permanecen activos en el intestino, ejercen importantes efectos sobre la adecuada constitución de la microbiota del aparato digestivo. Finalmente, en la constante búsqueda de nuevos productos para el tratamiento de infecciones crónicas provocadas por microorganismos patógenos se ha planteado la necesidad de encontrar recursos que prevengan o restablezcan el desequilibrio del ecosistema microbiótico.

En el presente trabajo se describe un hallazgo reciente, sobre la utilidad de determinados extractos vegetales obtenidos de plantas medicinales de ancestral uso por la población, para el manejo de los procesos disbióticos del aparato digestivo y que, al comprobar su peculiar efecto sobre la microbiota del tracto digestivo, los hemos denominado *Equibióticos*, para enfatizar el hecho de que inducen la recuperación del equilibrio en la microbiota alterada. (Lozoya X., et al. 2012)

Nuestro grupo ha desarrollado un primer producto denominado Equibiótico-GI (Gastro-Intestinal) para el tratamiento de la disbiosis del aparato digestivo cuando se manifiesta clínicamente como dispepsia crónica funcional cuyos síntomas más comunes son: episodios de acidez estomacal, gastritis, eructos, distensión del estómago, flatulencia, sensación de plenitud o presión abdominal, náusea y vómito. La disfunción crónica suele acompañarse de episodios alternados de estreñimiento o de diarrea aguda, de colitis por inflamación permanente del intestino grueso y formación de hemorroides. Con frecuencia, en la medicina actual, este estado de dispepsia suele asociarse a la infección provocada por la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*, especialmente de cepas resistentes a los antibióticos usados en el tratamiento convencional. A continuación, se describen los estudios realizados que llevaron al desarrollo del Equibiótico-GI para el tratamiento de la mencionada dispepsia.

METODOLOGÍA y RESULTADOS

El Equibiótico-GI está compuesto de dos extractos obtenidos de las plantas medicinales *Psidium guajava* L., y *Coptis chinensis* Franch., como una mezcla químicamente estandarizada en el contenido de algunos de sus respectivos compuestos activos y formulada farmacéuticamente como una suspensión para su administración por la vía oral.

Tanto el extracto obtenido de las raíces de *Coptis chinensis* como el extracto obtenido de las hojas de *Psidium guajava*, son ampliamente conocidos y utilizados, por separado, en diversas partes del mundo para la elaboración de fitomedicamentos útiles en el tratamiento de padecimientos digestivos dado que sus propiedades farmacológicas han sido calificadas como: antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y espasmolíticas, entre otras. Es extensa la bibliografía científica de los últimos 10 años para estos dos extractos provenientes de plantas con amplio uso popular tradicional para combatir molestias digestivas. Los extractos completos, son considerados seguros y sin efectos tóxicos de acuerdo con los diversos estudios toxicológicos reportados para cada uno en la literatura científica. (FHM, 2015; WHO, 1999)

Con base en la información bibliográfica química y farmacológica existente sobre ambas plantas se desarrolló la formulación como fitomedicamento de aplicación oral elaborado a base del extracto hidroglicólico de hojas de *Psidium guajava* estandarizado químicamente en su contenido de glicósidos flavónicos (derivados de la quercetina) y el extracto de raíces de *Coptis chinensis* estandarizado en su contenido de isoquinolinas (derivados de berberina). Inicialmente, tanto la mezcla de extractos presente en la formulación como cada uno de los extractos por separado fueron sometidos a los estudios requeridos para conocer si poseían algún efecto sobre la bacteria *Helicobacter pylori*. Se realizaron los estudios que permitieran evaluar el efecto de los extractos elegidos sobre cultivos *in vitro* de la bacteria *Helicobacter pylori* utilizando cepas resistentes a los antibióticos. Para evaluar las propiedades descritas en la literatura como ‘antimicrobianas’ para los extractos mencionados, se realizaron cultivos *in vitro* de *H. pylori*, en un medio de gelosa/sangre de carnero al 5% y se incubaron a 37°C con 9% de CO₂ en condiciones de alta humedad durante 24 h. Después del período de incubación, se cosecharon los cultivos y las cepas se re-suspendieron para que continuaran reproduciéndose en tubos Eppendorf con 1 mL de medio de cultivo F-12 (GIBCO® 11765).

