

**Centro e Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**EFECTO ANTIPOBESOGÉNICO ASOCIADO AL
CONSUMO DE LECHE FERMENTADAS CON
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS**

Por:

OLGA LIDIA RAMÍREZ VALDEZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Olga Lidia Ramírez Valdez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestra en ciencias



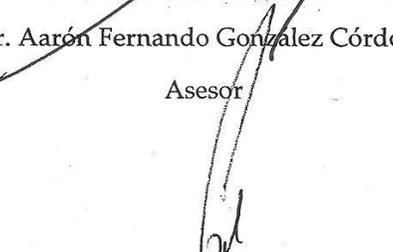
Dra. Belinda Vallejo Galland

Directora de Tesis



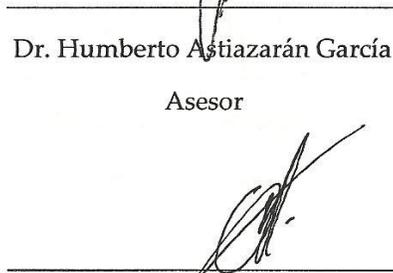
Dr. Aarón Fernando González Córdova

Asesor



Dr. Humberto Astiazarán García

Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Directos General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT el apoyo dado durante estos dos años de una experiencia inolvidable en el posgrado y poder culminar uno de más de mis objetivos en mi vida.

De la misma forma, se agradece el apoyo a CIAD, a su personal docente y administrativo que de una u otra forma siempre fueron y serán parte de mi formación.

Agradezco a la comunidad de lácteos especialmente a la Dra. Belinda Vallejo que me abrió sus puertas y me confió un excelente proyecto, por su ayuda incondicional y por ser una gran mami asesora de su servidora. Así como también agradezco al Dr. Aarón González por todo su apoyo y siempre estar al pendiente de cada uno de nosotros durante nuestra estancia. Al Dr. Adrián Hernández Mendoza por todo su apoyo, consejos y hasta regaños en cada paso que daba en este caminar. Al Dr. Humberto por su ayuda incondicional y recomendaciones dadas durante este proyecto.

De la misma forma agradezco el apoyo, consejos y regaños a Ricardo Reyes Díaz por todo su ayuda en la redacción, análisis estadístico y culminación de este trabajo, sobre todo por ser un excelente compañero y amigo.

Como olvidar toda la colaboración brindada por Yizette Aguilar, pasar horas y horas de lunes a domingo cuidando a nuestros niños roedores, mil gracias Yizette!!.

También agradezco el apoyo y amistad a mis compañeros de generación de Lácteos especialmente a Lourdes Santiago López por todo tu apoyo y compartir

conmigo esta experiencia, a la señorina Aline Reyes que siempre ha estado apoyándome y dándome animo día a día. A mi corazona Samantha Loiza Anaya por todo tu apoyo y sobre todo por tu amistad a Lilia María Beltrán Barrientos y Trinidad López Armenta.

Doy las gracias por todas sus atenciones y apoyo a Gerardo Reyna y Rafaela Gil Lamadrid Barrón (Faly).

Así mismos, agradezco a mis buenos amigos, por su apoyo, compañía, buenos consejos y por siempre darme palabras de aliento cuando más las necesitaba, gracias a Aracely Molina, Leonel Arce, José Luis Córdoba y familia, Fernanda Morales, Alberto Campos, Lilian Quiroz, Nancy Rivera, Karina Ortiz y familia, Fernanda Villa y Daniela Abril.

A mi familia, a mi madre Ernestina Valdez Meraz, mis hermanos Delia, Fabiola, Javier y Remigio Ramírez, a mi segunda familia primo casi mi padre Jesús Ramón Ramírez y a su esposa Verónica Ramírez, Alejandra y Jesús Ramón Ramírez (Jr.) y a mis bebés Héctor Alejandro y Melanie. Gracias por siempre apoyarme en todas mis decisiones.

Un agradecimiento muy especial para Francisco Ruíz, por la paciencia, comprensión y el ánimo brindado durante todo este tiempo, que amorosamente e incondicionalmente me apoyó.

Gracias!

