



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Efecto de *Kluyveromyces marxianus* en un
modelo murino de intolerancia a la lactosa”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD**

Presenta:

BIOL. LAURA BERENICE OLVERA ROSALES

Director(a) de Tesis

DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

San Agustín Tlaxiaca, Hgo. Septiembre 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias de la Salud
 School of Health Sciences
 Área Académica de Medicina
 Department of Medicine
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

27/JUNIO/2017
 AAM/MCBS/078/2017
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Laura Berenice Olvera Rosales
 Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto de *Kluyveromyces marxianus* en un modelo murino de intolerancia a la lactosa" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DR. JOSÉ LUIS IMBERT PALAFOX
- PRIMER VOCAL DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES
- SECRETARIO DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS
- SUPLENTE DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
- SUPLENTE M EN C. GEORGINA ALMAGUER VARGAS

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"



M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
 DIRECTOR

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICESA



Instituto de Ciencias de la Salud
 Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuautila
 San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 mtria_bio_sal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante el desarrollo de estos estudios, número de beca 703090. Durante el periodo 01 de agosto de 2015 al 31 de julio de 2017.

DEDICATORIAS

A quienes desde el día en que nací me han guiado en este camino llamado vida, mi motor principal, mis Padres Lydio Olvera y Leticia Rosales; a ti papá por tantos consejos, por ser mi héroe, por darnos tanto amor y enseñarnos el valor del trabajo, de la honestidad, de la unidad; a ti mamá por ser esa gran mujer incansable que nos cuida amorosamente y siempre busca nuestro bienestar. Gracias papás por ser mi mejor ejemplo, por nunca soltarme, por cada consejo y cada palabra de aliento, por ser los mejores amigos que podría tener, pero sobre todo gracias por llenarme de amor y apoyarme en cada paso, esto es por ustedes. Pido fervientemente a dios que me alcance la vida para regresar aunque sea tan solo un poquito de lo mucho que me dan, pueden estar seguros que a pesar de la distancia los llevo siempre en mi corazón. Los admiro y amo infinitamente!

A mis hermanos Dianita y Miguel Olvera por todas las palabras de aliento, por estar ahí de manera incondicional, no podría estar mas agradecida con dios por darme a los mejores compañeros de vida, gracias por compartir tantos momentos conmigo, por las risas, las lágrimas, las discusiones, las anécdotas, por crear esos recuerdos que perdurarán toda la vida. Prometo siempre esforzarme para ser un buen ejemplo, para que se sientan orgullosos de mí, para cuidar de ustedes y hacer que nuestra pequeña familia se mantenga siempre unida. Aunque nuestros caminos tiendan a separarse quiero que sepan que siempre van a contar conmigo, recuerden que los lazos de hermandad son eternos, los amo por siempre.

A mi familia lejos de casa, Silvia Yalid Vázquez Roldán; Nadie mejor que tú conoce mi camino en estos dos años de maestría, gracias por acompañarme en el trayecto de cumplir un sueño más, por secar mis lagrimas un millón de veces, por estar ahí al pie del cañón, por ponerme en mi lugar, por decir la verdad aunque duela, por ser la persona más sincera que he conocido en la vida, por acompañarme en cada locura aunque muchas veces no estés de acuerdo conmigo, por hacerme ver que aunque las cosas no siempre son como queremos hay que enfrentar la vida con una sonrisa. Gracias por todas las horas en el laboratorio que pasaste conmigo, por aprender tantas cosas solamente con el propósito de ayudarme, por si no lo sabes eres increíble! Nunca dudes

del maravilloso ser humano que eres, te admiro y te quiero demasiado hermanita. No olvides que en tu oscuridad, en tu claridad siempre estaré para ti.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Marco Antonio Becerril Flores por aceptar guiarme nuevamente en la realización de un proyecto ahora con nuevas metas y ambiciones como las que implica un trabajo de maestría. Gracias por su paciencia, por el tiempo invertido, por todos los consejos y las enseñanzas en el transcurso de mi formación académica, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptarme como parte de su equipo de trabajo pero sobre todo gracias por su amistad durante todos estos años.

A mi comité tutorial Dr. José Luis Imbert Palafox, Maestra Georgina Almaguer, Dra. Raquel Cariño Cortés, Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez, gracias por aceptar formar parte de este proyecto, por sus observaciones y sugerencias durante la realización y escritura de la tesis.

A la Doctora Jeannette Izquierdo Vega por guiarnos en el proceso de escritura de tesis, por sus acertados comentarios y sugerencias y por el interés que mostró en cada uno de los proyectos de mis compañeros y en el mío propio con el único propósito de culminar esta etapa de la mejor manera.

A mi buen amigo y compañero Licenciado en Biología Álvaro Rubén Hernández Cruz por el todo el apoyo para la realización del proceso histológico, bien dicen que las amistades forjadas en la universidad perduran toda la vida; gracias por todo amigo, sigo aprendiendo de ti, te admiro bastante.

A mi soporte, a quienes vivieron conmigo la experiencia de una maestría y se convirtieron en personas realmente importantes para mí, espero que nuestra amistad perdure toda la vida pues encontrarlas ha sido una verdadera fortuna, a mis compañeras y amigas: Yari Jaguey Hernández, gracias por todo tu apoyo tanto en el ámbito académico como en el emocional, eres una persona maravillosa mi Yanis, por si no lo he dicho lo suficiente admiro la gran mujer que eres, gracias por ser mi paño de lágrimas y alentarme a seguir adelante cuando quería desistir, te quiero demasiado, la palabra gracias queda corta para agradecer todo lo que haces por mí. Alicia Rodríguez Pastén, jamás conocí a alguien con quien tuviera tantas cosas en común, créeme que

agradezco a la vida encontrarte en mi camino y poder contar con alguien tan valiosa como tú, por si no te has dado cuenta eres una chica de un corazón enorme, siempre atenta con los demás, siempre humilde y sincera, una chica inteligente y hermosa que se merece lo mejor de la vida, nunca lo olvides; agradezco a dios poder conocerte y darme cuenta de todas esas virtudes en ti, te quiero mucho, mucho.

A mis compañeros de generación de la Maestria en Ciencias Biomédicas y de la Salud, por estos dos años de caminar hombro a hombro teniendo una meta en común, puedo decir con sinceridad que he conocido a grandes profesionistas pero también a personas maravillosas, gracias por la retroalimentación, por los ánimos para continuar y por los momentos compartidos juntos, éxito en la siguiente etapa, espero volver a encontrarlos en el camino.

Por último agradecer a la vida por permitirme estar cumpliendo un sueño más, un peldaño más escalado, sin duda alguna no ha sido fácil pues de lo contrario no tendría el mismo valor, aún queda mucho recorrido es muy largo el viaje pero el futuro más allá de causar temor me llena de emoción.

Resumen

La intolerancia a la lactosa es un trastorno caracterizado por la deficiencia de lactasa en el intestino delgado, aqueja aproximadamente al 80% de la población mundial. Los microorganismos probióticos podrían ser utilizados como una de las terapias en el tratamiento de este padecimiento, una alternativa ha sido la obtención de probióticos a partir de una bebida fermentada llamada pulque pues contiene gran diversidad de microorganismos entre ellos *Kluyveromyces marxianus*.

En la presente investigación se evaluó la eficacia de este microorganismo probiótico para aliviar síntomas de intolerancia a la lactosa en un modelo *in vivo* donde ratones CD-1 fueron administrados vía oral con lactosa para inducir diarrea, adicionalmente un grupo de ratones fue administrados vía oral con lactosa (25 g/ 60 Kg) y un inóculo de *K.marxianus* de 1×10^8 UFC durante veinte días; los resultados mostraron que en comparación con los ratones administrados con lactosa, los ratones que consumieron la levadura tuvieron una disminución significativa ($P < 0.05$) de los síntomas de diarrea reflejado en el peso total y consistencia de las heces, de igual manera presentaron un mayor porcentaje de motilidad intestinal. Así mismo el crecimiento de *K. marxianus* en medio mínimo con lactosa como única fuente de carbono mostró que la levadura utiliza este carbohidrato para su crecimiento y metabolismo.

Palabras clave: Probióticos, pulque, *Kluyveromyces marxianus*, intolerancia a la lactosa.

Abstract

Lactose intolerance is a disorder characterized by lactase deficiency in the small intestine, affecting approximately 80% of the world's population. Probiotic microorganisms could be used as one of the therapies in the treatment of this disease, an alternative has been the obtaining of probiotics from a fermented drink called pulque because it contains a great diversity of microorganisms including *Kluyveromyces marxianus*. The present study evaluated the efficacy of this probiotic microorganism to alleviate symptoms of lactose intolerance in an *in vivo* model where CD-1 mice. Induction of diarrhea was performed by administration of lactose (25 g/ 60 Kg), in addition a group of mice were orally administered with lactose and a *K. marxianus* inoculum of 1×10^8 CFU for twenty days; The results showed that compared to lactose-administered mice, the mice that consumed the yeast had a significant alleviation of diarrhea symptoms reflected in the total feces weight and also had a higher percentage of intestinal motility. Also the growth of *K. marxianus* in minimal medium with lactose as the only carbon source showed that the yeast uses this carbohydrate for its growth and metabolism.

Key words: Probiotics, pulque, *Kluyveromyces marxianus*, lactose intolerance.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

| | |
|---|----|
| <i>I INTRODUCCIÓN</i> | 1 |
| <i>II ANTECEDENTES</i> | 3 |
| 2.1 <i>Generalidades</i> | 3 |
| 2.1.1 Composición de la leche | 3 |
| 2.1.2 Lactosa | 3 |
| 2.1.3 Metabolismo y absorción de la lactosa | 4 |
| 2.1.4 Características de la β -galactosidasa | 5 |
| 2.1.5 Epidemiología de la intolerancia a la lactosa | 5 |
| 2.1.6 Causas de la deficiencia de lactasa en el ser humano | 6 |
| 2.1.7 Diagnóstico de la intolerancia a la lactosa | 6 |
| 2.1.8 Alternativas en el control de la intolerancia a la lactosa | 7 |
| 2.1.9 Probióticos | 8 |
| 2.1.10 Probióticos naturales y comerciales | 8 |
| 2.1.11 Agentes bioterapéuticos | 8 |
| 2.1.12 Beneficios de los probióticos | 9 |
| 2.1.13 Microorganismos probióticos | 10 |
| 2.1.14 Alimentos funcionales..... | 10 |
| 2.1.15 El pulque | 11 |
| 2.1.16 Características físicas y químicas del pulque..... | 11 |
| 2.1.1.1 Proceso de fermentación del pulque | 12 |
| 2.2 <i>Antecedentes del problema</i> | 12 |
| 2.2.1 Probióticos como alternativa terapéutica para la intolerancia a la lactosa..... | 12 |
| 2.2.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 14 |
| 2.3 <i>Marco teórico</i> | 15 |
| <i>III JUSTIFICACIÓN</i> | 16 |
| <i>IV HIPÓTESIS</i> | 17 |
| <i>V OBJETIVOS</i> | 17 |
| 5.1 Objetivo general | 17 |
| 5.2 Objetivos específicos | 17 |
| <i>VI MATERIAL Y MÉTODO</i> | 18 |
| 6.1 <i>Obtención y conservación de la cepa de Kluyveromyces marxianus</i> | 18 |
| 6.1.2 Principio | 18 |
| 6.1.3 <i>Procedimiento</i> | 18 |
| 6.2 <i>Obtención de cultivos puros</i> | 18 |
| 6.2.1 Principio | 18 |

| | |
|--|----|
| 6.2.3 Procedimiento | 19 |
| 6.3 Tinción de Gram | 19 |
| 6.3.1 Principio | 19 |
| 6.3.2 Procedimiento | 19 |
| 6.4 Estandarización del crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medio mínimo | 20 |
| 6.4.1 Principio | 20 |
| 6.4.2 Procedimiento | 20 |
| 6.5 Determinación de β -galactosidasa | 21 |
| 6.5.1 Principio | 21 |
| 6.5.2 Procedimiento | 22 |
| 6.6 Modelo de intolerancia a la lactosa en ratones CD-1 | 22 |
| 6.6.1 Principio | 22 |
| 6.6.2 Procedimiento | 23 |
| 6.7 Prueba de motilidad intestinal | 24 |
| 6.7.1 Principio | 24 |
| 6.7.2 Procedimiento | 25 |
| 6.8 Determinación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en intestino | 25 |
| 6.8.1 Principio | 25 |
| 6.8.2 Procedimiento | 25 |
| 6.9 Histología de intestino delgado | 26 |
| 6.9.1 Principio | 26 |
| 6.9.2 Procedimiento | 27 |
| 6.8 Diseño experimental..... | 30 |
| 6.9 Análisis estadístico..... | 30 |
| VII RESULTADOS | 31 |
| 7.1 Cultivos puros..... | 31 |
| 7.2 Crecimiento en medio mínimo | 31 |
| 7.3 Determinación de β -galactosidasa in vitro | 33 |
| 7.4 Modelo de intolerancia a la lactosa en ratones CD-1 | 34 |
| 7.4.1 Peso corporal | 34 |
| 7.4.2 Peso total de heces | 35 |
| 7.4.3 Consumo de agua | 36 |
| 7.4.4 Orina excretada..... | 37 |
| 7.4.5 Motilidad intestinal | 39 |
| 7.4.6 <i>Kluyveromyces marxianus</i> en intestino delgado | 42 |
| 7.4.7 Histología de intestino delgado..... | 43 |
| VII DISCUSION DE RESULTADOS | 46 |

| | |
|---|----|
| 7.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i> utiliza la lactosa como fuente de carbono para su crecimiento..... | 46 |
| 7.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i> presenta actividad β -galactosidasa..... | 47 |
| 7.3 Efecto de <i>K. marxianus</i> en el modelo in vivo de intolerancia a la lactosa..... | 48 |
| 7.4 <i>Kluyveromyces marxianus</i> revierte la reducción de la motilidad intestinal ocasionada por lactosa..... | 50 |
| 7.5 <i>Kluyveromyces marxianus</i> coloniza intestino delgado en ratones CD- 1 | 51 |
| 7.6 Cambios histológicos en el intestino delgado ocasionados por el consumo de lactosa..... | 52 |
| VIII CONCLUSIONES | 54 |
| IX PERSPECTIVAS | 55 |
| X BIBLIOGRAFÍA | 56 |
| XI ANEXOS | 61 |
| 11.1 Formato de revisión de protocolo CIEQUAL | 61 |
| 11.2 Certificado de análisis ONPG | 62 |
| 11.3 Carta de uso final de ONPG..... | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| <i>Figura 1. Conformación de los grupos tratados e inóculos administrados</i> | <i>23</i> |
| <i>Figura 2. Proceso de la técnica histológica.....</i> | <i>29</i> |
| <i>Figura 3. Diseño experimental del estudio.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Figura 4. Tinción Gram de Kluyveromyces marxianus a partir de un cultivo puro ..</i> | <i>31</i> |
| <i>Figura 5. Crecimiento de Kluyveromyces marxianus en medio mínimo</i> | <i>32</i> |
| <i>Figura 6. Presencia de Kluyveromyces marxianus en medio mínimo</i> | <i>33</i> |
| <i>Figura 7. Determinación de β-galactosidasa, prueba de ONPG.</i> | <i>34</i> |
| <i>Figura 8. Gráfica de peso corporal de los grupos tratados</i> | <i>35</i> |
| <i>Figura 9. Gráfica de peso promedio de heces</i> | <i>36</i> |
| <i>Figura 10. Gráfica de consumo de agua</i> | <i>37</i> |
| <i>Figura 11. Gráfica de volumen de orina excretada.....</i> | <i>38</i> |
| <i>Figura 12. Prueba de motilidad intestinal en intestino delgado</i> | <i>40</i> |
| <i>Figura 13. Gráfica de porcentaje de motilidad intestinal</i> | <i>41</i> |
| <i>Figura 14. Kluyvermyces marxianus en intestino delgado.....</i> | <i>42</i> |
| <i>Figura 15. Histología de intesino delgado.....</i> | <i>45</i> |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabla 1. Composición del medio mínimo.....</i> | <i>20</i> |
| <i>Tabla 2. Resultados del análisis de histología intestinal.....</i> | <i>44</i> |

ABREVIATURAS

L Litro

mL Mililitros

μL Microlitros

°C Grados Celcius

g Gramos

mg Miligramos

min Minutos

pH Potencial hidrógeno

rpm Revoluciones por minuto

UFC Unidades Formadoras de Colonias

YPD Yeast Peptone Dextrose (Extracto de levadura, peptona, dextrosa)

ONPG Ortonitrofenil-galactopiranosido

I INTRODUCCIÓN

La lactosa es un disacárido que resulta de la unión de glucosa y galactosa, es el azúcar que predomina en la leche de los mamíferos y sus derivados. Es obtenida a partir de suero lácteo y se emplea en la elaboración de productos dietéticos para sustituir a la sacarosa en diversos productos horneados y como excipiente de algunos fármacos. Además de aportar energía, la lactosa facilita la absorción de calcio así como el desarrollo de una microbiota intestinal gram positiva, en su mayoría bifidobacterias que colonizan el intestino impidiendo el crecimiento de bacterias patógenas (1).

La lactosa es sintetizada por la acción de la lactosa sintetasa. Esta enzima está formada por una subunidad que tiene actividad transferasa, la galactosiltransferasa, y una subunidad reguladora, la α -lactalbumina. La reacción consiste en la transferencia de una molécula de glucosa a la UDP-galactosa (2).

La función de la enzima lactasa (β -D-galactosidasa) es romper los disacáridos en los monosacáridos que los forman de esta manera hidroliza la lactosa. La carencia de esta enzima origina que la lactosa no se hidrolice y al llegar al colon esta fermenta y produzca hidrógeno, dióxido de carbono y ácido láctico sustancias que irritan el intestino y provocan manifestaciones gastrointestinales adversas tales como inflamación intestinal, náuseas, flatulencia, dolor abdominal, diarreas e incluso problemas nutricionales por deficiencia en la absorción de nutrientes. Al conjunto de estas manifestaciones clínicas se le conoce como intolerancia a la lactosa (3).

A las personas que padecen de intolerancia a la lactosa generalmente se les recomienda hacer modificaciones en sus hábitos alimenticios con el fin de disminuir las afecciones o molestias características de esta patología (4). A los pacientes con intolerancia a la lactosa se les pide que incorporen de manera gradual a su dieta la leche y sus derivados, la adaptación va a variar en cada individuo de acuerdo a la causa que originó el padecimiento, la asimilación de la cantidad de lactosa puede diferir (5). Estudios recientes (6,7) señalan que al inducir el colon para producir β -galactosidasa mediante la administración de yogur y prebióticos alivia los síntomas clínicos de la intolerancia a la lactosa. Esto sugiere un papel específico de la lactosa en el desarrollo de los síntomas clínicos.

Debido a la importancia de los probióticos y los beneficios que ofrecen a quien los consuma, la búsqueda de nuevas fuentes de estos microorganismos se ha vuelto necesaria, debido a que la mayoría son de origen lácteo. El pulque que es considerado como un alimento funcional debido a la gran cantidad de nutrientes y la diversidad microbiana que contiene, por lo cual representa una buena fuente de probióticos. El pulque es un líquido no clarificado el cual presenta un aspecto viscoso, es de color blanco y ligeramente turbio debido a los microorganismos que participan en el proceso de fermentación; es ácido, con un olor y sabor característico. El proceso de elaboración y producción de esta bebida requiere de medidas controladas para evitar la alteración de sus propiedades y su calidad. Se dice entonces que un buen pulque o pulque de calidad es reconocido sensorialmente por su olor y sabor (8).

Uno de los microorganismos aislados del pulque es *Kluyveromyces marxianus* una levadura también conocida como *Saccharomyces kefir* que pertenece al género *Kluyveromyces* descrita por primera vez en 1888 por (E.C. Hansen) Van der Walt. Su aislamiento ha sido a partir del jugo de uva, de algunos productos lácteos como el queso, la leche o el yogur, así como de bebidas fermentadas tales como el pulque y el kéfir (9,10).

Este microorganismo sobrevive a valores de pH ácido desde 1.5 hasta 7.0, muestra ser tolerante al jugo gástrico hasta por 24 horas y es capaz de establecerse en el intestino en un modelo experimental de ratones CD1 (11).

La levadura *Kluyveromyces marxianus* tiene gran potencial biotecnológico, en la industria se ha empleado para el procesamiento de lactosuero, fermenta una gran cantidad de carbohidratos como galactosa, sacarosa, rafinosa y lactosa (10); se ha utilizado en la producción de etanol y en la producción de compuestos aromáticos como esteroides, ácidos carboxílicos y alcoholes (9). Este organismo cuenta con las principales características para considerarse un probiótico con importante potencial para usarse en el ámbito de la salud humana, como un suplemento alimenticio capaz de mantener en equilibrio la microbiota intestinal siendo una buena opción en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa (10).

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Composición de la leche

La leche es el producto que proviene de la secreción de la glándula mamaria de animales mamíferos como la vaca. La leche y sus derivados ocupan un lugar muy importante en la alimentación debido a que aportan gran cantidad de macronutrientes y micronutrientes (12). Está compuesta principalmente por agua y por sólidos totales secos, de los cuales la grasa es el principal representante, de igual manera se encuentran los sólidos no grasos (SNG). La lactosa es el carbohidrato más abundante dentro de los sólidos no grasos seguidos por las proteínas principalmente caseína que se encuentra dispersa en partículas. Uno de los principales macronutrientes que se encuentran en la leche es el calcio cuya importancia nutricional se expresa mediante la relación directa entre la ingesta de lácteos y la adquisición de masa ósea.