Por otra parte, los extractos de las plantas fueron previamente disueltos en DMSO, centrifugados y filtrados para obtener su homogeneidad total al ser mezclados con el medio de cultivo Muller Hinton en el que, a continuación, fueron sembradas las colonias de *H. pylori* para medir su proliferación durante el período de incubación a 37°C con 9% de CO₂ y condiciones controladas de humedad. Se evaluó la capacidad de los extractos vegetales de impedir o inhibir el crecimiento de las colonias al ser agregados al medio en diferentes dosis. Primeramente, se determinó la propiedad inhibidora del crecimiento bacteriano de los extractos de *Psidium* (extracto A) y de *Coptis* (extracto B) cada uno por separado. De cada uno de ellos se probaron diversas concentraciones de acuerdo con valores descritos en la literatura para productos naturales con aceptable potencialidad ‘antimicrobiana’ para este tipo de pruebas. A continuación, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en cada caso, definida ésta como la concentración más baja de extracto que inhibió en 100% el desarrollo de las colonias de *H. pylori*. La primera lectura se realizó a las 48 horas de incubación y la segunda se efectuó transcurridos los 2 días que duró cada observación.

Los resultados mostraron que ambos extractos impedían el crecimiento de todas las cepas de *H. pylori* en dosis (CIM) relativamente bajas (0.2 a 0.8 mg/mL). Se procedió, entonces, a la realización de la misma prueba con diversas combinaciones de ambos extractos, a fin de detectar el efecto sinérgico que se esperaba con la mezcla. Se ensayaron mezclas de A y B en distintas proporciones y los resultados obtenidos mostraron que algunas de las mezclas de A/B tenían un potente efecto sinérgico inhibitor del crecimiento de las bacterias; su CIM se redujo de 500 a 1000 veces en comparación con las concentraciones requeridas de los extractos aplicados por separado. En la Tabla I se muestra la capacidad de los extractos y sus mezclas de inhibir el crecimiento de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos cultivadas *in vitro*.

Tabla I. Los valores de CIM se expresan en mg/mL y corresponden al 100% de inhibición del crecimiento de la colonia de *H. pylori*. A-extracto de *Psidium*; B-extracto de *Coptis*; A/B proporción de la mezcla de A y B. El mejor efecto sinérgico se ilustra en las columnas B2/A1 y A5/B2 por la notable reducción de la concentración requerida para lograr el efecto inhibitor del crecimiento.

<i>H. pylori</i>	Extractos		Mezclas de extractos				
Cepas	A	B	A1/B3	A2/B1	B1/A3	B2/A1	A5/B2
266- 95	0.42	0.83	0.1	0.024	0.1	0.024	0.005
2006-702	0.42	0.42	0.024	0.024	0.1	0.024	0.0008
2006-677	0.42	0.83	0.024	0.2	0.024	0.048	0.0008
2006-808	0.42	0.83	0.048	0.1	0.024	0.048	0.005
2006-697	0.42	0.83	0.1	0.024	0.024	0.024	0.0008
2004-203	0.21	0.21	0.2	0.024	0.024	0.024	0.024
2011-130	0.21	0.42	0.1	0.024	0.048	0.024	0.005

Por último, para estudiar el efecto de los extractos, sus mezclas y del producto-GI sobre el proceso de adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica se cultivaron células de mucosa gástrica humana (AGS) propagándolas en botellas de 25 cm² con medio nutricional F-12 y 10% SFB por 48 h a 37°C con 5% de CO₂, hasta que alcanzaron una confluencia celular de 90%. A continuación, se colocaron en cámaras de cultivo celular de 8 pozos conteniendo células AGS y se incubaron durante 18 h a 37°C/5% CO₂. Al iniciar el ensayo se adicionaron a cada uno de los pozos las cepas de *H. pylori* en una proporción de infección de 1:100 y a continuación, a los cultivos de AGS infectados se agregaron los extractos A y B y la mezcla sinérgica A5/B2, con sus respectivos controles. Las cámaras con los cultivos celulares se incubaron a 37°C/5% CO₂ durante 6 h para evaluar el efecto sobre la adherencia de las bacterias y el comportamiento celular. En un segundo ensayo, las cepas de *H. pylori* se incubaron con las células AGS por un período inicial de 3 h para propiciar la total adherencia de la bacteria y, posteriormente, se agregaron los extractos para conocer su efecto durante las siguientes 3 h. Se removió la estructura superior de la cámara de cultivo y las preparaciones se observaron en el microscopio de campo claro Olympus BX44 a un aumento de 40x para realizar las siguientes determinaciones: grado de inhibición de la adherencia (localizada y difusa) de *H. pylori* a las células AGS, presencia de cambios morfológicos en las células AGS y porcentaje de adherencia a las 6 horas de incubación. Los resultados finales se ilustran en la Tabla II.