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor a la persona que me dio la vida y me vio crecer, a mis cómplices de tantas travesuras y a esa personita que sin duda alguna es el motor más importante de mí presente y futuro, gracias por ser mi sostén en los retos de la vida.

Con todo cariño dedicado a mi madre Ernestina Valdez
Hermanos; Remigio, Delia, Javier y Fabiola Ramírez Valdez
A mi bebé que a pesar de no conocerte sé que eres y serás mi fuente de energía.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Obesidad.....	3
2.2 Enfermedades Crónico-Degenerativas Asociadas a la Obesidad	4
2.3 Hábitos Alimenticios, Estilo de Vida y Obesidad	7
2.3.1 Nuevas Tendencias en la Alimentación para Reducir la Obesidad ...	8
2.4 Prevención y Control de la Obesidad	9
2.5 Relación de la Microbiota con la Obesidad	9
2.6 Productos Fermentados y Componentes Bioactivos Implicados en el Control de Peso.....	14
2.6.1 Proteínas.....	15
2.6.2 Lípidos.....	16
2.6.3 Minerales.....	18
2.7 Cultivos Lácticos Multifuncionales	19
2.7.1 Probióticos.....	20
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Bacterias y Condiciones de Cultivo	25
5.2 Preparación de Leches Fermentadas	26
5.3 Análisis Fisicoquímicos de las Leches Fermentadas.....	27
5.4 Experimento <i>in vivo</i>	27
5.5. Cálculo del Número de Muestra.....	29

CONTENIDO (Continuación)

5.7 Densitometría de Rayos X (DXA)	29
5.8 Dieta para Inducción de Obesidad	31
5.9 Cuantificación de los Niveles séricos de Lípidos, Glucosa, Citocinas (IL-6, TNF-alfa) y Hormonas (insulina y leptina)	32
5.10 Análisis Estadístico	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1 Preparación de Leches Fermentadas	35
6.2 Análisis Composicional de las Leches Fermentadas.....	37
6.3 Experimento <i>in vivo</i>	37
7. CONCLUSIONES	57
8. REFERENCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diferencias en la microbiota intestinal de obesos y no obesos.....	11
Figura 2. Forma de administración de leche fermentada.....	28
Figura 3. Sitio de punción para anestesia intra peritoneal.....	30
Figura 4. Cuenta total en agar MRS de las BAL en las leches fermentadas.....	36
Figura 5. Control positivo y negativo de obesidad.....	40
Figura 6. Ganancia de peso corporal acumulado en las ratas durante las 12 semanas de administración con leches fermentadas por diferentes cepas de BAL	41
Figura 7. Ingesta calórica semanal durante las 12 semanas de administración con leche fermentada por BAL.....	45
Figura 8. Ingesta calórica consumida durante 12 semanas de administración con leche fermentada por BAL.....	46
Figura 9. Ganancia de masa grasa de las ratas en tratamiento.....	47
Figura 10. Niveles séricos de insulina y leptina después de 12 semanas de tratamiento.....	51
Figura 11. Niveles séricos de citocinas TNF-a y IL-6 después de 12 semanas de tratamiento.....	54

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Criterios de diagnósticos del síndrome metabólico propuestos por la Federación Internacional de Diabetes (IDF).....	6
Tabla 2. Probióticos con efecto benéfico en la modulación de peso corporal.....	22
Tabla 3. Cepas de las BAL seleccionadas para el estudio.....	25
Tabla 4. Composición de la dieta hiperlipídica.....	31
Tabla 5. Composición de macronutrientes y micronutrientes presentes en leches fermentadas por BAL.....	38
Tabla 6. Peso del hígado, corazón, riñón, grasa epididimal y perirenal de las ratas.....	48
Tabla 7. Niveles séricos de lípidos y glucosa de las ratas al finalizar el tratamiento.....	50