En los sólidos no grasos también se encuentran otros compuestos en menor cantidad, estos micronutrientes a pesar de estar en bajas concentraciones juegan un papel muy importante debido a su función biológica y a que la intervienen en diversos procesos metabólicos, este grupo de compuestos están representados, por un lado por las vitaminas hidrosolubles como la tiamina (B1), la riboflavina (B2), la niacina y el ácido ascórbico (C), el ácido pantoténico, el ácido fólico, la biotina, la colina y el inositol, vitaminas liposolubles como A, D, E y K y por minerales (sodio, potasio, hierro, magnesio, fósforo, cloruros) (13).

2.1.2 Lactosa

La lactosa es un disacárido que resulta de la unión de glucosa y galactosa, es el azúcar que predomina en la leche de los mamíferos y sus derivados. Es obtenida a partir de suero lácteo y se emplea en la elaboración de productos dietéticos para sustituir a la sacarosa en diversos productos horneados y como excipiente de algunos fármacos. Además de aportar energía, la lactosa facilita la absorción de calcio así como el desarrollo de una microbiota intestinal gram positiva, en su mayoría bifidobacterias que colonizan el intestino impidiendo el crecimiento de bacterias patógenas (1).

2.1.3 Metabolismo y absorción de la lactosa

La lactosa es sintetizada por la acción de la lactosa sintetasa. Esta enzima está formada por una subunidad que tiene actividad transferasa, la galactosiltransferasa, y una subunidad reguladora, la α lactalbumina. La reacción consiste en la transferencia de una molécula de glucosa a la UDP-galactosa (2).

La lactasa (β -D-galactosidasa) es la encargada de hidrolizar la lactosa obteniendo así los monosacáridos glucosa y galactosa. Al haber un déficit de lactasa la lactosa no puede ser hidrolizada correctamente ocasionando que esta llegue al colon y comience a fermentar por acción de las bacterias que ahí se encuentran; esta fermentación produce compuestos como hidrógeno, dióxido de carbono y ácido láctico, estas sustancias irritan el intestino provocando diversas manifestaciones gastrointestinales tales como inflamación intestinal, náuseas, flatulencia, dolor abdominal, diarreas e incluso problemas nutricionales por deficiencia en la absorción de nutrientes, este cuadro clínico es conocido como un trastorno de intolerancia a la lactosa (3). La conducción de nutrientes desde el yeyuno hasta las diferentes células de los tejidos, se efectúa partiendo de la transformación de quimo a quilo, mediante la acción del jugo intestinal, la bilis y el jugo pancreático (3).

En el hígado la grasa emulsificada por la bilis es descompuesta por la enzima, lipasa pancreática produciendo ácidos grasos y glicerina. Por otro lado, las proteínas luego de iniciar su proceso de asimilación en el estómago, son descompuestas hasta obtener aminoácidos, mediante la actividad enzimática de la (exopeptidasa) del jugo intestinal y la tripsina contenida en el jugo pancreático, luego las sustancias digeridas pasan desde el intestino delgado al aparato circulatorio por ósmosis a través de sus microvellosidades intestinales ubicadas en el yeyuno-íleon, para su posterior asimilación por ósmosis desde los capilares sanguíneos hacia las células de los tejidos del cuerpo (3).

2.1.4 Características de la β -galactosidasa

Las condiciones a las cuales actúa la enzima β -galactosidasa han sido descritas destacando el pH, la temperatura, así como algunos otros factores ambientales que pudieran modificar su actividad, estas condiciones pueden variar dependiendo la fuente de obtención de la enzima, la cual puede ser de origen fúngico como *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger* (14) y levaduras entre las que destacan *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cándida Kefyr* y *Picchia jadinni* (15,16,17) De igual manera se ha encontrado actividad β -galactosidasa en bacterias como *Streptococcus thermophilus* (18,19).

Diversos estudios señalan que las lactasas de origen fúngico presentan una mayor termoestabilidad, su pH óptimo de actividad cae dentro del rango ácido de 4.5-6,5 mientras que las lactasas de origen bacteriano son más termolábiles y el pH óptimo para su actividad es neutro por lo que se le conoce como lactasas neutras, su actividad se ve reducida al disminuir el pH del medio o al aumentar la temperatura (19).

2.1.5 Epidemiología de la intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa se puede definir como una reacción adversa a alimentos que contienen lactosa, la cual es producida por un mecanismo no inmunológico que presenta una frecuencia de 5-10 veces superior a las de tipo alérgico (20).

Esta condición es producida por ausencia de la enzima lactasa en el intestino delgado lo que provoca que haya un paso parcial de lactosa al intestino delgado ocasionando la aparición de ciertos síntomas tales como hinchazón abdominal, diarrea, náuseas, espasmos, dolor y acumulación de gases en el intestino. Los síntomas pueden variar en cada individuo dependiendo de la cantidad de lactosa ingerida, el grado de intolerancia y el tipo de alimento que haya sido ingerido. Los síntomas se pueden presentar entre los 20 minutos a 2 horas luego de la ingesta de lactosa (21).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud (INS) en su informe de consenso sobre la intolerancia a la lactosa y la salud menciona que la intolerancia a la lactosa es una condición clínica real e importante, pero la prevalencia en la población de Estados Unidos aún es desconocida. Aunque no hay pruebas suficientes para determinar la verdadera prevalencia de intolerancia a la lactosa y mala absorción de lactosa, los informes señalan que las ocurrencias de este padecimiento varían entre grupos, razas y etnias. En general, los

americanos y los europeos reportan una ocurrencia del padecimiento baja, mientras que los afroamericanos, hispanos, asiáticos americanos y nativos americanos tienen una ocurrencia más alta, aunque las tasas varían entre grupos (22).

2.1.6 Causas de la deficiencia de lactasa en el ser humano

Los seres humanos, generalmente consumen leche en mayor proporción durante los primeros años de vida, esto al igual que muchos mamíferos, sin embargo, a partir de los tres años de edad o incluso antes, se ha observado una disminución en la producción de lactasa de las células del epitelio intestinal (3).

Desde hace muchos años, los antepasados observaron que presentaban diversas reacciones orgánicas después que tomaban leche, muchas personas no podían consumir leche debido a que les sentaba mal pero algunos eran capaces de digerirla debido a que poseían una mutación genética localizada en el gen de la lactasa, concretamente el SNP C/T13910, esta mutación hacía que el gen de la lactasa no se desactivara y de esta manera pudiera continuar expresándose no solamente en la etapa de la niñez sino también durante la edad adulta (23).

En las poblaciones del mundo la tolerancia a la lactosa se desarrolla como parte de un proceso evolutivo, como efecto de la interacción de la genética, la cultura y hábitos alimenticios de los antepasados. La intolerancia puede ser congénita (desde el nacimiento) o adquirida. Esta última puede ser parcial o total y puede iniciarse en la infancia, adolescencia o en la edad adulta (24).

2.1.7 Diagnóstico de la intolerancia a la lactosa

Para determinar el padecimiento clínico de la intolerancia a la lactosa hay principalmente tres alternativas que son el test de tolerancia a la lactosa, el test del hidrógeno expirado y la biopsia de intestino delgado. Para el diagnóstico final se requiere que realmente se compruebe una baja actividad de la lactosa en una muestra de biopsia intestinal, la medición de la actividad de la enzima lactasa en las muestras de yeyuno deberán ser obtenidas a través de enteroscopia. El test de tolerancia a la lactosa es uno de los más utilizados y consiste en medir la respuesta de la glicemia a una sobre carga de lactosa de 50 gramos, después de esta sobrecarga se realizan mediciones de glucosa cada 30 minutos en las siguientes dos horas de la ingesta. Si no hay un aumento en la glicemia al menos en 20

miligramos del nivel basal entonces se sugiere altamente una deficiencia de lactasa. El test del hidrógeno expirado es un método rápido y bastante confiable para detectar la malabsorción de lactosa.

En personas con deficiencia de lactasa, la lactasa no absorbida pasa en grandes cantidades el colon en forma libre, las bacterias intestinales la degradan produciendo grandes cantidades de hidrógeno libre el cual es absorbido en el intestino grueso y eliminado del cuerpo a través del sistema respiratorio. Después de la ingestión de 50 gramos de lactosa la persona deficiente aumenta la excreción hidrogenada por varias horas y un aumento de más de 20 ppm después de la sobrecarga de lactosa coincide con el nivel de intolerancia presentado (24).

2.1.8 Alternativas en el control de la intolerancia a la lactosa

El interés de la industria láctea para determinar nuevos procesos en la hidrólisis enzimática de la lactosa ha aumentado de manera progresiva en los últimos años, esto debido a la aparición de nuevos conocimientos que indican que el grado de intolerancia a la lactosa en el mundo representa un mercado potencial para la venta de productos lácteos modificados (19). De esta manera, en los últimos años se han generado nuevos procesos que ayudan a la disminución o tratamiento de la lactosa en la leche haciendo que las personas que padecen este tipo de anomalías puedan consumir leche pero sin que presenten consecuencias posteriores. La industria de alimentos responde ahora con mayor actividad a la demanda de los consumidores que requieren de productos donde la lactosa es hidrolizada o se retira por completo lo que se conoce como productos deslactosados (25).

A las personas que padecen de intolerancia a la lactosa generalmente se les recomienda hacer modificaciones en sus hábitos alimenticios con el fin de disminuir las afecciones o molestias características de esta patología (4). A los pacientes con intolerancia a la lactosa se les pide que incorporen de manera gradual a su dieta la leche y sus derivados, la adaptación va a variar en cada individuo de acuerdo a la causa que originó el padecimiento, la asimilación de la cantidad de lactosa puede diferir, de igual manera se han utilizado los probióticos como una terapia alternativa (5).

2.1.9 Probióticos

La definición de probiótico fue determinada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO), las cuales en el 2001 hicieron un consenso. El Comité formado por expertos en la materia llegó a la conclusión de que los probióticos son microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos en la salud del hospedador que los consuma (26). Como se mencionó, los probióticos forman parte de uno de los grupos más importantes dentro de los alimentos funcionales; aunque han sido consumidos desde hace muchos años en productos fermentados como el yogur, no fue sino hasta los años noventa que Metchnikoff notó que existía un vínculo entre el consumo del yogur y la longevidad de las personas, en sus estudios realizados en el Instituto Pasteur (27).

2.1.10 Probióticos naturales y comerciales

Los probióticos naturales son aquellos que se encuentran en lácteos fermentados, como yogur, leche y quesos, vegetales como aceitunas y chucrut, soya, cereales, carnes, pescados y bebidas alcohólicas artesanales. Los probióticos comercializados son probióticos naturales pero incorporados en algún producto alimenticio, por ejemplo, yogur en formato comercial, obtenido a partir de diferentes cepas de microorganismos, y algunas leches de origen materno (26).

2.1.11 Agentes bioterapéuticos

Son probióticos con efecto terapéutico comprobado. Se consideran medicamentos. Deben tener efectos terapéuticos inmediatos, ser resistentes a los antibióticos de uso común, impedir la adhesión de patógenos, presentar efectos de inmunomodulación, competencia con las toxinas por los receptores de éstas y competencia por los nutrientes. Los ejemplos mejor conocidos son una levadura, *Saccharomyces boulardii* y una bacteria, el *Lactobacillus casei* cepa GG, suministrados vía oral (26).

2.1.12 Beneficios de los probióticos

Los beneficios de los probióticos son numerosos, entre ellos la actividad antimicrobiana que presentan, la prevención de infecciones gastrointestinales, propiedades anticancerígenas, ayudan al metabolismo de la lactosa, son antidiarreicos, modifican la flora intestinal estimulando el desarrollo de la misma, reducen el colesterol y estimulan el sistema inmune (27).

Se han descrito diversos mecanismos de acción de los probióticos, el primero en ser demostrado fue la digestión de la lactosa mediante la enzima β -galactosidasa presente en los lactobacilos del yogurt, la hidrólisis de la lactosa disminuye los efectos de la diarrea osmótica producida por el consumo de lactosa, de igual manera en infecciones de rotavirus donde la diarrea osmótica es una condición fisiopatológica (28) además de este mecanismo se han descrito otros como su actividad antimicrobiana mediante la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (inhibición competitiva), los probióticos producen diversos metabolitos como ácidos grasos, agentes oxidantes, compuestos peptídicos antibacterianos, ácido láctico, entre otros que bloquean la adhesión de los microorganismos patógenos al epitelio (29). De igual manera liberan compuestos protectores como las bacteriocinas que pueden ser de espectro reducido inhibiendo el crecimiento de cepas bacterianas o de amplio espectro inhibiendo el crecimiento no solo de bacterias Gram positivas y negativas sino también el crecimiento de algunas levaduras, por su parte las enzimas pueden modificar los receptores de diversas toxinas involucradas en vías de señalización que producen ciertas alteraciones a nivel gastrointestinal (30,31). En cuanto a los péptidos antimicrobianos (defensinas) producidos por los probióticos se ha observado que los probióticos incrementan la secreción de estos compuestos, los cuales están involucrados en la respuesta inmune innata; un ejemplo de esto son las células Caco-2 presentes en el epitelio intestinal, estas células incrementan la expresión de beta-defensina 2 humana (hBD-2) cuando son cultivadas con probióticos, de esta manera el establecimiento de patógenos entéricos quedaría limitado (32,33). La producción de vitamina K, nutrientes y factores de crecimiento ayudan a mantener el equilibrio homeostático del epitelio intestinal (32), mientras que su papel en la disminución de la carga procarcinogénica, en la fijación y eliminación de genobióticos provenientes de los alimentos, en la producción de compuestos antioxidantes y elementos con efecto protector

sobre el epitelio así como la estimulación de la motilidad intestinal les confieren a los probióticos un efecto detoxificante (34-38).

Por último se ha observado que los probióticos actúan como inmunomoduladores en el organismo puesto que ejercen una modulación del sistema inmune tanto a nivel local como sistémico. Reducen la producción de antígenos e incrementan la producción de inmunoglobulinas en el tracto gastrointestinal modificando la respuesta inmune humoral y celular, de igual manera los probióticos son capaces de activar el sistema retículoendotelial incrementando así la producción de citocinas y factores de crecimiento que actúan sobre las líneas celulares del sistema inmune tales como células epiteliales, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas (39-41).

2.1.13 *Microorganismos probióticos*

La asociación más conocida entre derivados de productos lácteos y probióticos es la correspondiente a *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, la cual es utilizada de manera tradicional en la producción del yogur. Se han encontrado varias cepas de organismos que forman parte de la microbiota intestinal, aumentando así la diversidad de microorganismos considerados como probióticos; entre estos se encuentran otras especies de *Lactobacillus*, especies de *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, cepas de *Escherichia coli* e incluso especies de *Enterococcus* (44).

Los probióticos son microorganismos vivos los cuales se caracterizan por tener una mínima o nula capacidad patógena; dichos microorganismos ya sean autóctonos u obtenidos mediante la alimentación, pueden inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos (45).

2.1.14 *Alimentos funcionales*

Los alimentos funcionales son considerados como aquellos que además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos benéficos sobre una o más funciones del organismo, fomentando así la salud y reduciendo el riesgo de enfermedades (46). Dichos beneficios se obtienen cuando se consume el alimento en las cantidades habitualmente presentes en la dieta (11). Ejemplos de alimentos funcionales pueden ser los que están enriquecidos con vitaminas y minerales como cereales y lácteos pero en los últimos años estudios han demostrado que el pulque también es un alimento funcional debido a la gran

cantidad de proteínas, minerales, vitaminas que contiene, además de albergar microorganismos probióticos (43,44).

2.1.15 El pulque

El pulque es una bebida tradicional mexicana de bajo contenido alcohólico, esta bebida tiene un carácter religioso debido a la carga emocional y cultural en torno al maguey, su origen se remonta a la época prehispánica, el enema a base de pulque más antiguo conocido en Mesoamérica, procede de Xochipala, Guerrero, México, y data de 1200 a 900 a.C., aproximadamente. El uso de enemas contra enfermedades y dolencias del tracto digestivo en las culturas prehispánicas se registra por evidencias arqueológicas y por recopilaciones coloniales (47).

El pulque fue considerado como el néctar de los dioses; durante mucho tiempo formó parte importante de la dieta básica de los mexicanos y ha sido elogiado por su gran valor alimenticio en conjunto con otros alimentos como el maíz y el frijol (48).

En México los principales estados productores de pulque son Puebla, Hidalgo y Tlaxcala, donde la extracción del aguamiel prevalece como una actividad económica de la región, llegando así a usar tecnología para mejorar el proceso de fermentación, envasarlo y poderlo comercializar (49).

2.1.16 Características físicas y químicas del pulque

El pulque es un líquido no clarificado, el cual presenta un aspecto viscoso, es de color blanco y ligeramente turbio debido a los microorganismos que participan en el proceso de fermentación; es ácido, con un olor y sabor característico. El proceso de elaboración y producción de esta bebida requiere de medidas controladas para evitar la alteración de sus propiedades y su calidad. Se dice entonces que un buen pulque o pulque de calidad es reconocido sensorialmente por su olor y sabor (8).

Tanto el pulque como el aguamiel son consideradas bebidas con propiedades alimenticias (47,48). Estudios realizados a partir del pulque han demostrado que esta bebida contiene elementos importantes para la nutrición, tales como azúcares, proteínas, hierro y vitaminas hidrosolubles (49,50). Además de una gran cantidad de aminoácidos esenciales;

de igual manera, el aguamiel contiene agua, fructuosa, ciertos minerales como el hierro y el zinc así como vitamina C (51).

2.1.17 Proceso de fermentación del pulque

La fermentación es un proceso mediante el cual habrá una obtención de energía en ausencia de oxígeno; en otras palabras, la transformación de sustancias orgánicas por diversos microorganismos como bacterias y hongos en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno) o por complejos enzimáticos los cuales pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano. Este tipo de fermentaciones tienen lugar cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles en la descomposición de materiales naturales (52).

Gran cantidad de productos alimenticios que son denominados productos fermentados deben sus características y su producción a grupos de microorganismos fermentadores, los cuales les confieren el sabor y olor que los distinguen. Cuando el alimento es de tipo ácido y contiene azúcares, serán las levaduras las que crecerán con mayor facilidad y el alcohol que éstas producen durante el proceso de fermentación alcohólica inhibe la actividad de otros microorganismos contaminantes (53).

El proceso de fermentación del pulque inicia en el maguey, debido a los microorganismos naturales presentes en el aguamiel fermentan la parte de los carbohidratos disponibles; este proceso de fermentación se acelera por la adición de la “semilla” que es una porción de pulque previamente producido (54).

2.2 Antecedentes del problema

2.2.1 Probióticos como alternativa terapéutica para la intolerancia a la lactosa

En 1965, Lilly y Stiwell utilizaron por primera vez el término probiótico para denominar a sustancias secretadas por un organismo y capaces de estimular el crecimiento de otro. A esta definición le siguieron muchas más al paso de los años, y a medida del progreso de la investigación, la Organización Mundial de la Salud y las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura formaron un consenso para definir a los probióticos de la siguiente manera: “microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos benéficos en la salud del huésped”(27).

Estudios recientes (42,43) han descrito que al inducir el colon para producir β -galactosidasa mediante la administración de yogur y prebióticos alivia los síntomas clínicos de la intolerancia a la lactosa. Esto sugiere un papel específico de la lactosa en el desarrollo de los síntomas clínicos. En ratones post-destete se observó que los síntomas de la diarrea se redujeron mediante la inducción de la actividad β -galactosidasa a través de la administración de un *Lactococcus lactis* recombinante Cepa MG1363 / FGZW expresando β -galactosidasa. El efecto de los probióticos en la intolerancia a la lactosa se puede esperar en dos niveles, primero en la hidrólisis de la lactosa en el producto lácteo y en el intestino delgado, segundo a nivel de fermentación en el colon. La capacidad hidrolítica de cepas probióticas se puede utilizar para reducir la cantidad real de lactosa en el producto, como ocurre en el yogur, también se puede utilizar para aumentar la capacidad hidrolítica global en el intestino delgado. La cepa probiótica puede estar viva o puede ser lisada en el tracto intestinal (7).

En México, las bebidas alcohólicas tradicionales han tenido gran relevancia en la vida cotidiana de las comunidades indígenas. Desde la época prehispánica, las civilizaciones mesoamericanas fermentan una gran variedad de plantas nativas para la elaboración de bebidas alcohólicas y su consumo juega un papel importante en las regiones donde se producen debido a su utilización en la curación (47,48).

En las últimas décadas se han descubierto nuevos productos alimenticios cuyas propiedades nutricionales contienen probióticos que confieren beneficios a la salud humana. Estudios recientes señalan que también en el pulque se han encontrado microorganismos con capacidades probióticas (42, 43,54).

En cuanto a la utilización de los probióticos como alternativa terapéutica en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales se han realizado diversos estudios, algunos de ellos señalan que los probióticos son en general beneficiosos en el tratamiento y prevención de las enfermedades gastrointestinales (6).