Tabla II. Efecto de los extractos, su mezcla y del fitomedicamento GI sobre la adherencia de *H. pylori* en células.

Muestras	Adhesión local		Adhesión difusa	
	Efecto preventivo (%)	Efecto inhibidor (%)	Efecto preventivo (%)	Efecto inhibidor (%)
Controles	0	3	0	2
DMSO	2	6	2	6
Extracto A	25	20	15	20
Extracto B	25	20	25	25
Mezcla A5/B2	80	90	75	80
Fitomedicamento GI.	80	90	80	90

AGS a las 6 h de incubación. Los valores se expresan en % de inhibición (local y difusa) de la adherencia de la bacteria a las células gástricas respecto de los controles.

Los resultados mostraron que tanto los extractos A y B como la mezcla A5/B2 y su versión como formulación-GI redujeron la capacidad de adherencia (localizada y difusa) de *H. pylori* de manera lineal en conformidad con la dosis utilizada. La mezcla sinérgica de los extractos mostró mayor eficacia ya que inhibió la adherencia celular con una dosis mucho menor a las requeridas por los extractos por separado; adicionalmente, el efecto preventivo de la adherencia de *H. pylori* fue igualmente intenso. Se confirmó que la formulación-GI, mostró la misma capacidad de evitar la adherencia de la bacteria, equiparable a la observada con la mezcla de origen A5/B2. (Lozoya X, et al. 2015)

En la siguiente etapa, se realizaron los estudios de toxicología básica para conocer la seguridad del producto diseñado y proponer su ensayo en la clínica. Los estudios consideraron los requisitos normativamente establecidos bajo las guías 420 y 474 de la OCDE, tanto de los extractos de origen como de la formulación farmacéutica. Mediante estudios de toxicidad aguda y crónica se analizaron: la bioquímica sanguínea y la variación del peso corporal de los animales bajo estudio y se realizó la evaluación post mortem de todos los animales utilizados, buscando anormalidades macroscópicas y alteraciones histopatológicas en los tejidos. Para el estudio de genotoxicidad se realizó la prueba de micronúcleos en sangre periférica de acuerdo con la normatividad exigida para tales casos. Los resultados obtenidos tras el análisis e integración de todos los datos permitieron concluir que ni los extractos ni el producto farmacéutico desarrollado eran tóxicos a ninguna de las diferentes dosis evaluadas. (Tinoco Méndez M, et al. 2016)

Habiendo sido demostradas tanto la capacidad antiadherente e inhibidora del crecimiento de *Helicobacter pylori* de la formulación-GI in vitro, se procedió a la conducción de un estudio clínico que permitiera demostrar su utilidad como coadyuvante complementario en el tratamiento de la gastritis provocada por *H. pylori*. Para tal fin, se determinó el porcentaje de erradicación de la bacteria en un grupo de pacientes tratado con el triple esquema convencional estándar de antibióticos, comparándolo con otro grupo de pacientes que recibió además de la misma terapia convencional, la administración por vía oral de la formulación -GI. Se realizó un ensayo clínico controlado de fase III, en paralelo, de asignación aleatoria 1:1. Los sujetos de estudio fueron 120 pacientes ambulatorios divididos en dos grupos de 60 personas cada uno. La autorización y cumplimiento de la normatividad obligatoria y su ejecución estuvieron a cargo de las autoridades hospitalarias y de los médicos participantes en el protocolo.