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica que va en aumento a nivel mundial por lo que se ha convertido en un problema de salud pública. Por ello, se busca incluir en la dieta alimentos que además de nutrir, tengan un efecto antiobesogénico. Estudios han reportado el efecto antiobesogénico asociado a la ingesta de leche fermentada con bacterias ácido lácticas probióticas específicas, sin embargo, dicho efecto es cepa dependiente. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antiobesogénico asociado a la ingesta de leches fermentadas con cepas específicas potencialmente probióticas de *Lactobacillus* en un modelo murino con obesidad inducida. Ratas Sprague Dawley de cuatro a seis semanas de edad, fueron divididas en seis grupos (n=7). Cinco de ellos fueron suministrados aleatoriamente con alguna de las leches fermentadas por cepas de *Lactobacillus* (2, 4, 6, 7 o 17), mientras que el grupo control fue suministrado con leche sin fermentar. Los seis grupos recibieron una dieta hiperlipídica para inducción de obesidad. La ganancia de peso corporal fue evaluada semanalmente durante 12 semanas y la ganancia de masa grasa fue evaluada en la onceava semana. Al finalizar el período de estudio, las ratas fueron sacrificadas y se recolectó sangre para su análisis bioquímico. Los resultados mostraron que los grupos tratados con la leche fermentada por las cepas 4, 6 o 17, presentaron una ganancia en peso significativamente ($p < 0.05$) menor que el grupo control. Por otro lado, los grupos tratados con leche

fermentada por las cepas 2, 4, 6 o 17, presentaron una menor ganancia de masa grasa en comparación al grupo control ($p < 0.05$). Además, los grupos suministrados con las leches fermentadas por las cepas 6, 7 o 17, presentaron contenidos de colesterol total significativamente ($p < 0.05$) menores que el grupo control. Para los niveles séricos de cLDL, todos los grupos tratados con leches fermentadas fueron significativamente ($p < 0.05$) inferiores al grupo control. También se demostró que los niveles séricos de insulina y citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) en todos los grupos tratados con leches fermentadas fueron significativamente ($p < 0.05$) menores que el control. En base a lo anterior, se concluyó que la ingesta diaria de leche fermentada por las cepas 6 o 17 de *Lactobacillus*, presentaron un efecto antiobesogénico, hipocolesterolémico y antiinflamatorio en un modelo murino con obesidad inducida

Palabras clave: antiobesogénico, efecto hipocolesterolémico y antiinflamatorio, leche fermentada, bacterias ácido lácticas.

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease which is increasing and has become a public health problem that is growing worldwide. Therefore, it is important to look for foods that in addition to being nutritious, may have an antiobesogenic effect. Studies have reported the antiobesogenic effect associated to the intake of milk fermented by specific probiotic lactic acid bacteria (LAB). However, this effect is strain-dependent. Hence, the aim of this study was to evaluate the antiobesogenic effect associated to the intake of fermented milk with potentially probiotic specific strains of *Lactobacillus* by using an obesity induced murine model. Sprague Dawley rats, four to six weeks of age, were divided into six groups (n = 7). Five groups were randomly provided with milk fermented by *Lactobacillus* strains (2, 4, 6, 7 or 17), while the control group was administered with unfermented milk. Obesity was induced by providing these six groups with a high fat diet. Body weight gain was evaluated weekly and fat weight gain was determined at the eleven week. After 12 weeks, the rats were sacrificed and blood samples were collected for biochemical analyses. The results showed that groups treated with fermented milk by strains 4, 6 or 17, had a significantly lower weight gain than the control group (p <0.05). Furthermore, groups treated with fermented milk by strains 2, 4, 6 or 17, had lower body fat gain than the control group (p <0.05). Total cholesterol content for groups administered with fermented milk by strains 6, 7 or 17 were significantly (p <0.05) lower than those for the control group. Moreover, cLDL content for all groups treated with fermented milk were significantly (p < 0.05) lower than those for the control group. It was also shown that insulin and pro inflammatory cytokines (TNF- α e IL-6) serum levels in all groups treated with fermented milk were significantly (p < 0.05) lower than those for the control group. Finally, it was concluded that,

in general, the daily consumption of milk fermented by strains of *Lactobacillus* 6 or 17 showed antiobesogenic, hypocholesterolemic and antiinflammatory effects in a murine model with induced obesity

Keywords: antiobesogenic, hypocholesterolemic or antiinflammatory effect, fermented milk, lactic acid bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una patología metabólica que constituye un gran problema de salud pública a nivel mundial. Debido al rápido incremento en su prevalencia en los últimos años, es considerada pandemia. De acuerdo a la OMS (2004) la eliminación de la obesidad ayudaría a disminuir la prevalencia de diabetes tipo 2 (en un 60%), las enfermedades coronarias (en 20%) y accidente vascular encefálico y la prevalencia de hipertensión arterial (hasta en un 30%).