Específicamente, en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa utilizando probióticos, Vonk y colaboradores (7) observaron en ratones post-destete que los síntomas de la diarrea se redujeron mediante la inducción de la actividad β -galactosidasa a través de la administración de un *Lactococcus lactis* recombinante Cepa MG1363 / FGZW expresando β -galactosidasa (7). Li y colaboradores evaluaron la eficacia de *Lactococcus lactis* MG163/FGZW en la disminución de síntomas de intolerancia a la lactosa en ratones post-

destete Balb/c los cuales fueron administrados oralmente con un inóculo de 1×10^8 UFC de *L. lactis* diariamente durante cuatro semanas antes de la exposición a lactosa. Los resultados mostraron una disminución significativa de los signos de intolerancia a la lactosa en ratones (55); por su parte He, Lü y Huang determinaron la actividad de lactasa y los niveles de mRNA en ratones Balb / c en diferentes edades (3,5,7,9,12 semanas); los resultados indicaron que los ratones de 3 semanas presentaban una actividad de la lactasa elevada y esta disminuyó en ratones de mayor edad, concluyendo así que los ratones presentan una similitud a la hipolactasia del adulto siendo un buen modelo experimental para la intolerancia a la lactosa (56).

De igual manera se ha demostrado que la levadura *Kluyveromyces marxianus* produce la enzima β -galactosidasa, Bansal y colaboradores observaron que la concentración de lactosa en lactosuero disminuyó drásticamente al 0.04% a partir de 4.40% después de 36 h de incubación con la levadura (57).

A pesar de los estudios mencionados, aún falta determinar de manera clara cuál es el papel de los probióticos en el padecimiento de la intolerancia a la lactosa, si bien se ha inferido que estos tienen un papel benéfico para la salud de quién los ingiere, es necesario detallar una metodología que pruebe que son una terapia efectiva en el tratamiento de la intolerancia y malabsorción de lactosa específicamente probando probióticos de origen no láctico como es el caso de *Kluyveromyces marxianus*.

2.2.2 *Kluyveromyces marxianus*

Esta levadura también conocida como *Saccharomyces kefir* pertenece al género *Kluyveromyces* descrito por primera vez en 1888 por (E.C. Hansen) Van der Walt. Su aislamiento ha sido a partir del jugo de uva, de algunos productos lácteos como el queso, la leche o el yogur, así como de bebidas fermentadas tales como el pulque y el kéfir (9)(10).

Este microorganismo sobrevive a valores de pH ácido desde 1.5 hasta 7.0, y muestra ser tolerante al jugo gástrico hasta por 24 horas, de igual manera es capaz de establecerse en el intestino en un modelo experimental de ratones CD1 (11).

La levadura *Kluyveromyces marxianus* tiene sin duda gran potencial biotecnológico, en campos como la industria se ha empleado para el procesamiento de lactosuero, además fermenta una gran cantidad de carbohidratos como galactosa, sacarosa, rafinosa y lactosa

(10); se ha utilizado en la producción de etanol y en la producción de compuestos aromáticos como ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes (9). Este organismo cuenta con las principales características para considerarse un probiótico, por lo que podría ser un microorganismo de importante potencial para usarse en el ámbito de la salud humana, pudiendo ser utilizado como un suplemento alimenticio que confiera elementos benéficos que además sea capaz de mantener en equilibrio la microbiota intestinal de las personas que lo consuman (10).

2.3 Marco teórico

La intolerancia a la lactosa es un problema de salud que cada día cobra más importancia debido a que afecta a gran parte de la población mundial, se caracteriza por una deficiencia o ausencia de lactasa en el intestino delgado. La lactasa es una enzima que se encarga de la hidrólisis de lactosa, principal carbohidrato presente en la leche y los productos lácteos, los productos que se obtienen de la hidrólisis de lactasa son glucosa principal fuente de carbono en los organismos y galactosa que es utilizada en la síntesis de cerebrósidos.

La lactosa no solamente se encuentra en la leche y sus derivados, también se encuentra en algunos vegetales y es excipiente de diversos fármacos, por ello es importante encontrar nuevas alternativas terapéuticas que disminuyan los síntomas de intolerancia a la lactosa y/o promuevan la actividad de la lactasa; Los probióticos se han señalado como una de esas alternativas puesto que al ser microorganismos vivos confieren efectos benéficos a la salud de quien los consume, específicamente en diversos trastornos gastrointestinales. La mayoría de los probióticos son de origen lácteo por lo que se ha vuelto importante la búsqueda y aislamiento de nuevos microorganismos probióticos en algunas bebidas fermentadas tales como el pulque, una bebida regional mexicana que data desde la época prehispánica y que además está documentado su uso en la curación tradicional de distintos malestares relacionados sobre todo con problemas gastrointestinales. Se han realizado diversos estudios que documentan la microbiota que se encuentra en el pulque, reportando gran diversidad de microorganismos algunos de ellos con propiedades probióticas, tal es el caso de *Kluyveromyces marxianus*, una levadura que participa en el proceso de fermentación y que tiene potencial probiótico como lo han demostrado diversos estudios donde se probó que coloniza intestino delgado en un modelo de ratones CD-1, es capaz de crecer a pH ácido, en presencia de sales biliares y en presencia de jugo gástrico así como inhibir el crecimiento de

bacteras patógenas. De igual manera es capaz de utilizar gran cantidad de carbohidratos para su crecimiento y metabolismo, entre ellos lactosa.

En esta investigación se evaluó el efecto de *K. marxianus* para disminuir la sintomatología de la intolerancia a la lactosa en un modelo de ratones CD-1 los cuales se administraron via oral durante 20 días con 200 µL de lactosa a una concentración de 48 g/L, se registró diariamente el volumen total de orina, la bebida consumida, el peso total de las heces y el peso corporal de cada ratón, los resultados se compararon contra un grupo reto al cual además de lactosa se les administró un inóculo de *K.marxianus* de 1×10^8 UFC durante 20 días, posteriormente se evaluó la motilidad intestinal y la actividad β-galactosidasa en el intestino delgado de cada ratón. De igual manera se estandarizó el crecimiento en medio mínimo con lactosa como fuente de carbono y se determinó la cantidad de lactosa consumida por la levadura en un medio de cultivo adicionado con lactosa.

III JUSTIFICACIÓN

La intolerancia a la lactosa es un trastorno de salud caracterizado por la deficiencia de lactasa, una enzima de origen intestinal que hidroliza la lactosa obteniendo galactosa y glucosa. Cuando hay una malabsorción de lactosa se presentan manifestaciones clínicas como hinchazón, dolor abdominal y diarrea. Este trastorno es un padecimiento común, en promedio alrededor del 70% de la población del mundo padece este problema. México es uno de los países con mayor incidencia de intolerantes a la lactosa apenas debajo de los africanos y los tailandeses. Dentro de las alternativas en el tratamiento de intolerancia a la lactosa se encuentra la utilización de microorganismos probióticos.

Desde el descubrimiento de los beneficios de los agentes probióticos, el ser humano ha buscado nuevas alternativas para poder producirlos y comercializarlos debido principalmente a que la mayoría de estos son obtenidos en productos de origen lácteo. La levadura *Kluyveromyces marxianus* es un microorganismo probiótico aislado del aguamiel y el pulque, esta bebida contiene una amplia gama de beneficios conocidos desde épocas prehispánicas. Estudios previos de esta levadura han demostrado que es capaz de reducir niveles de colesterol y glucosa sanguínea lo que le da mayor relevancia con respecto a otros microorganismos probióticos, con base en esta información, *Kluyveromyces marxianus*

representa una alternativa en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa, siendo adicionada a la dieta de pacientes que presenten dicho trastorno una vez demostrada su efectividad.

IV HIPÓTESIS

Kluyveromyces marxianus es capaz de disminuir los síntomas inducidos de intolerancia a la lactosa en un modelo de ratones CD-1, de igual manera utiliza la lactosa como sustrato para su metabolismo y presenta actividad β -galactosidasa.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la presencia de *Kluyveromyces marxianus* en ratones con síntomas de intolerancia a la lactosa.

5.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en medio de cultivo mínimo de sales y agar lactosa.
- Determinar *in vitro* la actividad β -galactosidasa en *Kluyveromyces marxianus*
- Estandarizar la técnica de modelo *in vivo* de intolerancia a la lactosa en ratones.
- Evaluar el efecto de *K. marxianus* en ratones CD-1 con síntomas de intolerancia a la lactosa.
- Determinar la presencia de *K. marxianus* en intestino de ratones CD-1

VI MATERIAL Y MÉTODO

*6.1 Obtención y conservación de la cepa de *Kluyveromyces marxianus**

La levadura *K. marxianus* fue aislada en una investigación previa a partir de muestra de pulque obtenida del municipio de Santiago Tlapacoya, Hidalgo México. La cepa fue identificada mediante pruebas bioquímicas mediante el kit API 20 AUX, sistema bioquímico de identificación de levaduras.

6.1.2 Principio

La dextrosa es la fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. La peptona y el extracto de levadura proporcionan factores de crecimiento y una fuente de nitrógeno. El extracto de levadura es la base para el crecimiento de mohos y levaduras. La adición de antibióticos de amplio espectro inhibe una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas (58).

6.1.3 Procedimiento

La cepa fue conservada en placas de Petri que contenían agar YPD, incubadas a 37°C, así como en caldo YPD incubadas a la misma temperatura, después del periodo de incubación la cepa se mantuvo en refrigeración a 4°C y se realizaron siembras periódicas para mantenerla viable cada dos semanas aproximadamente.

6.2 Obtención de cultivos puros

Para la realización de los experimentos se utilizaron cultivos axénicos en medio sólido y líquido de *Kluyveromyces marxianus*.

6.2.1 Principio

Un cultivo puro (axénico) contiene sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de esta manera todos los individuos tendrán la misma composición genética. Son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para su correcta identificación (59).

6.2.3 Procedimiento

La cepa para cultivo axénico de *K. marxianus* se obtuvo a partir de una placa de Petri con agar YPD previamente incubada durante 24 horas a 37° C, posteriormente con ayuda de una asa bacteriológica se tomó una de las colonias y se inoculó en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo YPD adicionado con 50 µL de estreptomicina y se incubó a 37° C, durante 24 hrs.

6.3 Tinción de Gram

Con la finalidad de determinar si había alguna contaminación bacteriana en los cultivos se realizó una tinción diferencial de Gram.

6.3.1 Principio

Tinción diferencial que permite clasificar a las bacterias en dos grupos principales de acuerdo a las propiedades de su pared celular; Gram positivas, las cuales retienen el colorante primario violeta de genciana o cristal violeta debido a que presentan una pared celular con una capa gruesa de peptidoglicano, y las Gram negativas, las cuales se decoloran primero y se tiñen con safranina que es el colorante de contraste ya que su pared celular está constituida por una capa delgada de peptidoglicano y por lo tanto es incapaz de retener el colorante primario, las células se aprecian de un color rojo-rosa (59).

6.3.2 Procedimiento

1. Extender una colonia de levaduras sobre un portaobjetos con una gota de agua corriente y fijarlo a la flama de un mechero.
2. Cubrir la muestra con unas gotas de colorante primario cristal violeta y dejar en contacto durante un minuto.
3. Lavar con agua para eliminar el exceso de colorante
4. Agregar unas gotas de lugol y dejar en contacto con la muestra durante un minuto, posteriormente retirar el lugol.
5. Agregar unas gotas de alcohol-acetona y dejar que resbalen por los bordes del portaobjetos
6. Agregar unas gotas de safranina y dejar actuar un minuto.

7. Lavar nuevamente con agua para eliminar exceso de colorante y se dejará secar la muestra.
8. Observar al microscopio óptico.

6.4 Estandarización del crecimiento de *K. marxianus* en medio mínimo

Se estandarizó el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en medio mínimo de sales, con el objetivo de evidenciar que utiliza la lactosa como fuente de carbono.

6.4.1 Principio

En microbiología un medio mínimo es un medio de cultivo que contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento de un microorganismo, por lo general sin la presencia de aminoácidos. Tiene una composición definida: agua, una fuente de carbono la cual puede ser un azúcar como la glucosa o la lactosa, diversas sales como magnesio, nitrógeno, azufre y fósforo para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (60).

6.4.2 Procedimiento

Se preparó medio mínimo con dos diferentes fuentes de carbono y medio mínimo sin fuente de carbono utilizando agua destilada, la composición del medio se muestra en la siguiente tabla:

| <i>Medio mínimo fórmula en g/L de agua destilada</i> |
|--|
| <i>Sulfato de amonio 5 g</i> |
| <i>Sulfato de magnesio 2 g</i> |
| <i>Fosfato dipotásico 2 g</i> |
| <i>Agar-agar 14 g</i> |
| <i>*lactosa / glucosa 2 g</i> |

Tabla 1. Composición del medio mínimo

Posteriormente el medio fue esterilizado en autoclave a 15 libras de presión, 121 °C durante 15 min, transcurrido el tiempo de esterilización se vació en placas Petri las cuales se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que el medio gelificó y después se refrigeraron para su uso posterior.

A partir de un cultivo axénico de *Kluyveromyces marxianus*, se hicieron siembras por triplicado en placas con medio mínimo, medio mínimo con lactosa y medio mínimo con glucosa mediante una sola estría recta, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas, posteriormente se realizaon tinciones de Gram de cada cultivo para corroborar la presencia de la levadura.

6.5 Determinación de β -galactosidasa

Con la finalidad de determinar si *K. marxianus* presenta actividad β -galactosidasa, se realizó una prueba empleando O-nitrofenil β -galactopironósido.

6.5.1 Principio

Los microorganismos que son capaces de fermentar rápidamente la lactosa poseen 2 enzimas: la β -galactósido permeasa que está localizada en membrana celular y participa en el transporte de la lactosa al interior de la célula y la enzima β -galactosidasa, que es intracelular e interviene en la hidrólisis de la lactosa con liberación de galactosa y glucosa.

Los microorganismos fermentadores lentos de lactosa son deficientes en la enzima β -galactósido permeasa pero no en β -galactosidasa, y los microorganismos no fermentadores no poseen ninguna de estas 2 enzimas.

El O-nitrofenil β -galactopironósido (ONPG) es un compuesto incoloro, de estructura química similar a la lactosa y que puede ingresar rápidamente al interior del microorganismo sin la necesidad de la enzima β -galactósido permeasa. En el interior de la célula es metabolizado por la enzima β -galactosidasa y se genera galactosa y o-nitro-fenol, que es un compuesto de color amarillo, lo que imdica un resultado positivo.

Al obtenerse un resultado positivo en la prueba del ONPG significa que el microorganismo en estudio es capaz de fermentar la lactosa, por el contrario si el resultado es incoloro (negativo) indicará que el microorganismo no es fermentador de lactosa (61).

6.5.2 Procedimiento

A partir de un cultivo puro de *K. marxianus* en medio de cultivo agar YPD incubado previamente a 37 ° C durante 24 h se tomó con ayuda de un asa bacteriológica una colonia y se sembró en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo medio mínimo con lactosa para inducir la producción de β -galactosidasa, posteriormente se incubó a 37 ° C durante 24 h, transcurrido el tiempo de incubación se realizó tinción de gram y tinción con azul de tripano para determinar viabilidad de las levaduras y descartar contaminación bacteriana.

Se tomaron 500 μ L del cultivo y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1 ml, posteriormente se agregaron 250 μ L de solución de ONPG previamente preparada en buffer fosfato de sodio 100 mM a ph 7, la concentración de ONPG fue según lo indicado en el instructivo del reactante marca SIGMA-ALDRICH, 20.5 mg/ mL.

Se utilizaron dos microorganismos como controles cuyo resultado para la prueba de ONPG es conocido, *Escherichi coli* la cual es ONPG positivo y *Vibrio parahemolitico* que es ONPG negativo; ambas bacterias fueron incubadas previamente en tubos de ensayo de 10 mL con caldo medio mínimo con lactosa a 37 ° C durante 24 h, posterior a este tiempo se tomaron alícuotas de 500 μ L de cada cultivo y se colocaron en tubos eppendorf de 1 mL y se agregó a cada tubo 250 μ L de solución de ONPG, adicionalmente se utilizó otro control de 500 μ L de cultivo de *K. marxianus* en caldo medio mínimo con lactosa pero sin solución de ONPG.

Todos los tubos fueron incubados a baño maría a 37 ° C durante 24 h, transcurrido este tiempo se observaron las reacciones (Color amarillo: ONPG positivo, incoloro: ONPG negativo). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.6 Modelo de intolerancia a la lactosa en ratones CD-1

Se estableció un modelo de intolerancia a la lactosa en ratones macho CD-1 de 15 semanas de edad con un peso mayor a 30 g.

6.6.1 Principio

Estudios previos señalan que ratones CD-1 de 3 semanas de edad presentan una actividad de la lactasa elevada y esta disminuye en ratones de mayor edad, por lo que los ratones presentan una similitud a la hipolactasia del adulto siendo un buen modelo

experimental para la intolerancia a la lactosa, de igual manera el uso de algunos probióticos han disminuido los síntomas de intolerancia a la lactosa en ratones Balb/ C tales como el índice diarreico, además de amentar la motilidad intestinal (55,56).

6.6.2 Procedimiento

Se trabajó con un total de 40 ratones macho CD-1 de 15 semanas de edad distribuidos en 4 grupos, los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas dentro del bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en condiciones estándar con un ciclo 12h/12h luz / oscuridad, a temperatura constante (22 ± 2 °C) y humedad (50%) con alimento marca purina LAB CHOW 5008 y agua controlada (10 g/ ratón- 200 mL/ jaula) y se aclimataron por lo menos durante una semana antes de comenzar los experimentos.

Se inoculó a cada ratón via oral utilizando una cánula de acero inoxidable calibre de 20 mm, conectada a una jeringa estéril de 1 mL, la conformación de los grupos, así como los inóculos empleados se muestra a continuación (Figura 1).

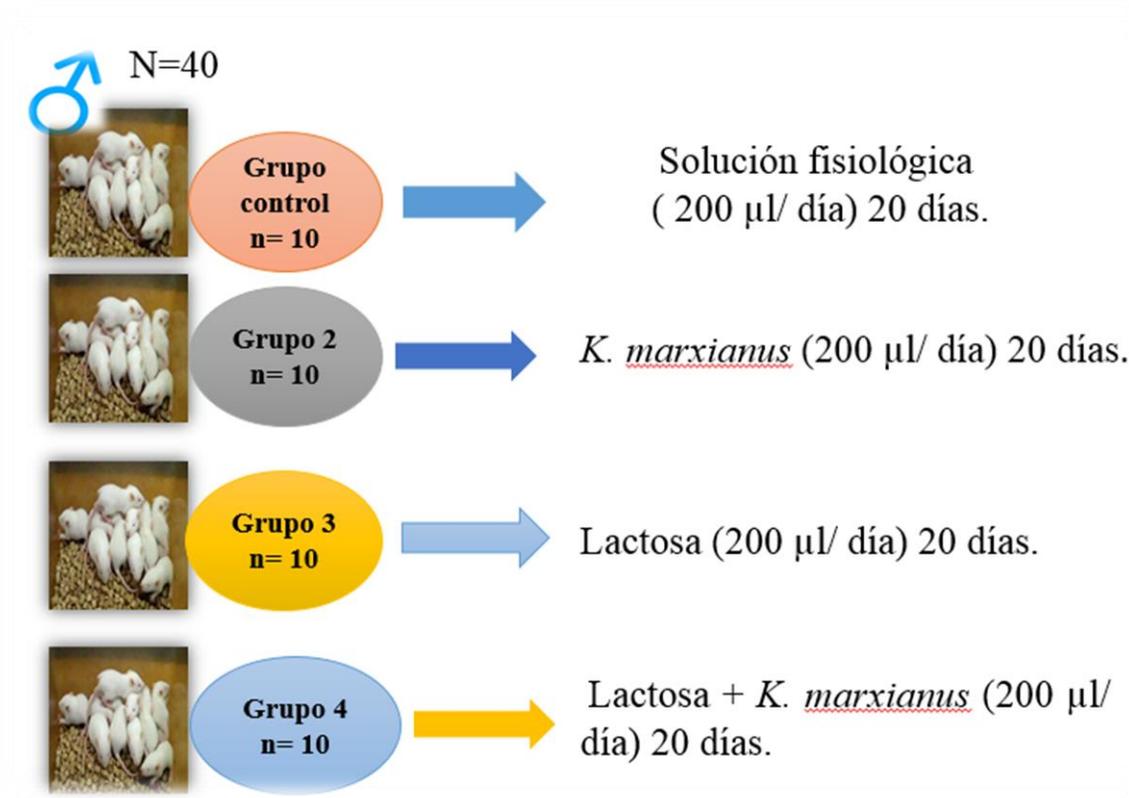


Figura 1. Conformación de los grupos tratados e inóculos administrados

Se midieron y pesaron diariamente durante 20 días los siguientes parámetros:

- Peso del ratón
- Volumen de bebida consumida
- Volumen de orina
- Peso total de las heces

La concentración de lactosa utilizada fue de 50 g/L (cantidad de lactosa contenida en un litro de leche) 25 g/ 60 Kg de peso corporal y el inóculo de levaduras empleado se obtuvo a partir de un cultivo de *K. marxianus* en agar YPD previamente incubada durante 24 horas a 37° C, posteriormente con ayuda de una asa bacteriológica se tomó una de las colonias y se inoculó en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo YPD y se incubó 37° C/24 hrs. Una vez finalizado el periodo de incubación se tomó una alícuota de 90 µL y se agregaron 10 µL de azul de tripano obteniéndose una dilución 1/10, de ésta se tomaron 10 µL para hacer un conteo de levaduras en cámara de Neubauer y comprobar su viabilidad. Se determinó un inóculo de 1×10^8 UFC/mL de levaduras puesto que en estudios previos se determinó que es el inóculo necesario para que la levadura colonice intestino delgado y grueso en modelos de ratones CD-1, además de ser esta la cantidad de microorganismos que se utilizan en la preparación de alimentos comerciales adicionados con microorganismos probióticos (62).