Los criterios de inclusión fueron: edad de 21 a 65 años, de ambos géneros, con diagnóstico de gastritis no ulcerosa definida como dolor constante y molestias abdominales con, al menos, dos meses de antigüedad y en quienes se hubiera descartado mediante endoscopia esófago-gastro-duodenal la presencia de úlcera péptica, esofagitis por reflujo o cáncer. Los criterios de exclusión fueron: consumo anterior cuatro semanas antes del estudio de medicamentos que interfirieran con la identificación de *H. pylori*; el uso previo de antibióticos, antagonistas de H2, bismuto, inhibidores de la bomba de protones o antiinflamatorios no esteroideos; alergia a

alguno de los medicamentos de prueba; cirugía gástrica previa; tratamiento anterior de erradicación de *H. pylori*; insuficiencia renal o hepática y cáncer gástrico.

Todos los pacientes contaron con diagnóstico histológico de gastritis crónica, asociada a infección por *Helicobacter pylori* demostrada mediante cultivo de la muestra endoscópica, por la prueba de aliento y con IgG—anti *H. pylori* positivos. En todos los pacientes incluidos se obtuvo su historia clínica completa donde se consignaron la ingesta de otros medicamentos, antecedentes de tabaquismo, consumo de alcohol y presencia de enfermedades adicionales que no condicionaran su ingreso al estudio.

Las maniobras de intervención fueron: Esquema de Tratamiento A (Convencional): Esquema triple estándar (10 días) con Omeprazol 20 mg c/12 hrs., vía oral; Claritromicina 500 mg c/12 hrs., vía oral; Amoxicilina 1 gr c/12 hrs., vía oral, durante 10 días. Esquema de Tratamiento B (Experimental): Mismo esquema triple estándar de antibióticos y omeprazol, pero además con la formulación denominada Equibiótico-GI (20ml) por vía oral c/12 horas durante los 10 días.

Una vez realizado el protocolo, los criterios de eliminación fueron: dotación insuficiente de medicamentos (80% del total prescrito) y/o incumplimiento del tratamiento (menos del 80% del tiempo determinado). Los resultados obtenidos se ilustran en la tabla III.

Tabla III. Estudio clínico controlado sobre el efecto del Equibiótico-G utilizado como complemento en el tratamiento convencional de la gastritis crónica por *Helicobacter pylori*.

Grupo	Conformación	Mejoría en el cuadro clínico	Efectos adversos	Erradicación de <i>H.pylori</i>
(A) Tratamiento convencional	n=50 (36f/14m) 51 años prom.	58%	70%	60%
(B) Tratamiento convencional + Equibiótico GI	n=52 (40f/12m) 52 años prom.	85%	20%	60%

Los resultados mostraron que el grupo de pacientes que recibió el Equibiótico-GI como complemento del tratamiento convencional tuvo una mucho mejor evolución en comparación con el grupo control. El parámetro de aceptación del tratamiento refleja que, en comparación con el control, el grupo de pacientes que recibió el equibiótico tuvo menos molestias gástricas y menos efectos adversos (dolor de cabeza, náusea, falta de apetito, comunes con el tratamiento antibiótico convencional) y un estado general de rápido bienestar y desaparición de la sintomatología. Las pruebas postratamiento para la detección de *H. pylori* permitieron concluir que en ninguno de los dos grupos se produjo la erradicación de la bacteria. (Lozoya X., et al.2016)

Finalmente, se procedió a realizar una segunda evaluación clínica de las propiedades del Equibiótico-GI en un grupo de voluntarios con antecedentes de dispepsia crónica funcional a los que se les estudiaría el contenido y comportamiento de su microbiota intestinal. Al inicio del estudio se elaboró la historia clínica de cada participante, para conocer los signos y síntomas de la dispepsia y se colectaron las muestras de heces fecales para determinar el genoma de la microbiota intestinal. Al final del tratamiento se entrevistó nuevamente al participante para evaluar su condición clínica y se colectó una segunda muestra de heces fecales para medir los cambios detectados en la configuración genética de la microbiota. El Equibiótico-GI se administró a los participantes como complemento de su alimentación habitual durante 15 días (20mL de la suspensión, por vía oral una vez al día).