Estudios recientes han demostrado que la obesidad no es sólo resultado de la contribución genética, los hábitos alimentarios o a la falta de actividad física, sino que además, la microbiota intestinal constituye un factor ambiental determinante en el desarrollo de esta patología. Este vínculo estaría relacionado con una modulación, por parte de la microbiota, en la extracción energética de los alimentos, la secreción de hormonas intestinales, el metabolismo a nivel periférico y al tono inflamatorio sistémico. Esta hipótesis nace de la observación de que los pacientes obesos presentan una microbiota intestinal distinta a la de individuos con normo peso (Vijay-Kumar *et al.*, 2010; Farías *et al.*, 2011a).

El mejor tratamiento no quirúrgico para la obesidad frecuentemente corresponde a cambios en el estilo de vida, alimentación saludable y ejercicio, para lograr un óptimo funcionamiento biológico de las reservas energéticas y prevenir un balance energético positivo (Farías *et al.*, 2011b).

Sin embargo, en función de la relación planteada entre la obesidad, el metabolismo y la microbiota intestinal, el uso de estrategias destinadas a modular la composición de la microbiota se ha propuesto como medio alternativo para controlar o reducir el desarrollo de obesidad. La mayoría de los estudios al respecto se basan en la administración de probióticos, que son microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidad adecuada, confieren un efecto benéfico sobre la salud del huésped (FAO/WHO, 2002).

En este sentido, estudios realizados en modelos murino, en los cuales se administró leche fermentada con diferentes cepas probióticas del género *Lactobacillus*, demostraron la reducción en el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo mesentérico y adiposo retroperitoneal. Dichos estudios también han demostrado reducir los niveles de leptina en suero, lo que sugiere un efecto en la regulación del crecimiento del tejido adiposo y posiblemente en la obesidad (Sato *et al.* 2008; Kondo *et al.*, 2010). Estos estudios evidencian la posible influencia de bacterias ácido lácticas probióticas específicas en el control del peso. Sin embargo, aún son necesarios más estudios para confirmar si la obesidad se encuentra asociada o no con si la ingesta de leches fermentadas con bacterias probióticas específicas. Por lo anterior, este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el posible efecto de la ingesta de leche fermentada por cepas específicas con potencialmente probióticas de *Lactobacillus* en el control del peso.

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004) considera la obesidad como una epidemia global que impacta en todos los grupos de edad. La ENSANUT (2012) indica que en México alrededor de mil millones de adultos padecen sobrepeso y 300 millones obesidad, y que a nivel mundial existe 42 millones de menores de 5 años con sobrepeso. Para el siglo XXI se espera que la obesidad sea uno de los principales problemas de salud pública.

En México, la Secretaría de Salud (SSA, 2012), define a la obesidad como una enfermedad sistémica, crónica, progresiva y multifactorial caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa. En su etiología se involucran factores de carácter neuroendócrino, metabólicas, genéticas, ambientales y psicógenas que derivan en alteraciones en el gasto, aporte energético y utilización de la grasa (Secretaría de Salud, 2012).

La obesidad representa un factor de riesgo para algunas enfermedades crónico-degenerativas como dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y enfermedades cerebro vasculares (Bogsan *et al.*, 2011), también se relaciona con el cáncer, asma, apnea

del sueño, osteoartritis, neurodegeneración y problemas en la vesícula biliar (Delzenne *et al.*, 2011).

2.2 Enfermedades Crónico-Degenerativas Asociadas a la Obesidad

El síndrome metabólico o síndrome X, es una condición caracterizada por obesidad, con una elevada circunferencia de cintura, incremento en los niveles séricos de triglicéridos, glicémicos, presión arterial y reducción del colesterol de alta densidad (cHDL) (Ver Cuadro 1) (Kadowaki y Yamauchi, 2005).