6.7 Prueba de motilidad intestinal

Transcurridos veinte días del experimento, se realizó una prueba para determinar la motilidad intestinal en los ratones de cada uno de los grupos.

6.7.1 Principio

Las funciones del intestino delgado son digerir y absorber nutrientes. La motilidad mezcla el quimo con enzimas digestivas y secreciones pancreáticas, expone nutrientes a la mucosa para su absorción e impulsar el quimo no absorbido al intestino grueso. El carbón activado al ser una sustancia de origen vegetal, la cual se absorbe de manera rápida es un buen marcador para determinar el movimiento de las partículas en el intestino (63).

6.7.2 Procedimiento

Transcurridos los 20 días de tratamiento, a los ratones se les administró 200 μ L de solución de carbón activado con un contenido de 0.5% de goma arábica. Transcurridos 20 minutos después de la administración, los ratones fueron sacrificados en la cámara de CO₂. Se extrajeron los intestinos, se midió el total del intestino delgado y la motilidad intestinal se expresó como el porcentaje recorrido por las partículas de carbón vegetal en el total del intestino.

6.8 Determinación de *Kluyveromyces marxianus* en intestino

Una vez que los intestinos fueron extraídos, se determinó la presencia de *Kluyveromyces marxianus* para evaluar la colonización en intestino delgado.

6.8.1 Principio

Es muy importante que los microorganismos probióticos se adhieran a las células epiteliales del intestino, diversos estudios clínicos señalan que el microorganismo debe establecerse en el ecosistema del tracto gastrointestinal para llevar a cabo sus funciones, los estudios *in vitro* sobre adhesión celular permiten evaluar las condiciones necesarias para su crecimiento, su metabolismo y su capacidad de adhesión. Los estudios de cultivos con órganos o tejidos señalan que una vez extraídos dichos órganos, deben ser lavados con una solución amortiguadora para después ser incubados según las condiciones que se requieran (64).

6.8.2 Procedimiento

Tras los 20 días de tratamiento, todos los grupos dejaron de ser administrados 72 horas antes de su sacrificio, de igual manera fueron dejados en ayuno por un lapso de 24 horas previo al sacrificio de los grupos. El intestino delgado fue extraído posterior al sacrificio de los grupos de ratones tratados, estos fueron lavados con solución de PBS realizando varios enjuagues, posteriormente los intestinos fueron abietos longitudinalmente y se realizó un raspado de cada uno de ellos para sembrarse de manera homogénea en placas

de agar YPD con antibiótico (50 μ L de estreptomina), posteriormente las placas fueron incubadas a 37 ° C durante 24 h, una vez que aparecieron las primeras colonias se realizaron tinciones de Gram para verificar la presencia de las levaduras.

6.9 Histología de intestino delgado

Se realizaron cortes histológicos de intestino delgado con la finalidad de observar cambios morfológicos en las vellosidades intestinales de los grupos tratados así como comprobar la presencia de levaduras en células epiteliales del intestino de ratón y con ello demostrar el efecto de *K marxianus* en el modelo murino de intolerancia a la lactosa.

6.9.1 Principio

Los métodos para obtener diversas muestras de tejido que son utilizadas en el estudio de microscopía óptica se incluyen en la técnica histológica, dicha técnica engloba una secuencia de pasos mediante los cuales una muestra de tejido es cortada y teñida con colorantes ácidos y básicos que permiten identificar la morfología de las células como saber si ha sufrido un cambio, incluso a nivel intracelular, todo ello para poder ser observados al microscopio. El proceso histológico tiene como objetivo dar soporte y endurecer lo suficiente las muestras de tejido para obtener cortes delgados, por lo anterior se utilizan medios de inclusión que permitan obtener una muestra lo suficientemente sólida. Cuanto más se endurezca la pieza y el medio de soporte, más delgados podrán realizarse los cortes. El fundamento de la técnica de cortes de tejidos incluidos en parafina es el siguiente: Dado que los órganos a estudiar se encuentran en formol el cual es hidrosoluble y se requiere pasar a un bloque de parafina para proceder a la realización de los cortes histológicos, el órgano se pasa a través de baños de etanol aumentando su porcentaje, pasando finalmente a baños de xilol con ello consiguiendo la deshidratación: posteriormente se incluyen en baños de parafina para que al enfriarse quede un bloque de consistencia sólida permitiendo los cortes hasta del grosor de una célula; en seguida se pasan a baños de hidratación pasando por alcoholes cada vez más diluidos en agua para obtener baños de los colorantes, hematoxilina y eosina ya que son hidrosolubles; una vez teñidos, sufren deshidrataciones nuevamente pasando a baños de etanol cada vez más concentrado hasta llegar a baños de xilol que

permitirá aplicar una capa de resina sintética y así obtener la preparación fija colocando un cubreobjetos. En función del tipo de corte que se requiera será también el tipo de micrótomos que se utilizará para realizar el corte, los pasos de la técnica histológica son: la obtención de la muestra, la fijación para preservar el material, la inclusión, que consiste en embeber el material en un medio que sea fácil de cortar, el corte para obtener láminas muy delgadas que puedan ser atravesadas por la luz, la tinción mediante determinados colorantes que permitan la visualización de los tejidos y por último el montaje donde se pretende mantener el corte aislado del aire y deshidratado para poder preservarlo (65).

6.9.2 Procedimiento

El proceso que se siguió en la técnica histológica fue el descrito por Verdín y colaboradores (Figura 2) (65). La obtención del tejido se llevó a cabo posterior al sacrificio de los animales, extrayendo una porción de intestino delgado; Para la fijación, un fragmento de 5 cm de intestino delgado de cada uno de los ratones tratados fue colocado en frascos pequeños con formol al 10% para conservar el tejido, los frascos fueron rotulados con el número de ratón y el grupo correspondiente. Posteriormente cada muestra de tejido se deshidrató utilizando alcohol etílico de concentración creciente hasta llegar a alcohol absoluto (50, 70, 80, 95, absoluto) mediante baños de una hora por cada concentración de alcohol; una vez deshidratado, el tejido fue aclarado mediante baños de xilol con la finalidad de hacer transparente el tejido, el volumen de xilol utilizado fue en la misma proporción del agente deshidratante (alcohol) y cada muestra de tejido fue colocada en tres baños con xilol de una hora cada uno, siendo el primer baño en xilol al 50%- alcohol al 50% y los dos posteriores únicamente de xilol.

Antes de la inclusión y para eliminar los residuos de los agentes deshidratantes y el agente aclarante, los tejidos fueron colocados en baños de parafina con el objetivo de infiltrar o rellenar el tejido completamente con el medio en el cual se iba a incluir, en este caso parafina a un punto de fusión de 60 ° C, se realizaron tres baños en parafina de una hora cada uno. La parafina derretida se difundió en aquellos lugares del tejido donde había agua cuando ya ha sido tratada con un agente deshidratante, la inclusión consistió en colocar el tejido en cassetes y rellenar con parafina a 60 ° C en una placa caliente, posteriormente cada cassette fue colocado en una placa fría para que la parafina solidificara y de esta manera se

conformaron los bloques histológicos los cuales se refrigeraron durante una hora antes de realizar los cortes.

Los bloques fueron colocados en un micrótopo manual de rotación marca leica, modelo RM2125RT, para realizar los cortes histológicos, se obtuvieron cortes seriados de un grosor de 0.5 micras los cuales se colocaron en un baño maría a 38 °C que contenía un poco de grenetina para facilitar la adhesión a portaobjetos previamente rotulados con punta diamante, las laminillas fueron colocadas en canastillas y puestas en una estufa a 38 °C para desparafinarse; Una vez que la parafina se derritió, se comenzó el proceso de tinción en el siguiente orden:

- 1) Desparafinar: 2 baños de xilol (3 minutos cada uno)
- 2) Hidratación en baños decrecientes de alcohol
 - Alcohol absoluto (100 °) -----3 minutos
 - Alcohol absoluto (100 °) ----- 3 minutos
 - Alcohol de 95 ° ----- 3 minutos
 - Alcohol de 95 ° ----- 3 minutos
 - Alcohol de 70 ° ----- 3 minutos
 - Agua corriente ----- 5 minutos.
 - Agua destilada (2 baños)-----1 minuto (cada uno)
- 3) Tinción con hematoxilina de Harris de 3 a 5 minutos.
- 4) Lavado en agua destilada (dos baños de un minuto cada uno).
- 5) Diferenciación: alcohol ácido para eliminar el exceso de colorante y lavar en agua corriente durante 2 minutos.
- 6) Virar color:
 - Agua amoniacal ----- 2 minutos
 - Lavar en agua corriente -----5 minutos
 - Agua destilada (2 baños) -----1minuto c/u
- 7) Tinción de eosina durante 5 minutos
- 8) Deshidratación en baños crecientes de alcohol
 - Alcohol de 70 °----- 1 minuto
 - Alcohol de 95 ° -----1 minuto
 - Alcohol de 95 ° -----1 minuto

- Alcohol absoluto (100 °) -----1 minuto
 - Alcohol absoluto (100 °) -----2 minutos
- 9) Aclarar: 2 baños de Xilol de 1 y 2 minutos respectivamente

Una vez finalizado el proceso de tinción las laminillas se prepararon para el montaje, se utilizó una gota de bálsamo de Canadá en cada laminilla y se colocó un cubreobjetos cuidando que no aparecieran burbujas. Las laminillas se colocaron en un horno a una temperatura de 45 ° C durante 24 horas, una vez que la resina tuvo solidez suficiente y los restos de xilol se evaporaron se procedió a la observación de cada una de las laminillas bajo el microscopio óptico.

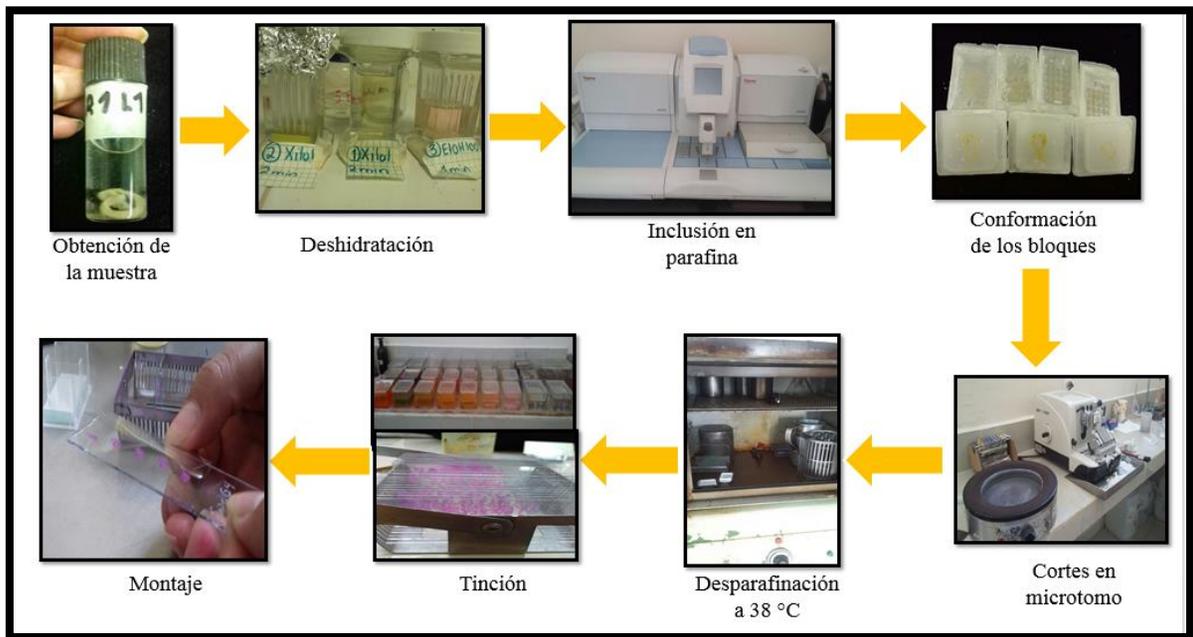


Figura 2. Proceso de la técnica histológica

6.8 Diseño experimental

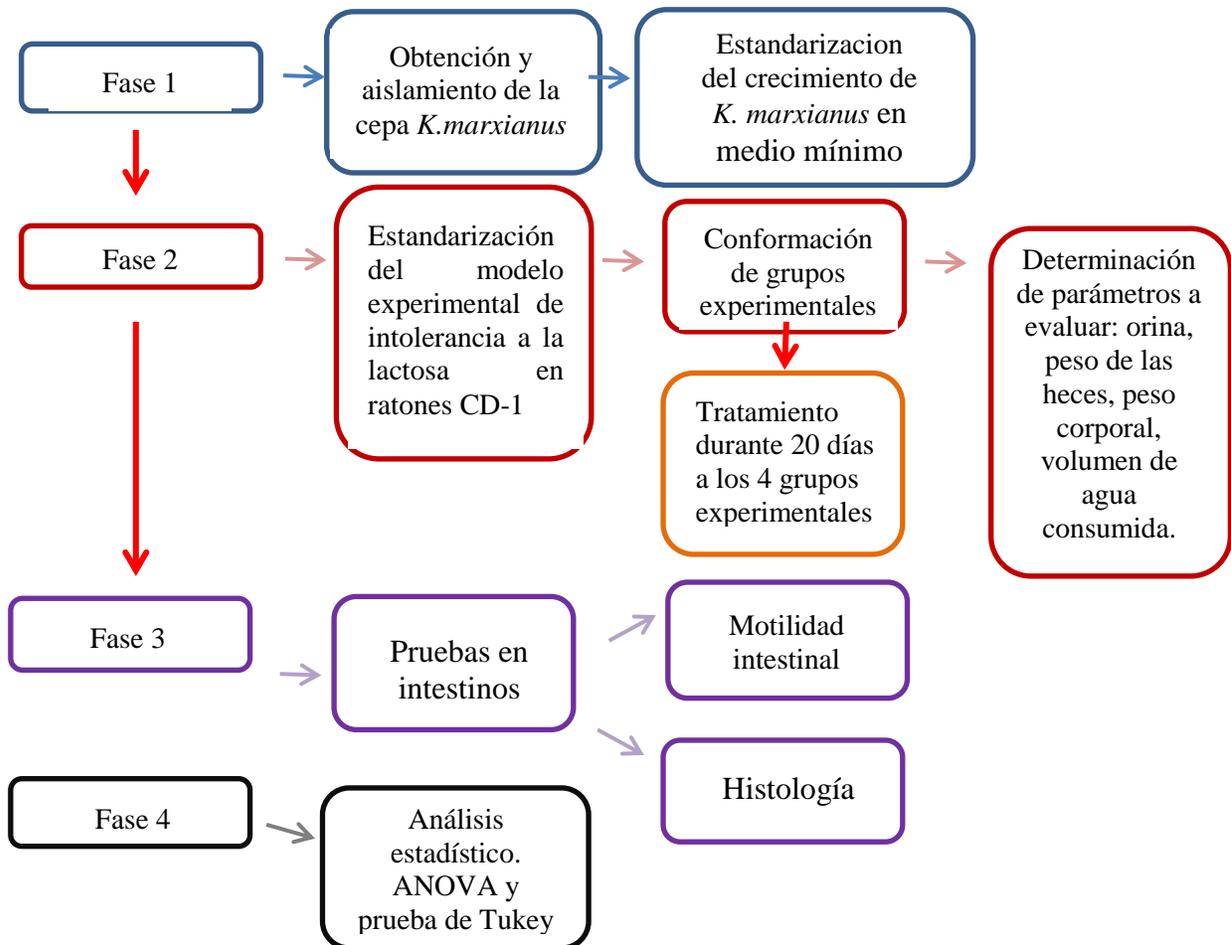


Figura 3. Diseño experimental del estudio

6.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA y posteriormente una prueba de Tukey, se utilizó un valor de $p < 0.05$ para que sea considerado como significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism 5.

VII RESULTADOS

7.1 Cultivos puros

Se obtuvieron cultivos puros de *K. marxianus* en medio de cultivo agar YPD y caldo YPD, para verificar la pureza de los mismos se realizó tinción de Gram, la cual permitía determinar si había contaminación bacteriana en los cultivos; las muestras fueron observadas al microscopio óptico encontrando la presencia de *K.marxianus* únicamente, obteniendo así cultivos axénicos (Figura 4).

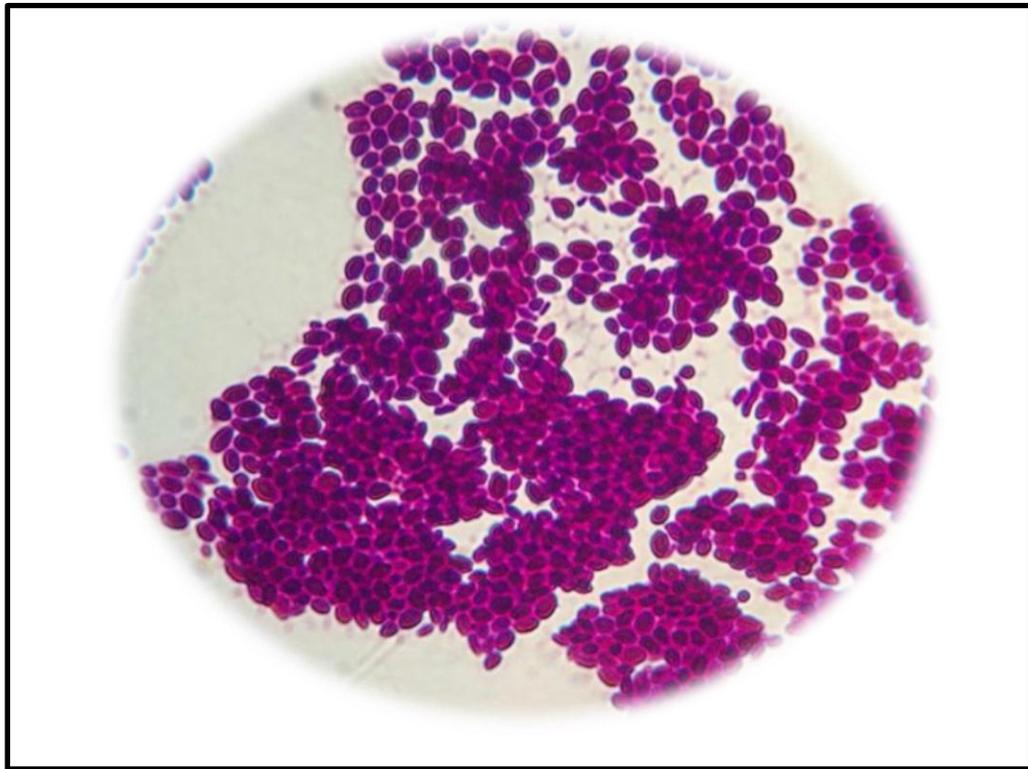


Figura 4. Tinción Gram de *K. marxianus* a partir de un cultivo puro, preparación observada bajo el microscopio óptico a un aumento de 100 x

7.2 Crecimiento en medio mínimo

Se estandarizó el crecimiento de *K. marxianus* en medio mínimo para determinar que utilizaba la lactosa como fuente de carbono para su crecimiento y metabolismo, simultáneamente se sembró en un medio mínimo sin fuente de carbono y un medio mínimo con glucosa como controles. Los resultados mostraron crecimiento de *K. marxianus* en medio

mínimo + lactosa y medio mínimo + glucosa, por otra parte no hubo crecimiento en medio mínimo sin fuente de carbono (Figura 5).