Las muestras de microbiota fecal que se obtuvieron de cada participante, previas y posteriores al estudio, fueron procesadas con los métodos establecidos para la obtención del DNA microbiano amplificación por PCR y purificación, determinándose dos niveles de identificación de la microbiota intestinal: 1) por familias microbianas y 2) por géneros microbianos. El ADN bacteriano se extrajo utilizando el kit QIAampDNA (QIAGEN, Hilden). Las concentraciones de ADN se midieron usando un espectrofotómetro Nano Drop V3.8.1. Se amplificó la región V3-V4 del gen de ARNr 16S de cada muestra, se realizaron reacciones de PCR, se mezclaron 50 µl de mezcla maestra compuesta por 13 µl de agua libre de ARNasa / ADNasa y 25 µL de Platinum Super Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA) en tubos individuales. Para la reacción inicial, se añadieron

100 ng de ADN a los pocillos de reacción; a continuación, se adicionaron los primeros (2 μ M) a los tubos correspondientes.

Se establecieron dos PCR diferentes por separado. Las primeras regiones V3-V4 del gen 16S rRNA se amplificaron por PCR utilizando un código de barras. Las condiciones fueron: 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 1 min, 45°C durante 1 min, 72°C durante 30 s. Los amplicones se purificaron usando el QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Valencia, CA), y se cuantificaron utilizando el sistema Qubit (Invitrogen, USA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La segunda PCR consistió en el uso de adaptadores de secuenciación de Illumina, las condiciones de ciclo fueron 95 ° C durante 5 min, seguido por 5 ciclos a 95 ° C durante 1 min, 50 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 1 min. Los productos del PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter, MA). Los productos del PCR se cuantificaron utilizando el sistema Qubit (Invitrogen).

La biblioteca de ADN microbiano fue secuenciada mediante la plataforma Illumina Miseq. Las lecturas directa e inversa de la secuenciación de pares de datos se fusionaron utilizando el comando fastq-join de QIIME (Cuantitativa Insights Into Microbial Ecology, versión 1.9.1). Los archivos fastq fueron filtrados por calidad (puntuación q = 20) y fueron demultiplexados. Se implementó el algoritmo UCHIME para detectar y eliminar con seguridad las secuencias quiméricas y luego se definieron las unidades taxonómicas operativas (OTU) con una identidad de secuencia igual a más del 97% utilizando una herramienta UCLUST/QIIME. Las secuencias representativas se asignaron taxonómicamente de acuerdo con la base de datos Greengenes.

El estudio arrojó los siguientes resultados: Aumento de la diversidad microbiana después del consumo del Equibiotico-GI. La secuencia de la región V3-V4 del gen de rRNA 16S produjo un total de 3.058.603 secuencias, (media = 101.953 y mediana = 102.100) por muestra. Para el análisis comparativo, los números de secuencia se normalizaron a 102100 secuencias. El índice Chao1 se utilizó para determinar el efecto BMI sobre la diversidad alfa de la microbiota intestinal. En todos los casos, se detectaron más especies microbianas después del consumo del equibiótico (779 especies) en comparación con la condición anterior (468 especies). La riqueza microbiana aumentó notablemente. (Chao1before = 1139 $\pm$ 199 vs Chao1after = 1882 $\pm$ 366). Fueron detectados un total de trece *phylum*; sin embargo, los predominantes fueron *Firmicutes* y *Bacteroidetes* seguidos de *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Tenericutes* que fueron menos abundantes. A nivel de filo, *Firmicutes* mostró la mayor abundancia y *Bacteroidetes* mostró la menor abundancia antes del consumo del equibiótico (46% y 45% respectivamente). Después del consumo del equibiótico se observó disminución de la abundancia de *Firmicutes* (36%) y aumento de *Bacteroidetes* (54%). La proporción de *Firmicutes*: *Bacteroidetes* (F / B) fue mayor antes del tratamiento (1.1 $\pm$ 0.3) y después disminuyó (0.62 $\pm$ 0.37). Para determinar si los taxones en diferentes niveles taxonómicos habían sido enriquecidos o agotados en grupos, se utilizó el algoritmo LEfSe, que identifica sus características genómicas. *Rikenellaceae* y *Alistipes* fueron claramente enriquecidos después del consumo del equibiótico (LDA puntuación => 2). El análisis realizado revela diferencias significativas respecto a la relación de la microbiota con el enriquecimiento de taxones vinculados al metabolismo de la galactosa, el almidón y la sacarosa, y a la degradación de otros glicanos vinculados al sistema de secreción bacteriana.