La obesidad y la hipertensión arterial (HTA) están asociadas a la disfunción endotelial. Dicha disfunción puede disminuir la secreción de óxido nítrico (NO), un importante vasodilatador endógeno que interviene en la regulación del tono vascular, disminuye la agregación y adhesión de plaqueta se inhibe la proliferación de células musculares lo que significa un factor de riesgo para la circulación en términos de la identificación de los valores normales de la presión arterial (Lye *et al.*, 2009).

Además, la obesidad está caracterizada por un aumento en el tejido adiposo y por ello relacionado con los niveles séricos elevados de colesterol y triglicéridos, que son consideradas causales por ser de carácter firme, gradual, constante e independiente, de otros factores de riesgo. Los niveles de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) presentan una fuerte relación positiva con la incidencia de cardiopatía isquémica, mientras que los de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) muestran una fuerte relación negativa (Palomer *et al.*, 2005).

Por otra parte, la Diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica sistémica degenerativa caracterizada por niveles altos de glucosa en la sangre

(hiperglucemia), debido a una producción insuficiente de insulina, resistencia a la acción de esta hormona en los tejidos periféricos o de ambas situaciones; es caracterizada principalmente por poliuria, polidipsia, polifagia y fatiga (ADA., 2005; Martínez *et al.*, 2011).

Como ya se mencionó, la obesidad es un síndrome etiopatogenia multifactorial caracterizado por un aumento en el tejido adiposo. Este aumento está acompañado por patologías como diabetes e hipertensión, se ha demostrado que la pérdida de peso intencional reduce significativamente estas enfermedades (Katiyar *et al.*, 2011).

Tabla 1. Criterios de diagnósticos del síndrome metabólico propuestos por la Federación Internacional de Diabetes (IDF). Diagnosticado cuando existe obesidad abdominal y dos o más componentes adicionales.

Componentes	Medida	Punto de corte
Obesidad abdominal	Circunferencia de cintura	≥ 90cm en hombres ≥ 80 cm en mujeres
Triglicéridos altos	Triglicéridos	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL bajo	cHDL	< 40mg/dL hombres < 50 mg/dL mujeres
Presión arterial alta	*PA sistólica	≥ 130 mmHg
	PA diastólica	≥ 85mmHg
Alteración en la regulación de la glucemia	Glucemia	≥ 100 mg/dL en ayunas ≥ 140 mg/dL en PTOG** Incluye diabetes

**PTOG: Prueba confirmatoria con carga oral de glucosa; cHDL: colesterol de alta densidad; *PA: presión arterial (Gómez Jiménez *et al.*, 2008)

2.3 Hábitos Alimenticios, Estilo de Vida y Obesidad

En las últimas décadas, los cambios en el estilo de vida han reducido la actividad física y han promovido el aumento de la ingesta de alimentos hipercalóricos. Aunado a esto, otros factores como el uso indiscriminado del automóvil, escaleras eléctricas, control remoto para la televisión, ascensores, entre otros, han llevado al ser humano a una vida sedentaria facilitando con ello el desarrollo de obesidad (Bouchard y Rankinen, 2008; Corsica y Hood, 2011).

Se ha reportado que la disminución de la actividad física, y los hábitos sedentarios en niños y adolescentes, son costumbres que se conservan en la edad adulta siendo esto un riesgo para padecer obesidad y por tanto el desarrollar enfermedades crónicas degenerativas (Amigo-Vázquez *et al.*, 2007). El tratamiento de niños obesos debe ser precoz e individualizado ya que la hipertrofia del tejido subcutáneo y el aumento de grasa visceral son modificables a través de cambios de hábitos como alimentación y la actividad física, esto mejora los parámetros metabólicos con descenso del tamaño de adipocitos y cambios en la expresión genética, descendiendo el estado inflamatorio latente de la obesidad (Lannitti y Palmieri, 2010; Santacruz., 2012).

Las principales causas de enfermedades no transmisibles (enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensión, etc.) están relacionadas con un alto consumo de alimentos hipercalóricos (e.g., alto contenido de grasas y/o azúcares) (Lakdawalla y Philipson, 2002). El genotipo humano se ha ido modificando por la estimulación de los genes de obesidad producido por un medio ambiente obesogénico que facilitan el desarrollo de enfermedades crónicas (Corsica y Hood, 2011).