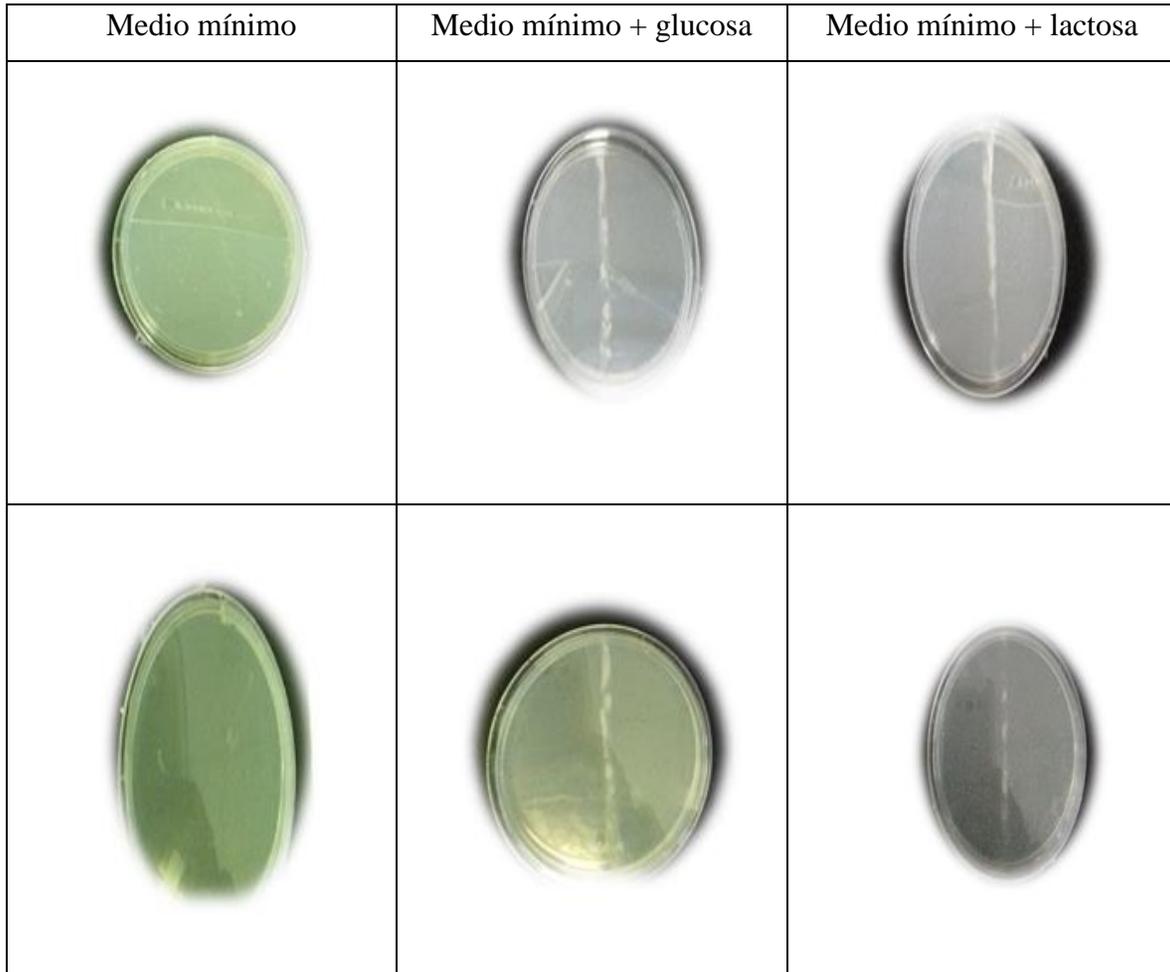


Figura 5. Crecimiento de k. marxianus en medio mínimo. Se observa que no hubo crecimiento de la levadura en el medio mínimo sin fuente de carbono sin embargo se aprecia crecimiento en medio mínimo con glucosa y lactosa como fuente de carbono.

Posteriormente se realizaron tinciones de Gram para verificar la presencia de la levadura en medio mínimo con glucosa y medio mínimo con lactosa, de igual manera para descartar contaminación bacteriana, (Figura 6).

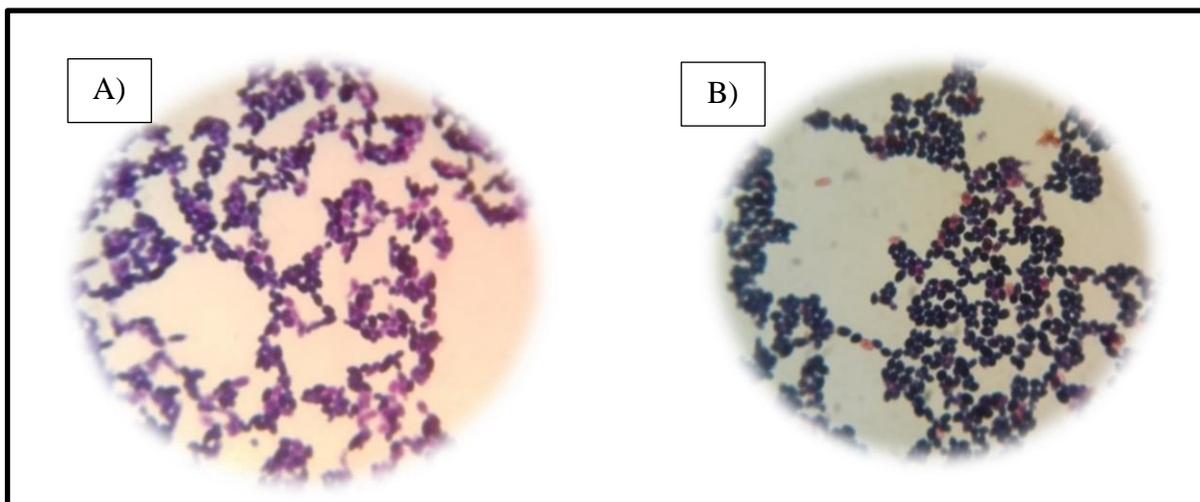


Figura 6. Presencia de *Kluyveromyces marxianus* en medio mínimo. A) *K. marxianus* en medio mínimo + glucosa; B) *K. marxianus* en medio mínimo + lactosa. Ambas preparaciones teñidas mediante la técnica de Gram y observadas al microscopio óptico a un aumento de 100 x.

7.3 Determinación de β -galactosidasa *in vitro*

Posterior al tiempo de incubación de las muestras con la solución de ONPG, los resultados mostraron que *k. marxianus* tiene actividad β -galactosidasa puesto que la solución que contenía levaduras y ONPG adquirió un color amarillo intenso después de 24 h de incubación en baño maría. Al contrastar las muestras de *K. marxianus* con los controles de calidad utilizados, se verificó un color amarillo en las muestras de *E. coli* lo que confirmaba ONPG positivo y ONPG negativo para *Vibrio parahemolítico* donde hubo ausencia de color (Figura 7).

El resultado indica que *k.marxianus* posee la enzima β -galactosidasa que degrada el O-nitrofenil β -galactopironósido obteniendo así galactosa y O-nitro-fenol que es el compuesto que da el color amarillo en los resultados positivos; De esta manera se la capacidad de *K. marxianus* para degradar la lactosa dado que el ONPG es sustrato de estructura química a la lactosa.

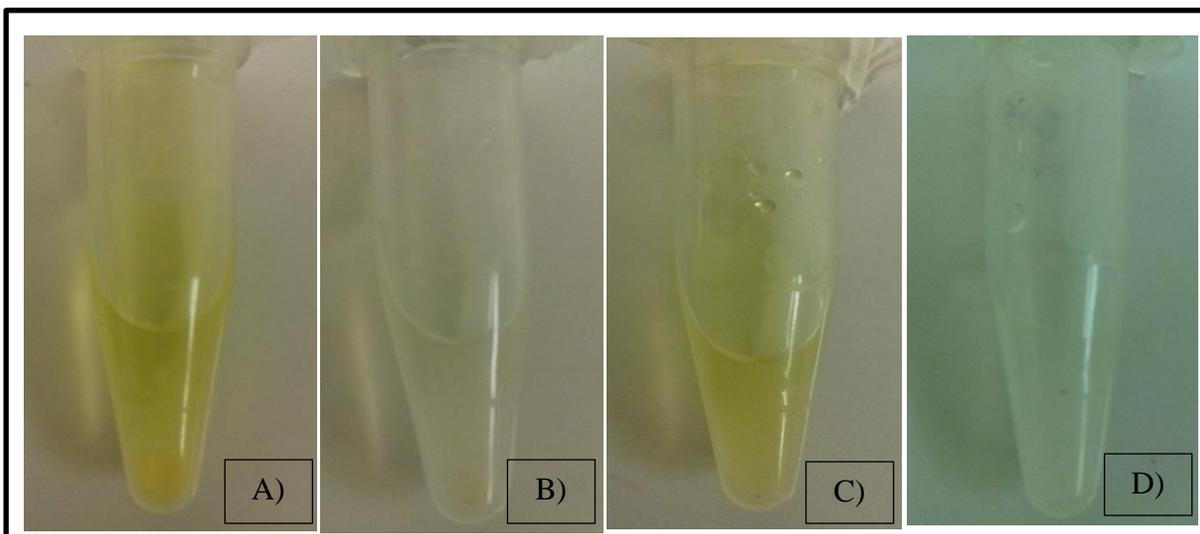


Figura 7. Determinación de β -galactosidasa, prueba de ONPG. A) *K.marxianus*, B) control negativo *V. parahemolítico*, C) Control positivo *E. coli*, D) Control de *K. marxianus* sin solución de ONPG. El color amarillo detona la presencia de la enzima β -galactosidasa, interpretándose como ONPG positivo mientras que la ausencia de color se interpreta como ONPG negativo.

7.4 Modelo de intolerancia a la lactosa en ratones CD-1

Para evaluar la eficacia de *K. marxianus* en disminuir síntomas de intolerancia a la lactosa en ratones CD-1 los ratones fueron administrados con lactosa durante 20 días, simultáneamente un grupo de ratones fue administrado con lactosa más un inóculo de *K. marxianus*, se midió y registró el peso diario de las heces excretadas, el volumen diario de orina excretada, el consumo diario de agua y el peso corporal de cada ratón.

7.4.1 Peso corporal

Para evaluar el efecto de la lactosa y de *K. marxianus* sobre el peso corporal de los ratones estos fueron marcados y su peso registrado diariamente utilizando una báscula digital. Después de realizar la prueba ANOVA y posteriormente la prueba de Tukey los resultados mostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los grupos tratados en comparación al grupo control, la media en cada uno de los grupos no se aleja demasiado sin embargo hubo diferencia entre el grupo administrado con lactosa ($\bar{x} = 38.78$ g, $S^2 = 1.082$) y el administrado con lactosa + *K. marxianus* ($\bar{x} = 40.43$ g, $S^2 = 1.606$) (Figura 8).

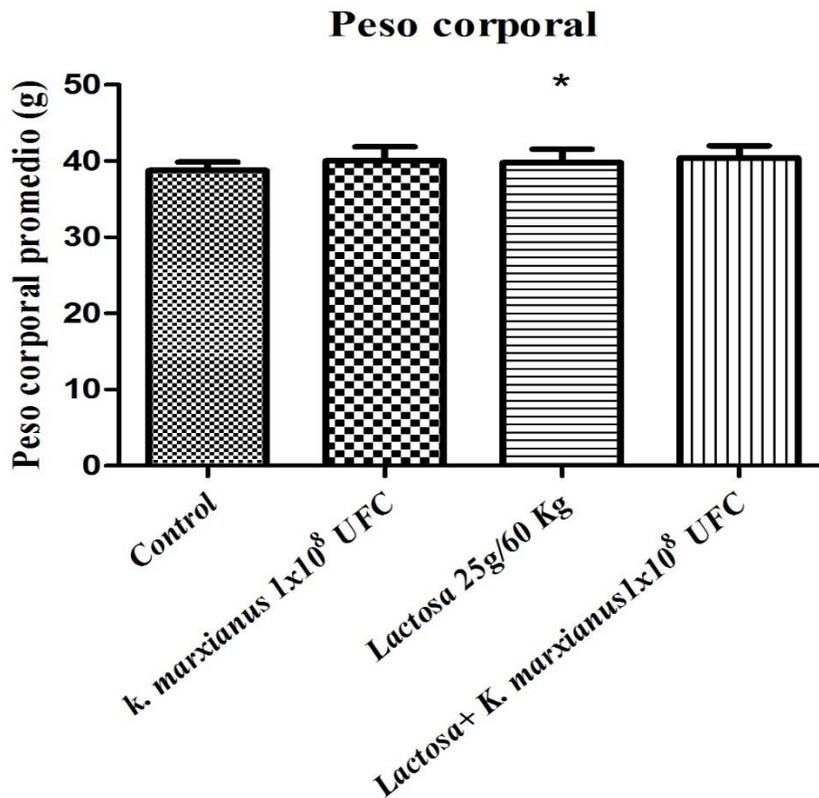


Figura 8. Peso corporal promedio tras 20 días de tratamiento. Se muestra el peso promedio en los cuatro grupos tratados, hubo una diferencia estadísticamente significativa en el grupo administrado con lactosa ($\bar{x} = 38.78$ g, $S^2 = 1.082$) y el grupo control ($\bar{x} = 39.81$ g, $S^2 = 1.765$) de igual manera entre el grupo control y el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* ($\bar{x} = 40.43$ g, $S^2 = 1.606$) Estos resultados permiten inferir un ligero aumento en el peso de los grupos que fueron administrados con lactosa.

7.4.2 Peso total de heces

El peso total de las heces en cada grupo fue registrado diariamente para determinar el incremento o la disminución de estas de acuerdo a la administración oral con las diferentes soluciones y para evaluar el efecto de *K. marxianus* en la disminución de la diarrea inducida por lactosa. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al peso de las heces ($P < 0.05$), observándose una disminución en el grupo tratado con lactosa + *K. marxianus* en comparación con el grupo tratado solamente con lactosa. El peso de las heces en el grupo administrado con lactosa y levadura fue similar al peso de las heces en los grupos controles administrados con solución fisiológica y *K. marxianus* (Figura 9).

La prueba de Tukey reflejó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control comparado con el grupo administrado con lactosa y el grupo

administrado con lactosa más *K. marxianus*; de igual manera hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo administrado solamente con *K. marxianus* y el grupo administrado con lactosa y lactosa más *K. marxianus*.

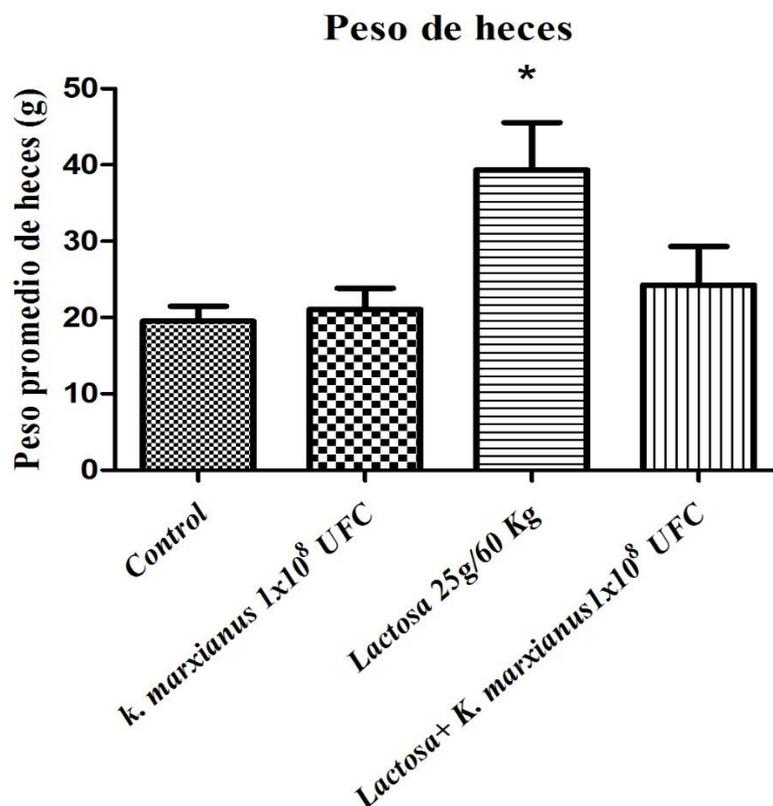


Figura 9. Peso promedio de heces en cada grupo tras 20 días de tratamiento. Se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control ($\bar{x} = 19.5$ g, $S^2 = 1.96$) y el grupo administrado con lactosa ($\bar{x} = 39.35$ g, $S^2 = 5.06$) de igual manera hay una diferencia estadísticamente significativa entre este último grupo y el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* disminuyendo el peso de las heces y demostrando la eficacia de *K. marxianus* en el alivio de la diarrea inducida por lactosa.

7.4.3 Consumo de agua

El consumo de agua por día fue registrado en cada uno de los grupos, de acuerdo a la prueba ANOVA los resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en cuanto al consumo de agua durante los 20 días de tratamiento, sin embargo la prueba posterior de Tukey mostró que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

entre el grupo control y el resto de los grupos tratados, el grupo administrado con lactosa consumió una mayor cantidad de agua en comparación con el grupo control, el grupo administrado con *K.marxianus* y el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* (Figura 10).

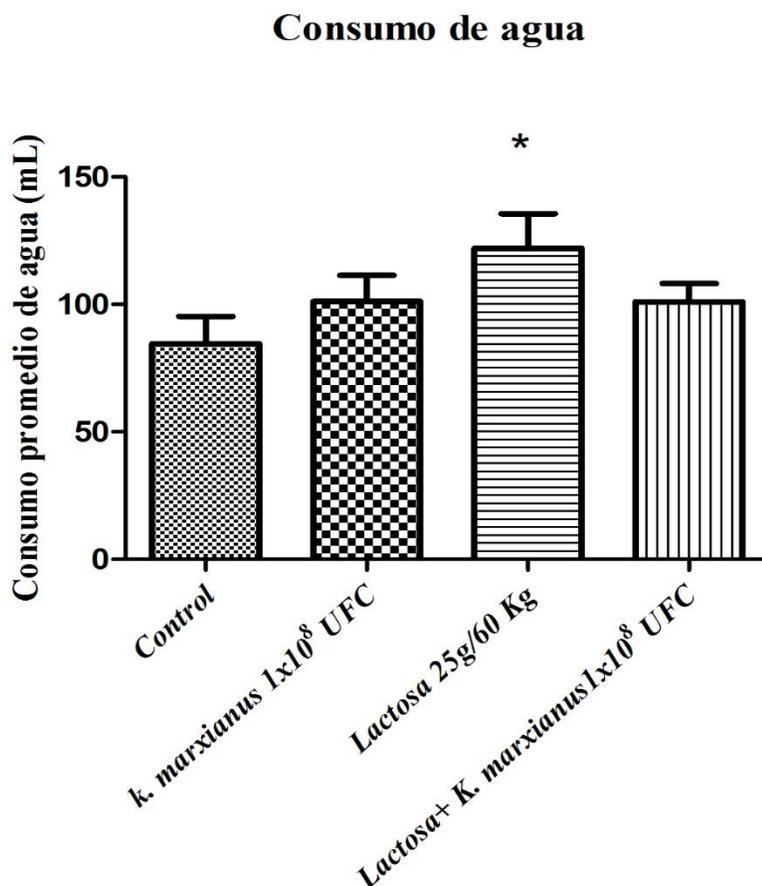


Figura 10. Consumo promedio de agua en cada grupo tras 20 días de tratamiento. Se observa que el grupo administrado con lactosa (\bar{x} 122.1 mL, $S^2=13.44$) consumió una mayor cantidad de agua en comparación con el grupo control (\bar{x} = 84.55 mL, $S^2=10.79$), el grupo administrado con *K. marxianus* (\bar{x} = 101.1 mL, $S^2=7.082$) y el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* (\bar{x} = 101.2 mL, $S^2=10.25$) quienes consumieron una cantidad de agua menor.

7.4.4 Orina excretada

El volumen de orina excretada diariamente fue registrado para determinar poliuria en los ratones tras la administración de los diferentes inóculos. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en el volumen de orina excretada en cada uno de los grupos, el grupo que fue administrado con lactosa excretó un volumen mayor en comparación con el resto de los grupos tratados, el volumen de orina tuvo una ligera

disminución en el grupo que fue administrado con lactosa + *K.marxianus*, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 11). La diferencia existente entre el grupo control y el grupo administrado con lactosa infiere una poliuria en este último grupo debido al exceso de solutos (lactosa).

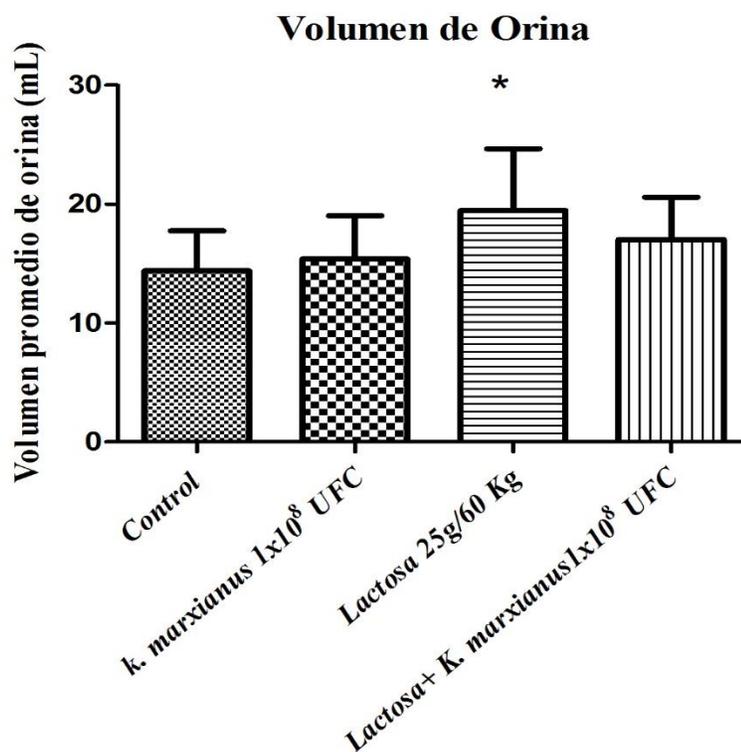


Figura 11. Volumen promedio de orina excretada. Se observa que el grupo administrado con lactosa ($\bar{x}=19.46$, $S^2=5.207$) excretó un volumen mayor de orina en comparación con el grupo control ($\bar{x}=14.40$ mL, $S^2=3.362$), de igual manera se observa una ligera disminución del volumen de orina en el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* ($\bar{x}=17.05$, $S^2=3.546$).