Por otra parte, la valoración clínica efectuada permitió constatar en todos los participantes los cambios observados en la sintomatología: disminución drástica de la inflamación intestinal, del dolor abdominal y una reducción inmediata de los síntomas de gastritis y colitis, desaparición de la náusea y de la flatulencia, aumento del apetito y de la calidad del sueño. La mejoría experimentada por todos los participantes con el uso del Equibiotico-GI, se correspondió con los cambios observados en su microbiota intestinal como consecuencia de la proliferación de familias positivas en el ecosistema, junto con un significativo aumento en su diversidad de especies. En todos los casos, estos cambios se correspondieron con la recuperación e incremento de los géneros microbianos vinculados a la reducción de la gastritis, de la inflamación intestinal y que se corresponden con los géneros relacionados a las respuestas inmunológicas positivas del ecosistema contra eventuales patógenos. (Palacios-González B, et al.2019)

CONCLUSIONES

Ninguno de los participantes con dispepsia crónica y sus complicaciones que utilizó el Equibiótico-GI presentó efectos indeseables o trastornos en su función digestiva. Por el contrario, frente a la evidente mejoría experimentada, existió interés en mejorar el diseño del producto, ofreciéndonos propuestas y comentarios muy útiles sobre el sabor y accesibilidad al producto. Desde el punto de vista sobre su efecto sobre el microbioma, la opinión de los especialistas enfatiza el significativo aumento detectado o proliferación de las familias microbianas consideradas ‘positivas’ de la microbiota intestinal junto con la inducción de respuestas inmunológicas locales que reducen significativamente la población de colonias de posibles patógenos. Se comprobó, por primera vez, que la combinación de extractos vegetales que conforman un producto natural que incide sobre la organización y funcionamiento de la microbiota, propiciando la recuperación normal de su contenido y distribución, podía ser denominado ‘Equibiótico’.

AGRADECIMIENTOS

Los diversos estudios que aquí se describen fueron realizados en colaboración con investigadores de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de la Unidad de Investigación Preclínica Toxicológica (UNIPREC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón P, González M, Castro É. The role of gut microbiota in the regulation of the immune response. *Rev Med Chil* 2016;144(7):910-6.
- FHM. Farmacopea Herbolaria Mexicana. *Psidium guajava*. Vol 3, 25-30, 2015.
- Grenham S, Clarke G, Cryan JF, et al. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol* 2011; 2:94.
- Lozoya X., Gascón M., Agüero J, et al. Los Equibióticos: ni combate ni resistencia. *Revista de Fitoterapia (Barcelona)* 2012; 12(2): 145-148.
- Lozoya X, Gascón -Muro M, Agüero J., et al. Propiedades anti-*Helicobacter pylori* de los extractos de *Psidium guajava* y *Coptis chinensis*. *Revista de Fitoterapia (Barcelona)* 2015; 15(2): 101-113.
- Lozoya X, Agüero Agüero J, Gascón Muro M, Torres López J, Camorlinga Ponce M. Composiciones equibioticas de extractos de plantas útiles para el tratamiento de la infección gástrica por *Helicobacter pylori*. Patente 367685 Número MX/a/2015/005527. Concedida en 2017.
- Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med* 2016;375(24):2369-79.
- Palacios-González B, Meraz-Cruz B, Valdez-Palomares F, Nambo-Venegas R. Equibiotic-GI consumption improves intestinal microbiota in subjects with functional dyspepsia. *Current Drug Therapy* 2019; 14: 1.
- Sebastián Domingo JJ, Sánchez Sánchez C. De la flora intestinal al microbioma. *Rev Esp Enferm Dig* 2018;110(1):51-56.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 2016;14(8).
- Tinoco Méndez M, et al. Evaluación de la seguridad (Toxicidad aguda y Genotoxicidad) de la combinación de *Psidium guajava* L. y *Coptis chinensis* Franch. Informe toxicológico 16/029 UNIPREC/UNAM, 2016.
- Valle Gottlieb MG, Closs VE, Junges VM, et al. Impact of human aging and modern lifestyle on microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017:0.
- WHO Selected Medicinal Plants Monographs, *Coptis chinensis*. 1999;1: 12-15.
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486(7402):222-7.

CONTRIBUCCION AUTORAL

Xavier Lozoya Legorreta: Autor principal

Maricela Gascón Muro: investigación, metodología

Juan Agüero Agüero: investigación, metodología