7.4.5 Motilidad intestinal

Para determinar el porcentaje de motilidad intestinal los ratones fueron administrados con una suspensión de carbón vegetal y goma arábica al 0.5%. La distancia recorrida por las partículas de carbón vegetal en la longitud total del intestino fue expresada en porcentaje e interpretada como porcentaje de motilidad intestinal.

En el grupo administrado con lactosa las partículas de carbón vegetal recorrieron una menor distancia en la longitud del intestino, esto ligado a la inflamación intestinal que presentaban, en comparación los otros grupos mostraron que las partículas de carbón vegetal recorrieron una distancia mayor en la longitud total del intestino y no se observó inflamación (Figura 12).

En cuanto al análisis estadístico los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en el grupo administrado con lactosa y el resto de los grupos tratados, los ratones que consumieron lactosa mostraron un menor porcentaje de motilidad intestinal en comparación con el grupo control y el grupo administrado con *K. marxianus*, sin embargo el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* mostró un porcentaje de motilidad intestinal mayor que el grupo tratado con lactosa, demostrando que *K. marxianus* revierte la reducción de motilidad intestinal ocasionada por lactosa (Figura 13).

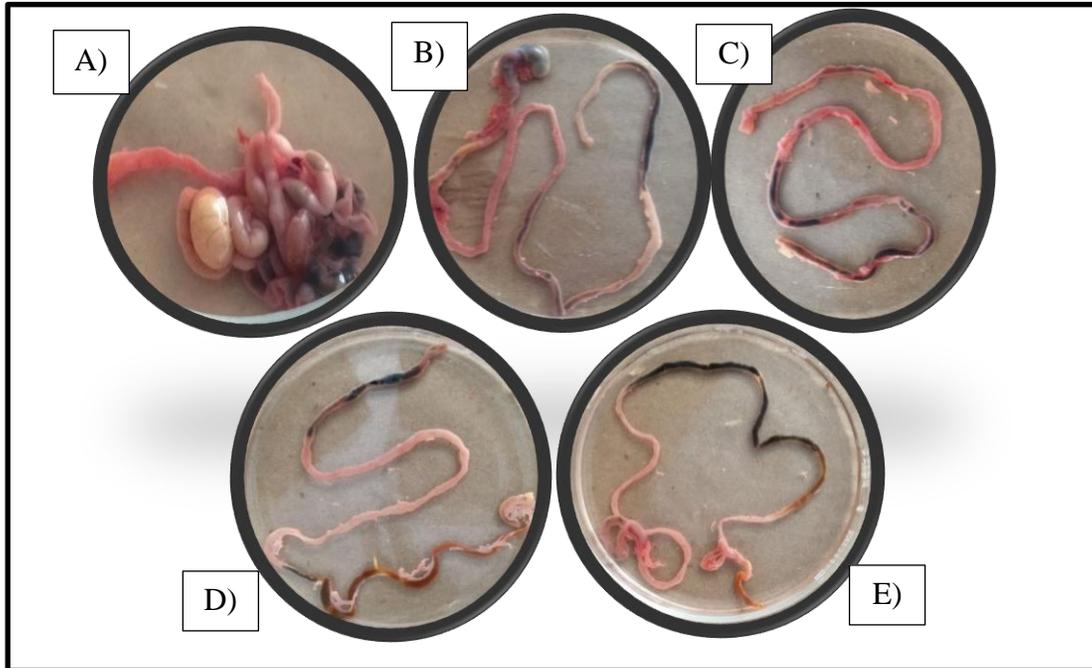


Figura 12. Prueba de motilidad intestinal en intestino delgado. Se observa una acumulación de color oscura que corresponde a la distancia recorrida por las partículas de carbón activado en la longitud total del intestino. A) Intestino de ratón sometido a ingesta de lactosa, al momento de su extracción se observó gran acumulación de gas e inflamación. B) Intestino de ratón perteneciente al grupo control, se aprecia que las partículas de carbón activado recorrieron casi la totalidad del intestino. C) Intestino de ratón perteneciente al grupo inoculado con *K. marxianus*, se aprecia que las partículas de carbón llegaron hasta la porción terminal del intestino. D) Intestino de ratón perteneciente al grupo sometido a la ingesta de lactosa, se observa que las partículas de carbón activado se quedan estancadas en la primer porción del intestino lo que indica la escasa motilidad intestinal que presentaban los ratones de este grupo. E) Intestino de ratón perteneciente al grupo inoculado con lactosa y *K. marxianus*, se observa que las partículas de carbón recorrieron gran parte del intestino, en comparación del grupo administrado con lactosa, la motilidad intestinal no se vio afectada a pesar de la ingesta con lactosa.

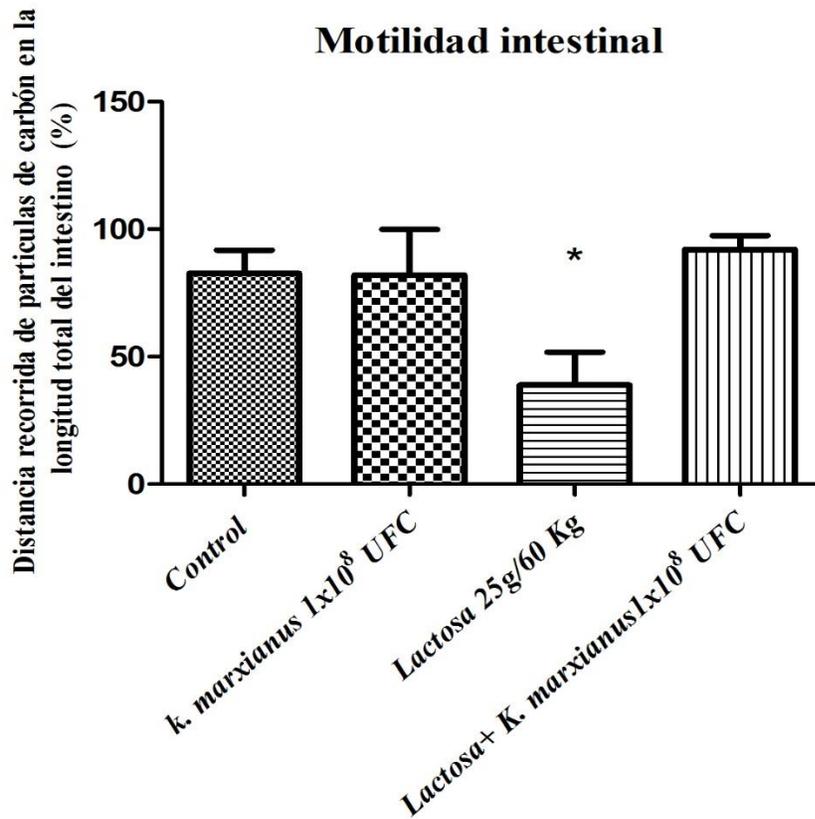


Figura 13. Porcentaje de motilidad intestinal. Se observa que los ratones que consumieron lactosa ($\bar{x}=38.94$, $S^2=12.84$) mostraron un menor porcentaje de motilidad intestinal en comparación con el grupo control ($\bar{x}=82.65$, $S^2=9.216$) y el grupo administrado con *K. marxianus*, sin embargo el grupo administrado con lactosa + *K. marxianus* ($\bar{x}=92.02$, $S^2=5.504$) mostró un porcentaje de motilidad intestinal mayor que el grupo tratado con lactosa, demostrando que *K. marxianus* revierte la reducción de motilidad intestinal ocasionada por lactosa.

7.4.6 *Kluyveromyces marxianus* en intestino delgado

Se realizaron tinciones de Gram para verificar la presencia de *Kluyveromyces marxianus* en intestino delgado tras el raspado de cada uno de ellos; se observó la presencia de la levadura en los cultivos cuyo raspado intestinal provenía de los grupos que fueron administrados con *Kluyveromyces marxianus*, lo anterior tanto en el grupo administrado solamente con el inóculo de *K. marxianus* como en el administrado con lactosa y *K. marxianus* (Figura 14). En el caso de los cultivos cuyo raspado intestinal provenía del grupo inoculado con lactosa y el grupo administrado con solución salina no se observó la presencia de *K. marxianus*.

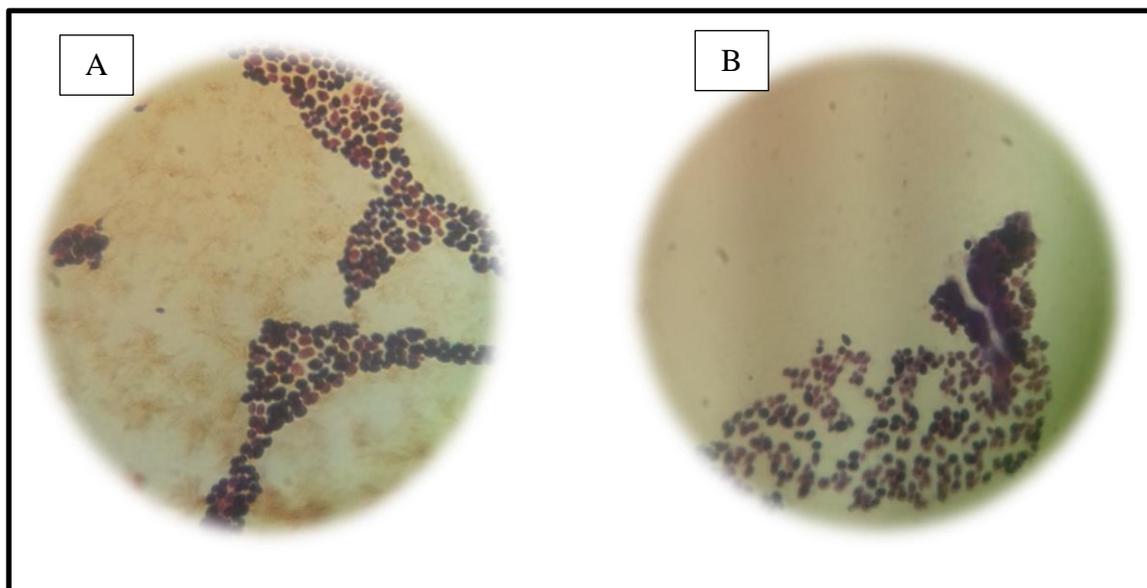


Figura 14. *Kluyveromyces marxianus* en intestino delgado. A) Tinción de Gram a partir de un cultivo de raspado intestinal correspondiente al grupo administrado durante 20 días con un inóculo de *K. marxianus* de 1×10^8 UFC. B) Tinción de Gram a partir de un cultivo de raspado intestinal correspondiente al grupo administrado con lactosa + *K. marxianus*. En ambas preparaciones se observa la presencia de *K. marxianus* en color azul-violáceo bajo microscopio óptico a un aumento de 100x.

7.4.7 Histología de intestino delgado

De las cuarenta muestras histológicas obtenidas, se observó que en las correspondientes al grupo inoculado con solución fisiológica (control) y al grupo inoculado con *K. marxianus* no hubo cambios morfológicos en las vellosidades intestinales y se observó evidencia de borde en cepillo. El tercer grupo inoculado con lactosa presentó diversos cambios a nivel intestinal observándose células con vacuolas citoplasmáticas irregulares y de tamaño variable, sin evidencia de borde en cepillo, espacios intraepiteliales de gran tamaño, granulomas y linfocitos que señalaban un proceso inflamatorio en la mayoría de las muestras analizadas, lo anterior también se observó en el grupo inoculado con lactosa + *Kluyveromyces marxianus* donde en la mayoría de las muestras presentaron cambios morfológicos como los mencionados en el grupo inoculado únicamente con lactosa (Figura 15). Lo anterior indica que el consumo de lactosa está directamente relacionado con la aparición de cambios estructurales a nivel de células del intestino delgado.

La presencia de levaduras se observó tanto en las muestras del grupo inoculado con *K. marxianus* como en las muestras del grupo inoculado con lactosa + *K. marxianus* comprobándose así la adhesión y colonización de las mismas en el intestino de los ratones inoculados (Figura 14), los criterios para la interpretación de los resultados de cortes histológicos fueron los siguientes:

- a) Presencia de vacuolas: Gran actividad metabólica o deterioro de las células por envejecimiento o por tratamiento.
- b) Espacios intravellosos: Afección tisular disminuyendo la absorción normal del intestino.
- c) Presencia de granulomas: Reacción inmune del hospedero por la presencia de antígeno o por reacciones inflamatorias tendientes a la cronicidad.
- d) Presencia de linfocitos: Reacción inmune del hospedero por la presencia de antígeno o por reacciones inflamatorias de tipo agudo o crónico.
- e) Presencia de levaduras: Colonización de *K. marxianus*, lo que indica una adaptación de tres a veinte días.

Los resultados del análisis de las muestras histológicas se concentran en la tabla número 2.

| | Muestras | Vacuolas | Espacios intraepiteliales | Granulomas | Linfocitos | Levaduras |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Control | Muestra 1 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 2 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 3 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 4 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 5 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 6 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 7 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 8 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 9 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 10 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| <i>K. marxianus</i> | Muestra 1 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 2 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 3 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 4 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 5 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 6 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 7 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 8 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 9 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 10 | Ausencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| Lactosa | Muestra 1 | Presencia | Anormales | Presencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 2 | Presencia | Anormales | Ausencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 3 | Presencia | Anormales | Ausencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 4 | Presencia | Normales | Ausencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 5 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 6 | Presencia | Anormales | Presencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 7 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 8 | Presencia | Anormales | Ausencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 9 | Presencia | Anormales | Presencia | Ausencia | Ausencia |
| | Muestra 10 | Presencia | Normales | Presencia | Ausencia | Ausencia |
| lactosa + <i>K. marxianus</i> | Muestra 1 | Presencia | Normales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 2 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 3 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 4 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 5 | Presencia | Anormales | Presencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 6 | Presencia | Normales | Ausencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 7 | Presencia | Normales | Presencia | Presencia | Ausencia |
| | Muestra 8 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Presencia |
| | Muestra 9 | Presencia | Normales | Ausencia | Presencia | Presencia |
| | Muestra 10 | Presencia | Anormales | Ausencia | Ausencia | Presencia |

Tabla 2. Resultados del análisis de histología intestinal.

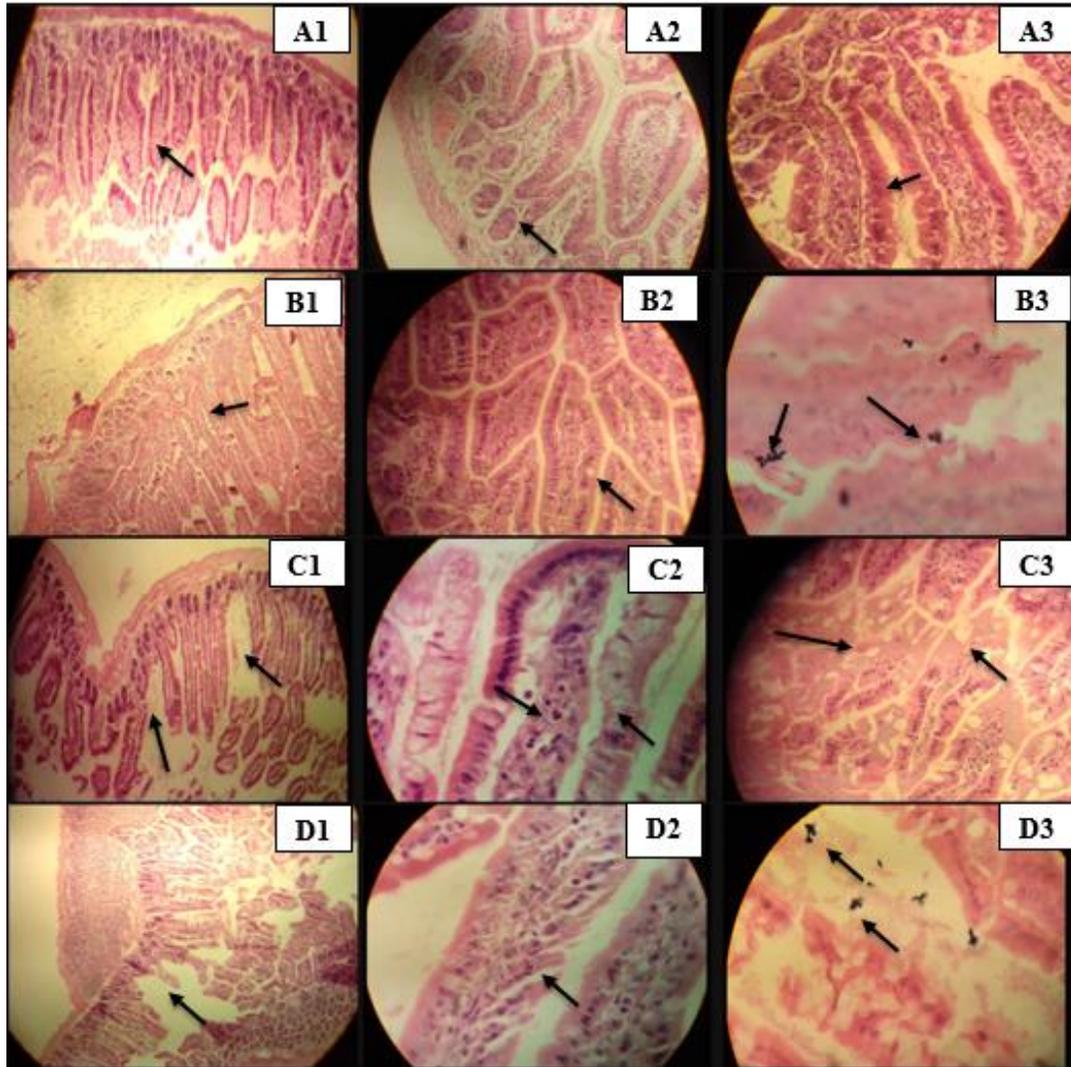


Figura 15. Histología de intestino delgado, tinción hematoxilina-eosina. Se muestran imágenes representativas de la histología de intestino delgado de cada grupo tratado. **A) Grupo control.** A1) Se observan vellosidades intestinales sin cambios morfológicos, microscopio óptico aumento 10 x. A2) Imagen de una vellosidad intestinal en corte transversal, no se observan cambios morfológicos y se aprecian glándulas de Lieberkhun, 40x. A3) Vellosidad intestinal en corte longitudinal, se observan enterocitos con borde en cepillo al microscopio óptico, aumento 40x. **B) Grupo inoculado con *K. marxianus*.** B1) Vellosidades intestinales observadas bajo microscopio óptico, aumento 10 x. B2) Vellosidades intestinales en corte transversal, aumento 40 x, se aprecian células caliciformes y enterocitos sin cambios morfológicos. B3) Presencia de *K. marxianus* en células de intestino delgado observadas a un aumento de 40x. **C) Grupo inoculado con lactosa.** C1) Vellosidades intestinales observadas bajo microscopio óptico, aumento 10 x, se aprecian grandes espacios intravellosos así como deformidad en las vellosidades. C2) Vellosidad intestinal observada a un aumento de 40 x, se aprecian células con vacuolas citoplasmáticas irregulares y de tamaño variable, sin evidencia de borde en cepillo, de igual manera se observan células sin núcleo y la presencia de linfocitos. C3) Presencia de vacuolas en vellosidades intestinales observadas al microscopio óptico, aumento 40 x. **D) Grupo inoculado con lactosa + *K. marxianus*.** D1) Vellosidades intestinales observadas a un aumento de 10 x, se aprecian grandes espacios intravellosos así como deformidad en las vellosidades. D2) Se observan células con vacuolas irregulares de tamaño variable, no se observa evidencia de borde en cepillo, aumento 40x. D3) Presencia de *K. marxianus* en vellosidades intestinales donde además se observan grandes vacuolas ocasionadas por el consumo de lactosa, aumento 40x.

VII DISCUSION DE RESULTADOS

7.1 *Kluyveromyces marxianus* utiliza la lactosa como fuente de carbono para su crecimiento

En la presente investigación se trabajó con una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, levadura aislada del pulque, dicho microorganismo presenta capacidades probióticas y representa una opción en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa ya que es capaz de utilizar este carbohidrato y presenta la enzima encargada de su hidrólisis. Se evaluó el efecto de este microorganismo en un modelo *in vivo* de ratones con síntomas inducidos de intolerancia a la lactosa.

Las levaduras aisladas en este estudio fueron similares a las que reportan Cervantes-Contreras y Pedraza-Rodríguez en su estudio (66) quienes identificaron bioquímicamente las levaduras que lograron aislar como *Saccharomyces sp.* Escalante *et al* (67) por su parte señalan que hay una gran diversidad microbiológica en el pulque, tanto bacterias, como levaduras; mientras que Abundis (68) afirma que de esta bebida se pueden obtener más de 50 diferentes géneros de microorganismos. Esto depende en gran medida del agave que se utilice y el medio de cultivo que se emplee para realizar el aislamiento, en este caso se utilizó el medio de cultivo mínimo de sales cuya composición es fundamental para evidenciar que *K. marxianus* utiliza la lactosa como sustrato para su crecimiento y metabolismo. En estudios previos se había descrito que este microorganismo utiliza gran variedad de sustratos para su crecimiento siendo muchos de ellos carbohidratos como glucosa, sacarosa, galactosa y maltosa, sin embargo comprobar que *K. marxianus* utiliza la lactosa era de suma importancia en esta investigación. Se observó el crecimiento de la levadura en un medio mínimo lactosado lo que coincide con Bansal y colaboradores (57) y Araujo y colaboradores (69) quienes utilizaron suero de leche que contenía 4.4% - 5.6% de lactosa en un medio de cultivo para el crecimiento de *K. marxianus* observándose crecimiento tras 36 h de incubación, en contraste el porcentaje de lactosa utilizado en el medio de cultivo empleado en este trabajo fue de 0.2% observándose crecimiento a las 24 h de incubación; estas diferencias pueden deberse precisamente a la composición del medio de cultivo empleado ya que en ambos trabajos señalados anteriormente utilizaron un medio de cultivo que además del suero de leche y las proteínas propias de este, contenía extracto de malta, extracto de levadura, peptona

y glucosa, esta es una composición muy diferente al medio de cultivo que se utilizó puesto que éste contenía sulfato de amonio, sulfato de magnesio, fosfato dipotásico y lactosa como única fuente de carbono; el agotamiento de los nutrientes y los cambios fisiológicos que ocurren en el medio de cultivo y el ambiente son factores que podrían inferir en el crecimiento celular, específicamente en las células que entran a la fase estacionaria y eventualmente la muerte de algunas de ellas, de igual manera la presencia de células vivas así como de carbohidratos en el medio harían que la fase estacionaria se mantuviera por más tiempo. Por otro lado la temperatura de incubación empleada en los ensayos realizados tanto por Bansal y colaboradores como por Araujo y colaboradores va de 30-35 ° C mientras que en el presente estudio la temperatura de incubación empleada fue de 37 ° C, esto coincide con lo reportado por Roostita y Fleet quienes observaron que *K. marxianus* crece en un rango de temperatura de 20 ° C a 39 ° C (70).

7.2 *Kluyveromyces marxianus* presenta actividad β -galactosidasa

La hidrólisis de lactosa es llevada a cabo por la enzima lactasa (β -galactosidasa), debido a que en este estudio la cepa de *K. marxianus* fue aislada del pulque, era indispensable corroborar que la levadura expresara esta enzima para considerarse una opción en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa puesto que, como sabemos, una ausencia o disminución de lactasa en el intestino conlleva a un cuadro de intolerancia a la lactosa. Al utilizar O-nitrofenil β -galactopironósido (ONPG) como sustrato para determinar la actividad β -galactosidasa en *K. marxianus* se encontró que efectivamente la cepa utilizada de *K. marxianus* presenta la enzima encargada de la hidrólisis de lactosa.

Jackson y Jelen (19) señalan que las características y propiedades de las lactasas varían dependiendo de la fuente de obtención, las lactasas de levadura y bacterias son en general más termolábiles, estas lactasas tienen una temperatura óptima alrededor de 37 °C, y muestran una pérdida al elevar la temperatura a 55 °C, esto coincide con lo observado en este estudio puesto que la temperatura que se empleó para la incubación de *K. marxianus* en medio mínimo lactosado con ONPG fue de 37 ° C cuando la temperatura se elevaba no se detectaba la presencia de la enzima, esto puede deberse a que en el caso de la lactasa de *K. marxianus* cambios en su estructura pueden conducir a una pérdida gradual de su actividad, tal como lo propuso Mahoney en 1980 (70), donde señala que esta enzima contiene grupos sulfhidrilo,

de los cuales depende en gran medida su capacidad hidrolítica, y que a medida que estos van desapareciendo o se oxidan a enlaces de disulfuro, la actividad va disminuyendo, principalmente porque su modificación conlleva cambios en la estructura terciaria de la enzima. Estudios cinéticos con ácido 5,5-ditiobis (2- nitrobenzónico) (DTNB) sugieren que ninguno de estos sulfhidrilos están en el sitio activo, pero su modificación resulta en una pérdida gradual de la actividad, dado que el cuerpo humano tiene una temperatura de 37 ° C se puede explicar que la lactasa de *K. marxianus* pueda actuar a estas condiciones para realizar su actividad hidrolítica (71).

7.3 Efecto de *K. marxianus* en el modelo *in vivo* de intolerancia a la lactosa

Actualmente, existen muy pocos estudios enfocados en un modelo *in vivo* de intolerancia a la lactosa, este estudio se centró en inducir algunos de los síntomas que se presentan en dicho trastorno tales como la diarrea e inflamación intestinal tras la ingesta de lactosa en ratones CD-1 partiendo de estudios previos los cuales señalan que la actividad de la lactasa depende de la edad, siendo menor en su etapa adulta en ratones Balb/ C, conejos y ratas, esta situación se generaliza para la mayoría de los mamíferos, incluso para los seres humanos (55,72). Teniendo en cuenta lo anterior los ratones empleados en esta investigación fueron ratones adultos de la cepa CD-1 de 15 semanas de edad a los cuales se les administró lactosa por vía intragástrica observando que desde los primeros días de ingesta de lactosa, estos comenzaron a presentar un aumento en el peso y presentaron disminución en la consistencia de las heces, con un incremento en el consumo de agua reflejado en el aumento en el volumen de orina.

En diversos estudios se ha observado que la administración de lactosa en ratas provoca diarrea, a semejanza de lo que presentan pacientes intolerantes a la lactosa cursa con alteraciones en la morfología y la función absorbente del intestino (73). Los resultados en este trabajo mostraron que la masa fecal incrementa desde el primer día de consumo de lactosa, lo que coincide con algunos trabajos que señalan además que hay una relación entre el estado nutricional, la capacidad inmunitaria y la diarrea inducida por lactosa (74). El uso de probióticos para disminuir los síntomas de intolerancia a la lactosa, incluyendo la diarrea se ha estudiado poco aunque con resultados significativos; en este caso se observó que *Kluyveromyces marxianus* disminuye la masa fecal así como la consistencia de las heces diarreicas aun

cuando el consumo de lactosa es persistente, en estudios anteriores se observó que ciertos probióticos como *Lactococcus lactis* MG1363 / FGZW producen un mismo efecto al disminuir el peso total de las heces al ser administrado de forma profiláctica durante 4 semanas sometiendo a los ratones posteriormente en una ocasión a la ingesta de lactosa(55); en el presente estudio se administró la lactosa diariamente durante 20 días concomitante al tratamiento con *Kluyveromyces marxianus*, observando los mismos resultados. El aumento en el peso de las heces así como la consistencia que presentaban (heces diarreicas) es debido a que durante la diarrea osmótica hay una movilización de agua hacia la luz intestinal, esto como consecuencia a una carga importante de solutos osmóticamente activos como lo es la lactosa.

La diarrea, es el resultado de cambios que ocurren en el transporte de fluidos y electrolitos en el intestino delgado y/o grueso. El enterocito presenta una serie de transportadores ubicados en el espacio intraluminal e intersiticial, la función de dichos transportadores es movilizar azúcares e iones permitiendo la absorción de nutrientes y a su vez un equilibrio eléctrico adecuado. El movimiento de agua, a través del epitelio, hacia la luz intestinal es un proceso pasivo que ocurre secundariamente a un gradiente osmótico, en el cual el cloro y el bicarbonato son los iones predominantes. La secreción de cloro depende de señales intra y extracelulares, esto condiciona la acción de segundos mensajeros como AMPc, GMPc y calcio intracelular sobre proteínas transportadoras y canales de cloro, específicamente a nivel de las criptas en el intestino delgado (75).

Se observó que los ratones administrados con lactosa consumían un volumen mayor de agua en comparación con el grupo control y los grupos administrados con *K. marxianus*, este aumento en el consumo de agua estuvo acompañado a su vez por un aumento en el volumen de orina excretada, Arciniegas y colaboradores observaron el mismo patrón al evaluar el volumen urinario en ratas con diarrea inducida por lactosa, determinando que este era mucho mayor en comparación con las ratas que no presentaban diarrea (74). Este proceso depende en gran medida del equilibrio hídrico del organismo, el volumen de orina está muy controlado y sirve para regular el equilibrio de líquidos en el cuerpo y la excreción de los solutos, una mayor concentración de solutos requerirá de una mayor cantidad de agua para poder eliminarlos, esto explicaría que los ratones que consumen lactosa necesiten consumir un mayor volumen de agua para poder eliminar la concentración de solutos de lactosa. En la

mayoría de los casos, tanto la regulación del agua como la excreción de solutos pueden realizarse de manera independiente, si hay un gran volumen de agua que eliminar entonces no habrá cambios importantes en la cantidad total de solutos que tengan que ser eliminados, lo anterior se basa en la capacidad de los riñones para producir una concentración de orina muy variada. La osmolaridad máxima de la orina representa un límite por encima del cual ambas funciones de los riñones ya no pueden coexistir puesto que define un volumen mínimo necesario para excretar la carga de solutos presentes en el organismo, independientemente del estado del equilibrio hídrico del cuerpo (76).

Por último en cuanto al peso corporal de los ratones, los resultados mostraron contrario a lo esperado que los ratones sometidos a la ingesta de lactosa presentaron un ligero aumento de peso con respecto al resto de los grupos tratados, a pesar de que en la mayoría de las veces la diarrea inducida por lactosa provoca una disminución del peso corporal, en este caso se puede explicar el aumento debido precisamente al consumo prolongado del carbohidrato, esto coincide con lo observado por Arciniegas y colaboradores (74) puesto que señalan que en ratas desnutridas con diarrea osmótica inducida por lactosa el peso corporal se mantuvo esto debido al instinto de supervivencia de las ratas ya que aun estando desnutridas y con diarrea no dejaron de comer y de esta manera su condición empeoró; bajo el anterior supuesto, los ratones expuestos a la ingesta de lactosa en este caso tuvieron un comportamiento similar al descrito anteriormente en ratas.

7.4 *Kluyveromices marxianus* revierte la reducción de la motilidad intestinal ocasionada por lactosa

Los resultados en este estudio mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de motilidad intestinal entre los grupos tratados, observando disminución en el grupo de ratones que consumieron lactosa y tratamiento placebo mientras que el grupo tratado con *k. marxianus* no presentó dicha reducción, sino por el contrario se observó ligeramente aumentada. Diversos estudios señalan que los probióticos estimulan la motilidad intestinal y de esta manera contribuyen a la expulsión de algunas moléculas procarcinogénicas, bacterias patógenas y enzimas favoreciendo las condiciones saludables del intestino (77), *K. marxianus* al ser un microorganismo probiótico estimuló la motilidad intestinal aun en presencia de lactosa.

Se observó macroscópicamente inflamación intestinal en el grupo de ratones que fueron sometidos a la ingesta de lactosa sin tratamiento y mostraron un menor porcentaje de motilidad intestinal, diversos estudios señalan una teoría en cuadros de intolerancia a la lactosa o colitis donde se presenta inflamación crónica, esta teoría sugiere que existe un desbalance entre las bacterias benéficas y perjudiciales y dicho desbalance ecológico produce inflamación intestinal crónica en la cual se ha observado en general un aumento de bacterias patógenas como *E. coli* (78,79). Teniendo en cuenta lo anterior los resultados en esta investigación sugieren que el consumo de lactosa provoca inflamación intestinal y por esta razón la motilidad intestinal en el grupo tratado con este carbohidrato fue menor en comparación con el grupo control y los grupos administrados con *K. marxianus*, sin embargo hay que tener en cuenta que la motilidad intestinal se debe a la interacción especializada de varios elementos como el sistema nervioso entérico, plexos nerviosos, capas musculares y células intersticiales que trabajan en conjunto para que las paredes del intestino se contraigan y se relajen a fin de que haya un adecuado tránsito intestinal y de esta manera se favorezca la absorción de nutrientes (80).

7.5 *Kluyveromyces marxianus* coloniza intestino delgado en ratones CD- 1

Una vez realizado el raspado de los intestinos de ratones que fueron inoculados con *K. marxianus* y sembrarse en medio de cultivo YPD con antibiótico, se observó la presencia de levaduras al realizar la tinción de Gram, esto indica que la levadura es capaz de colonizar intestino delgado; esto coincide con estudios anteriores donde se mostraba que *K. marxianus* coloniza intestino delgado hasta por 72 h después de su inoculación e incluso su presencia se puede observar en heces, la adhesión de las células en la mucosa y en el tejido es un proceso realmente complejo el cual implica el contacto de las células con la superficie del tejido; esto puede verse afectado por la estructura y por la composición de las células que se encuentran en el tejido y que interactúan con el medio, la capacidad que tengan las levaduras para adherirse a la mucosa y tejido intestinal es una característica muy importante para ser considerado un microorganismo probiótico. Boris *et al.* y Del Re *et al.* (81,82) aseguran que la capacidad de agregación de algunas especies de levaduras depende en gran medida de las propiedades de adhesión que presenten las células, es importante mencionar que son pocos los trabajos realizados respecto a la adhesión de células en la mucosa de intestinos que han

sido extraídos, sin embargo, Collado (83) reportó que existe adhesión de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus*, siguiendo el mismo procedimiento que se empleó en este estudio, con la diferencia que el medio de cultivo empleado fue MRS el cual es un medio específico para el crecimiento de lactobacilos y en este estudio se utilizó medio de cultivo YPD para levaduras. Aún así los resultados en el presente estudio muestran que las levaduras se adhieren al tejido intestinal y permanecen viables hasta por 72 horas, de igual manera los cortes histológicos de intestino delgado de los grupos inoculados con *K. marxianus* muestran la presencia de la levadura comprobando la adherencia a células epiteliales en tejido gastrointestinal de ratones.

7.6 Cambios histológicos en el intestino delgado ocasionados por el consumo de lactosa

Al analizar las muestras histológicas de los grupos tratados se observó que tanto el grupo control que fue inocuado con solución fisiológica y el grupo inoculado con *K. marxianus* no mostraron cambios morfológicos aparentes a nivel de intestino delgado, se pudieron observar criptas intestinales de tamaño normal, las células mostraban evidencia de borde en cepillo y no hubo presencia de vacuolización o linfocitos que señalaran algún proceso inflamatorio en el tejido; por el contrario tanto en grupo inoculado con lactosa como en el inoculado con lactosa + *K. marxianus* se observaron células con vacuolas de tamaño variable y sin evidencia de borde en cepillo, aunado a esto también se observaron grandes espacios intravellosos irregulares, aumento en el tamaño de las criptas intestinales y presencia de linfocitos denotando un proceso inflamatorio, de igual manera muchas de las células se observaron sin nucleo indicando un proceso de lisis celular; Lo anterior indica que el consumo de lactosa causa diversas modificaciones histopatológicas en el intestino de ratones CD-1, esto coincide con lo señalado por Bueno y colaboradores (84) quienes evaluaron el daño histopatológico en el intestino delgado de ratas que después de ser destetadas fueron sometidas a consumo de lactosa por lo cual presentaban diarrea crónica, en las muestras histológicas observaron un aumento en las criptas intestinales así como una gran cantidad de vacuolas en las vellosidades intestinales, de igual manera observaron linfocitos intraepiteliales señalando un proceso inflamatorio. Diversos estudios señalan que un mayor número de linfocitos intraepiteliales se asocia con enfermedades como intolerancia a la

lactosa, enfermedad celiaca, diarrea aguda entre otras enfermedades intestinales, lo anterior como consecuencia a un aumento de macromoléculas (85-87).

La evidencia histológica mostró que el consumo de lactosa causó diversos cambios y lesiones en el intestino delgado, Zarling y Mobarhan (88) demostraron que en ratas destetadas restringidas con dieta severa hay una pérdida de proteínas mucosas causada en parte por el tamaño y la capacidad de absorción de las células intestinales las cuales se ven afectadas por el consumo de lactosa, por su parte Shiner y colaboradores (89) señalan que los bebés de menos de 3 meses afectados por diarrea crónica presentan una atrofia total o subtotal de las vellosidades intestinales en todos los especímenes analizados en su estudio. Estos autores también han informado, que la disminución y longitud de la cripta intestinal así como el grosor de la mucosa son características que se ven modificadas en un proceso de diarrea osmótica y que la adhesión de bacterias a las células intestinales puede contribuir a los cambios estructurales, sin embargo en el presente estudio no se pudo identificar la presencia de bacterias que pudieran contribuir a los cambios anteriormente mencionados.

Tanto el modelo experimental de Bueno y colaboradores como el descrito en el presente estudio, imitan los cambios histológicos que se encuentran en los casos humanos de diarrea osmótica aguda, puesto que el consumo de lactosa ocasionó una pérdida en la capacidad de absorción de las células pues al no poder degradar la lactosa comenzaron a manifestar cambios estructurales significativos.

VIII CONCLUSIONES

- *K. marxianus* utiliza la lactosa como sustrato para su crecimiento y metabolismo mediante la estandarización del crecimiento en medio mínimo lactosado.
- *K. marxianus* presenta la enzima β -galactosidasa encargada de la hidrólisis de lactosa.
- En un modelo murino de intolerancia a la lactosa, se observó que *Kluyveromyces marxianus* disminuye el peso y la consistencia de heces diarreicas inducidas por la ingesta de lactosa, de igual manera revierte la reducción de motilidad intestinal ocasionada por el consumo de lactosa.
- El estudio histopatológico muestra el daño intestinal ocasionado por el consumo de lactosa en el modelo *in vivo*, observando vacuolización, presencia de granulomas y linfocitos así como células sin evidencia de borde en cepillo.
- *K. marxianus* se adhiere a células epiteliales del intestino gastrointestinal en un modelo murino colonizando intestino delgado hasta por un periodo de 72 horas y observándose su presencia en cortes histológicos.
- *K. marxianus* representa una alternativa en el tratamiento de intolerancia a la lactosa debido a su actividad β -galactosidasa, a su capacidad para degradar la lactosa y estimular la motilidad intestinal así como para reducir la diarrea osmótica provocada por el consumo de lactosa.

IX PERSPECTIVAS

Sin duda alguna la intolerancia a la lactosa es un problema real que aqueja a gran parte de la población mundial, siendo México uno de los países con mayor incidencia. Se requieren de soluciones viables que permitan tratar este trastorno con resultados a corto plazo, de igual manera se requiere de más estudios que demuestren el efecto de los microorganismos probióticos en la intolerancia a la lactosa.

Referente al presente estudio, pruebas a nivel molecular para conocer a fondo las características de la enzima β -galactosidasa presente en *Kluyveromyces marxianus* serían fundamentales para comprender el mecanismo mediante el cual hidroliza la lactosa, de igual manera plantear un método eficaz de extracción de la enzima para poder utilizarla en estudios posteriores.

En el modelo de intolerancia a la lactosa establecido en esta investigación en un futuro podrían evaluarse otros parámetros como glucosa en sangre, ingesta de alimento por día y actividad β -galactosidasa mediante la utilización de galactosil-xilosa en ratones CD-1, lo anterior para tener un modelo de intolerancia a la lactosa que se asemeje aun más a lo que ocurre en los pacientes que presentan dicho trastorno y de esta manera tener un modelo completo que nos permita conocer a detalle la fisiopatología de la intolerancia a la lactosa. Estudios que evalúen el papel de *kluyveromyces marxianus* en el sistema inmune así como su mecanismo de acción serán necesarios para evaluar su efecto al ser administrados en pacientes intolerantes a la lactosa.

X BIBLIOGRAFÍA

1. Izquierdo ELO, Aguado IC, García FJP. Situación actual de la intolerancia a la lactosa en la infancia. 2011;XIII:271–8.
2. Gil AH. Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Madrid: Editorial Medica Panamericana.; 2010.
3. Seguí AT, Hidalgo SS. Intolerancia a la Lactosa. Enfermería Integr Rev científica. 2011;21–3.
4. Rodríguez Martínez D, Pérez Méndez LF. Intolerancia a la lactosa. Rev Española Enfermedades Dig. 2006;98(2):143.
5. Cabré Gelada E. Nutrición y enfermedad inflamatoria intestinal. Nutr Hosp. 2007;65–73.
6. Ritchie ML. A Meta-Analysis of Probiotic Efficacy for Gastrointestinal Diseases. PLoS One [Internet]. 2012;7(4):e34938. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034938>
7. Vonk RJ, Reckman GA. Probiotics and lactose intolerance. Probiotics. 2012;149–60.
8. Anderson RK, Calvo J, Payne GC, Serrano G. A Study of the Nutritional Status and Food Habits of Otomi Indians in the Mezquital Valley of Mexico. Am J Public Health. 1946;36(8):883–903.
9. Fonseca GG, Heinzle E. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. J Appl Microbiol Biotechnol. 2008;79(3):339–54.
10. Olvera RL. Evaluación e identificación de la especie *Kluyveromyces marxianus* como organismo probiótico del pulque de la región de Santiago Tlapacoya, Hidalgo, México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2014.
11. Mendoza GA. Caracterización de la levadura *kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2013.
12. Schönfeldt HC, Hall NG. The need for country specific composition data on milk. Food Res Int. 2012;207–9.
13. Park KH, Lund DB. Calorimetric study of thermal denaturation of β -lactoglobulin, J. Dairy Sci, 1984; 67:1699-1706.
14. Mahoney RR, Adamchuk C. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Sci. 1980;45:962-968.
15. Guy EJ, Bingham EW. Properties of β -galactosidases of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. J. Dairy Sci. 1978; 61: 147-151.
16. García-Garibay M, Gómez.-Ruíz L. Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos, Rev. Invest. Clin. 1996; 48(supl):51-61.
17. Byeong S, Mahoney R. Purification and thermostability of β -galactosidase from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius* subsp.thermophilus. J. Dairy Res. ., 1989;56:117-127.
18. Greenberg NA, Mahoney RR. The activity of lactase *Streptococcus thermophilus* in milk and whey, Food Chem. 1984;15(4):307-313.
19. Jackson EH, Jelen P. Comparison of acid and neutral lactases for batch hydrolysis of lactose in whey, Milchwissenschaft 1989; 44 (9): 544-546.
20. Durá Travé T. Ingesta de leche y derivados lácteos en la población universitaria. Nutr

- Hosp. 2008;23(2):89–94.
21. Arroyo Villarino M, Alcedo González J. Intolerancia a la lactosa: diagnóstico y tratamiento. *La Med hoy*. 2004;46–50.
 22. ADILAC- La intolerancia [Internet]. 2015. Available from: <http://www.lactosa.org/saber.html>
 23. Holmes S. Lactose intolerance. *Prim Heal Care* [Internet]. 2006;16(1):41–50. Available from: <http://rcnpublishing.com/doi/abs/10.7748/phc2006.02.16.1.41.c595>
 24. Baños RM, Salama HB, Morán SS, Gallardo FS, Albaladejo AM, Mercader JM. Malabsorción de lactosa en pacientes con enfermedad inflamatoria activa: ¿está justificado excluir los productos lácteos a todos los pacientes? *An Med interna*. 2004;212–4.
 25. Usme P, Álvarez DM. Microencapsulación De La Lactasa Como Estrategia Para Mejorar La Estabilidad Y La Aplicación En La Industria De Alimentos. 2013.
 26. Messia MC, Candigliota T, Marconi E. Assesment of quality and technological charaterization of lactose-hydrolyzed milk. *Food Chem*. 2007; 910–7.
 27. Mennickent S, Green K. Los probióticos y su actividad terapéutica. *Cienc ahora*. 2009;24(12):31–8.
 28. Mcfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics:Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *BMJ*. 1999; 318(7189):999-1003.
 29. Vandenberg P. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev*. 1993; 12:221-228.
 30. Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O’Keane CJ, Castagliuolo I, Lamont JT. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*. 1993;104(4):1108-1115.
 31. Flynn S, Van Sinderen D, Thornton GM, Holo H, Nes IF, Collins JK. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology*. 2002; 148:(Pt. 4):973–984.
 32. Singhi SC, Baranwal A. Probiotic use in the critically ill. *Indian J Pediatr*. 2008; 75(6):621-627.
 33. Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, Moretti M, Vilarini I, Scassellati-Sforzolini R, Rowland I. *Lactobacillus*- and *bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer*. 1996; 26(3):365-80.
 34. Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(42):6453-6457.
 35. Goldin BR, Gorbach SL. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 1984; 39:756-761.
 36. Sengupta S, Muir JG, Gibson PR. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21:209-218.
 37. Wong CS, Sengupta S, Tjandra JJ, Gibson PR. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenesis events in rats. *Dis Colon Rectum*. 2005; 48: 549-559.
 38. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53(1):1-4.
 39. Martin FP, Wang Y, Sprenger N. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-

- host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol.* 2008; 4(157):1-15.
40. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15(2):300-310.
 41. Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, Mykkänen H, Salminen S, Maunula L, Isolauri E. Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: A randomized study. *Pediatrics.* 1999;104(5):(1-4).
 42. Nagendra P. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J.* 2007;17(17):1262–77.
 43. Simmering M, Blaut M. Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels? *J Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;55:19–28.
 44. Domínguez-Bello MG, Blaser MJ. Do you have a probiotic in your future? *Microbes Infect.* 2008;10(9):1072–6.
 45. Hilton E, Rindos P. *Lactobacillus GG* Vaginal suppositories and vaginitis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1433.
 46. Saenz Y, Collado M. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española.* 2003;61(9):476–82.
 47. Lemus-Fuentes E. Los Enemas prehispánico como instrumentos para aplicar probióticos. *Temas Ciencias y Tecnol.* 2006;10:17–22.
 48. Corcuera S. El fraile, el indio y el pulque. México: Fondo de cultura económica; 1991. 210 p.
 49. García-Herrera EJ, Méndez-Gallegos SJ, Talavera-Magaña D. El genero *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Rev Salud Pública y Nutr Edición Espec.* 2010;5(73):109–29
 50. Backstrand JR, Allen L, Black AK, De Mata M. Diet and iron status of nonpregnant women in rural Central Mexico. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(156-164).
 51. Marvan LL, Palacios GB. Bebidas alcohólicas. México: Sistema mexicano de equivalentes; 2001. 71 p.
 52. Massieu GH, Guzman RO. Determination of some essential amino acids in several uncooked Mexican Foodstuffs. *J Nutr.* 1948;38:297.
 53. Steinkraus KH. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control.* 1997;8:311–7.
 54. Bolivar F, Escalante A, Gosset G, López Murguía A. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA análisis. *Fed Eur Microbiol Soc.* 2004;235:274–9.
 55. Li J, Zhang W, Wang C, Yu Q. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb / c mice. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;1499–506.
 56. He w, Lu B, Huang C. Lactase and its gene regulation in BALB/c mice at different ages. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005;36:516–51.
 57. Bansal S, Oberoi HS, Dhillon GS, Patil RT. Production of galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. *Indian J Microbiol.* 2008;48(3):337–41.
 58. Reed G, Nagodawithan T. *Yeast Technology.* 2 a. New York; 1991.
 59. Arciniega AL, González R F, Merchant JA. Tinción simple, tinción de Gram y Tinción de Ziehl-Neelsen. In: Ortigoza FJ, Ruiloba L, editor. *Microbiología práctica.*

- Tercera ed. México: Instituto Politécnico Nacional; 2003. p. 35–47.
60. Thoma KC, Hynes SH, Hingledew MW. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Environmental Microbiology*. 2002; 68(4): 1616-1623.
 61. Al- jazairi M, Abou-ghorra S, Bakri Y, Mustafa M. Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Food, Int*. 2015;22(4):1361–7.
 62. Aguirre A, Poutou R. Obtención de un biopreparado a partir de cepas nativas de levaduras para ser empleado como probiótico: Pontificia universidad Javeriana; 2003.
 63. Izquierdo MT, Martínez de Yuso A, Rubio B, Pino R. Conversion of almond shell to activated carbons: Methodical study of the chemical activation based on a experimental design and relationship with their characteristics. *Biomass & Bioenergy* 2011; 35:1235-1244.
 64. De Champs C, Maroncle N, Balestrino D, Rich C, Forestier C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(3):1270-3.
 65. Verdín-Terán SL, Moreno FL, Rojo BN, García AL, Omaña MM, Meneses A, Nieto O. *Histología e inmunohistoquímica, manual de métodos*. Universidad Nacional autónoma de México. Primera edición. 2013; 1-27.
 66. Cervantes-Contreras M, Pedroza-Rodríguez A. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-Instituto Politécnico Nacional*. 2007: 134-147.
 67. Escalante A, Rodríguez ME, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 2004; 235(2):273-9.
 68. Abundis VB. *Monografía de Agave Pulquero*. Secretaría de Desarrollo Social del Estado de Puebla. 2007; 1 (23):17-19.
 69. Araujo K, Páez G, Mármol Z, Ferrer J, Ramones E. Effect of lactose concentration on the grow kinetics of *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* and production of β -D-galactosidase. *Rev Téc Ing Univ Zulia*. 2007;30(1):64–73.
 70. Roostita R, Fleet GH. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*. 1993; 1(1-3):205-19.
 71. Mahoney RR. Number and nature of the sulphydryl groups of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Biochem*. 1980; 4:189-199.
 72. Sebastio G, Villa M, Sartorio R, Guzzetta V, Poggi V, Auricchio S. Control of Lactase in Human Adult-type Hypolactasia and in Weaning Rabbits and Rats. *Am J Hum Genet*. 1989;45:489–97.
 73. Dellán G, Carías D, Cioccia AM, González E, Hevia P. La diarrea inducida con lactosa estimula la condición oxidativa y es más severa en ratas deficientes en vitamina E. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2005; 55(1): 34-41.
 74. Arciniegas EL, Cioccia AM, Hevia P. Efecto de la diarrea inducida con lactosa sobre la disponibilidad de los macronutrientes y la función inmune en ratas nutridas y desnutridas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2000; 50(1): 48-54.

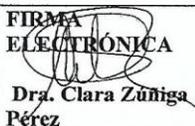
75. Díaz Mora JJ, Madera M, Pérez Y, García M, León K, Torres EM. Generalidades en diarrea aguda. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría. 2009; 72(4): 139-145.
76. Ann C, Grandjean ED, Kristin J, Reimers MS, Maxime RD, Buyckx M. Hydration: Issues for the 21st Century. Nutrition Reviews. 2003; 61(8): 261-271.
77. Reyes Esparza JA, Rodríguez FL. The probiotics : How a mixture of microorganisms do a great job ? Rev Mex ciencias Farm. 2011;7-17.
78. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut.2004; 53(1):1-4.
79. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology.2002; 122(1):44-54.
80. Romero-trujillo JO, Frank-márquez DN, Cervantes-bustamante R, Cadena-león JF, Montijo-barrios DE, Zárate-mondragón DF, et al. Artículo de revisión Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. Acta Pediatr Mex. 2012;33(4):207-14.
81. Boris S, Jiménez-Díaz R, Caso JL, Barbés C. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. Journal of Applied Microbiology. 2001; 91: 328-33.
82. Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology. 2000; 31(6):438-42.
83. Collado MC, Hernandez M, Sanz Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. Journal of Food Protection. 2005; 68(5):1034-40.
84. Bueno J, Almendros A, Carmona R, Nuñez MC, Ríos A, Gil A. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. Histological and ultrastructural changes. Gut. 1994; 35: 926-936.
85. Penna FJ, Hill ID, Kingston D, Robertson K, Slavin G, Shiner M. Jejunal mucosal morphometry in children with and without gut symptoms and in normal adults. J Clin Pathol 1981; 34: 386-92.
86. Shiner M, Ballard J, Brook CGD, Herman S. Intestinal biopsy in the diagnosis of cow's milk protein intolerance without acute symptoms. Lancet 1975; ii: 1060-3.
87. Zaitoun A, Record CO. Morphometric studies in duodenal biopsied form patients with coeliac disease: the effect of the steroid fluticasone propionate. Aliment Pharmacol Therap 1991; 5: 151-60.
88. Zarling EJ, Mobarhan S. Effect of restricting a balanced diet on rat intestinal disaccharidase activity and intestinal architecture. J Lab Clin Med 1987; 109: 556-9.
89. Shiner M, Ballard J, Brook CGD, Herman S. Intestinal biopsy in the diagnosis of cow's milk protein intolerance without acute symptoms. Lancet 1975; ii: 1060-3.

XI ANEXOS

11.1 Formato de revisión de protocolo CIECUAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO CIECUAL

| FORMATO DE REVISIÓN | | | | |
|---|----------------------|--|--------------------|---|
| INSTITUCIÓN (Subdirección, Departamento o área de trabajo): UAEH Área Académica de Medicina. | | FECHA SOLICITUD: 10-Agosto-2016 | | |
| PROYECTO: "Efecto de la presencia de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en ratones con síntomas de intolerancia a la lactosa | | Responsable del Proyecto: Laura Berenice Olvera Rosales Dr. Marco Antonio Becerril Flores | | |
| ASPECTOS A EVALUAR: | RESULTADO | | | |
| | ACEPTABLE | NO ACEPTABLE | SUGERENCIAS | |
| JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO | + | | | |
| BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL | + | | | |
| PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL | + | | | |
| ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO | + | | | |
| PUNTO FINAL Y EUTANASIA | + | | | |
| OBSERVACIONES GENERALES: En material y métodos: Menciona que se suministrará alimento marca TEKLAD 18% proteína; Hay que advertir que el alimento que proporciona el Bioterio es LAB CHOW 5008 DE PURINA Se sugiere pasar al Bioterio, solicitar y revisar la información técnica de este para que no vaya a afectar a este experimento. En la sección del punto final se sugiere consultar: "GUIA PARA EL PUNTO FINAL HUMANITARIO EN LA EXPERIMENTACION ANIMAL PARA INVESTIGACION BIOMEDICA: ASPECTOS ETICOS, LEGALES Y PRACTICOS " Y replantear este punto ". Se adjunta liga de consulta http://secal.es/wp-content/uploads/2014/11/Punto-final.pdf.pdf . | | | | |
| FECHA DE REVISIÓN: | RESULTADO | SI | NO | OBSERVACIONES |
| 31 agosto de 2016 | Aprobado | X | | Revisar las sugerencias |
| | Negado | | | |
| | Propuesta de Cambios | | | |
| Dr. Héctor Antonio Ponce Monter (20/09/16) Presidente del CIECUAL | | | | FIRMA ELECTRÓNICA  Dra. Clara Zúñiga Pérez |

11.2 Certificado de análisis ONPG

23/2/2017

Certificate Of Analysis

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

| | |
|--------------------------|--|
| Product Name | 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside, $\geq 98\%$ (enzymatic) |
| Product Number | N1127 |
| Product Brand | SIGMA |
| CAS Number | <u>369-07-3</u> |
| Molecular Formula | $C_{12}H_{15}NO_8$ |
| Molecular Weight | 301.25 |
| Storage Temp | $-20^{\circ}C$ |

TEST

SPECIFICATION

LOT BCBR0465V RESULTS

PDF

[Click here](#): Certificate of Analysis and Specifications only available in PDF format



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

11.3 Carta de uso final de ONPG

CARTA DE USO

Por medio de la presente yo Laura Berenice Olvera Rosales teniendo facultad suficiente y en representación del instituto de ciencias de la salud perteneciente a la universidad autónoma del estado de Hidalgo , y en ejercicio de mis funciones como: representante del proyecto de modelo de intolerancia a la lactosa en este acto declaro bajo protesta de decir verdad que reconozco y acepto que Sigma-Aldrich Química S. de R.L. de C.V. (en lo sucesivo SIGMA-ALDRICH) como una empresa comprometida con la salud humana, animal y ambiental ha proporcionado de manera amplia y suficiente las instrucciones e indicaciones de utilización de los productos adquiridos a través de sus diferentes medios autorizados como lo son su página de internet www.sigmaaldrich.com, etiquetado, literatura, catálogo de productos, lo anterior en apego a la regulación en materia vigente, por lo que en caso de que se realice un uso fuera de dicho alcance u omitir las indicaciones, términos y condiciones de uso, deslindo de toda responsabilidad en este acto a Sigma-Aldrich, a sus funcionarios, gerentes, y colaboradores, manifestando por mi propio derecho y en nombre de mi representada asumir la obligación de sacar en paz y a salvo a Sigma-Aldrich, y en su caso, a indemnizar a SIGMA-ALDRICH por solicitudes, reclamaciones, quejas, o litigios, que surjan con motivo del uso inadecuado del producto.

Acepto y reconozco en nombre de mí representada la facultad de Sigma-Aldrich para reservarse el derecho de venta de producto en caso de no cumplimentar los requisitos para adquirir el producto conforme a lo establecido en la legislación en materia vigente y en las políticas de Sigma-Aldrich, o que se detecte el uso indebido y/o no autorizado.

Al mismo tiempo declaro que en cumplimiento fiel y total conforme a la legislación en materia vigente, estos productos no serán utilizados en la síntesis o producción de precursores químicos, estupefacientes y/o psicotrópicos. Lo anterior se manifiesta para todos los efectos legales a que haya lugar.

Asimismo manifiesto que los datos en esta Carta de Uso vertidos son veraces y que el producto con número de catálogo (sin indicar presentación): 369-07-3 cuya descripción es: ONPG (2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside) sustrato colorimétrico para β -galactosidasa que será adquirido a la empresa Sigma-Aldrich será usado para lo que a continuación se indica:

Se realizará un ensayo enzimático en un modelo de intolerancia a la lactosa en ratones CD-1, después de un lapso de 20 días donde los ratones han estado en experimentación distribuidos en 4 grupos e inoculados vía oral con 200 μ L de lactosa éstos serán sacrificados en una cámara de CO₂, posteriormente se extraerá 10 cm de intestino delgado; A las muestras de intestino se le añadirá diez veces el volumen de Hielo frío y se homogeneizarán. Los restos de células y el tejido se centrifugarán a 3.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizará para la determinación de la actividad de β -galactosidasa a través de 2-o-nitrofenil β -D-galactopiranosido como sustrato a 37 ° C en fosfato tampón a pH 7,0. Una unidad de actividad β -galactosidasa se definirá como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 mol de ONPG por minuto a las condiciones dadas (Li *et al*, 2012).

Li J, Zhang W, Wang C, Yu Q. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb / c mice. 2012; 1499–506.

INFORMACIÓN DEL USUARIO FINAL:

Nombre de la empresa o Institución, así como el Departamento o Área usuaria de los productos solicitados:
Universidad autónoma del estado de Hidalgo, Instituto de ciencias de la salud, laboratorio anexo a histología.

Marque que tipo de institución o empresa es:

- (X) Escuela, Universidad o Centro de Investigación
() Laboratorio de Diagnóstico clínico

- Laboratorio de Análisis de alimentos
- Laboratorio de Análisis ambientales
- Industria Farmacéutica
- Industria Alimenticia
- Ninguna de las anteriores. Especifique el giro: _____

EL PRODUCTO ADQUIRIDO SERÁ USADO COMO:

- 1) Reactivo de laboratorio o para investigación:** **SI (X)**
NO ()

En caso afirmativo, marque alguna de las siguientes opciones:

- Tesis. Indique el nombre: Efecto de *Kluyveromyces marxianus* en ratones con síntomas de intolerancia a la lactosa
- Docencia. Indique el nombre: _____
- Proyecto de Investigación. Indique el número y nombre: _____
- Para análisis de control de calidad.
- Como estándar de referencia.
- Para el desarrollo de nuevos productos pendientes de ser aprobados por alguna dependencia de gobierno para su uso o consumo humano o animal, que aún no están en proceso de comercialización.
- Como parte de un medio de cultivo celular cuyas células se desecharán al final de la investigación.
- Síntesis orgánica; Indique el producto final: _____
- Otro uso. Especifique: _____

- ¿En esta investigación el producto adquirido a Sigma-Aldrich será utilizado directamente en animales?** **SI (X)**
NO ()

(En caso de ser afirmativa su respuesta favor de contestar alguna de las opciones de la **sección 4**)

- ¿En esta investigación el producto adquirido a Sigma-Aldrich será utilizado en humanos o tejidos de estos?** **SI ()**
NO ()

(En caso de ser afirmativa su respuesta favor de contestar alguna de las opciones de la **sección 2**)

- 2) Aplicación directa, diagnóstico o consumo humano:** **SI ()**
NO ()

En caso afirmativo, marque alguna de las siguientes opciones:

- Directamente en **humanos** o para consumo de éstos. Especifique el uso (indicando si es mezclado con otras sustancias y modo de empleo):

- Tejidos, muestras, células (sangre, orina, etc.) **de humanos**
- Como parte de un medio de cultivo celular cuyas células serán trasplantadas a humanos. Especifique:

- Estándar de referencia para diagnóstico clínico.
- Materia prima para la preparación de agentes de diagnóstico clínico.
- Reactivo o agente de diagnóstico clínico listo para usarse en pruebas de rutina.
 Especifique el diagnóstico que llevaría a cabo: _____
- En plantas, frutos o semillas para consumo humano. Especifique: _____
- Otro. Especifique _____

- 3) Forma parte del proceso de fabricación de algún producto para consumo humano:** **SI ()**
NO ()

En caso afirmativo, marque alguna de las siguientes opciones:

- () Es un ingrediente de algún alimento o bebida. Especifique: _____
- () Se emplea como materia prima o aditivo (ejemplo: vehículo, conservador, estabilizador etc. del producto terminado) para la elaboración de medicamentos o fármacos.
Especifique: _____
- () Cosmético. Especifique: _____
- () Síntesis orgánica. Indique el producto final: _____
- () Otro. Especifique _____

4) Aplicación **directa, diagnóstico o consumo en animales:** **SI**
 (X) **NO** **()**

En caso afirmativo, marque alguna de las siguientes opciones:

- () Directamente en animales (incluidos los de laboratorio) o para consumo de éstos. Indique la especie: _____
- (X)** Tejidos, muestras, células (sangre, orina, etc.) **de animales.**
- () Materia prima de alimento.
- () Ingrediente activo con acción terapéutica o medicamentosa para elaborar medicamento para uso veterinario.
Indique el número de registro y nombre del medicamento a comercializar:

- () Excipiente, estabilizador o conservador de medicamento para uso veterinario.
- () Materias primas para elaborar agentes de diagnóstico de enfermedades de animales.
- () Estándar de referencia para diagnóstico clínico.
- () Reactivo o agente de diagnóstico listo para usarse en el pruebas de rutina.
Especifique el nombre del Diagnóstico: _____
- () Otro. Especifique _____

5) **Cualquier otro uso no indicado en las secciones anteriores.** **SI** **()**
NO **()**

Especifique: _____

Siendo los 13 días del mes de febrero de 2017 en la Ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo, México se emite 1 ejemplar en firma autógrafa de este texto.
Protesto lo necesario.

ATENTAMENTE

Biol. Laura Berenice Olvera Rosales

Departamento: Laboratorio anexo a histología

Institución o empresa: Universidad autónoma del estado de Hidalgo, instituto de ciencias de la salud

Domicilio para recibir notificaciones: Avenida del abeto #301 colonia villas del álamo, mineral de la reforma, Hidalgo.

Teléfono: 7712145905

E-mail: lauolver@gmail.com