En casos especiales, se puede recurrir a una terapia farmacológica y/o quirúrgica; estos procedimientos no son aprobados para niños o adolescentes, sólo es usado en pacientes que finalizan la adolescencia y en adultos. Sin embargo, estos tratamientos terapéuticos sólo son utilizadas como último recurso (González *et al.*, 2009). Debido a los inconvenientes en su uso por su alto precio y efectos secundarios que estos pueden ocasionar (esteatorreas, aumento de presión, rebotes, fatiga etc.), se debe recurrir a terapias menos agresivas, pero efectivas en el tratamiento de la obesidad.

2.3.1 Nuevas Tendencias en la Alimentación para Reducir la Obesidad

Debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida y aumentar la longevidad de la población, las personas están más conscientes de la relación existente entre la dieta y la salud. Esto ha dado paso al desarrollo y comercialización de “alimentos funcionales” alimentos que además de aportar nutrientes necesarios para el organismo, ofrecen beneficios a la salud (Granato *et al.*, 2010; Laparra y Sanz, 2010).

Como ejemplo los de estos alimentos se encuentran ricos en fibras dietéticas, que son de gran importancia para la salud, ya que algunas enfermedades como la obesidad han sido relacionadas con un mínimo consumo de fibra. Los mecanismos por los cuales la fibra contribuye al control de peso es por la disminución del aporte calórico de los alimentos y un rápido efecto de saciedad (Barceló-Acosta *et al.*, 2001).

Otros ingredientes o productos con efecto en el control de peso por distintos mecanismos son:

2.4 Prevención y Control de la Obesidad

La mejor forma de prevenir la obesidad es la combinación de ejercicio y una alimentación saludable. En caso necesario el tratamiento farmacológico para el control de peso puede ser utilizado como apoyo. Alternativas para el tratamiento de la obesidad han sido medicamentos como Orlistat y Sibutramina, ambos fármacos tienen efectos secundarios como el incremento de la presión arterial, boca seca, constipación, dolor de cabeza e insomnio por mencionar algunos (Yun, 2010). También están los tratamientos quirúrgicos para la obesidad que requieren de muchos cuidados además de disciplina. Debido a los altos costos, efectos dañinos por reacciones secundarias y que su uso no está aprobado por la Agencia de Administración de Fármacos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) para niños y adolescentes, los medicamentos están siendo reemplazados por productos naturales para el tratamiento de la obesidad. Esto puede ser una buena alternativa para el desarrollo futuro de tratamientos de obesidad de forma segura y efectiva (Mayer *et al.*, 2009).

2.5 Relación de la Microbiota con la Obesidad

Se han evidenciado que los factores exteriores o ambientales están implicados en cambios de la microbiota intestinal favoreciendo el desarrollo de obesidad y enfermedades asociadas, debido a su influencia en las funciones nutricionales, metabólicas e inmunológicas (Sanz *et al.*, 2009). La microbiota que coloniza el intestino humano ejerce funciones que impacta fuertemente la expresión de genes en la mucosa intestinal del huésped (Ley *et al.*, 2006, Morales *et al.*, 2010; Delzenne *et al.*, 2011).

La microbiota intestinal alberga billones de bacterias en el tracto gastrointestinal, las cuales han evolucionado junto con el ser humano, adaptándose y conviviendo estrechamente (Delzenne *et al.*, 2011; François *et al.*, 2011; Marik, 2012).

Por ello, se ha sugerido un posible rol de la microbiota intestinal en las funciones del hígado, cerebro y tejido adiposo; esto vinculado con el desarrollo de obesidad y enfermedades asociadas (Ley *et al.*, 2006; Santacruz *et al.*, 2009; Ley, 2010; Delzenne *et al.*, 2011; Hyang *et al.*, 2011; Marik, 2012). Esta hipótesis nace de la relación observada en personas con obesidad y normo peso, que muestran una microbiota intestinal diferente (Fariás *et al.*, 2011a).

La microbiota intestinal regula en gran medida la inmunidad innata y adaptativa, juega un papel importante en las respuestas locales y sistémicas, por lo que de alguna manera, la alteración de la microbiota puede influir en la inflamación crónica asociada a la obesidad y a otros trastornos metabólicos (Wolowczuk *et al.*, 2008).

Desde hace tiempo han existido evidencias epidemiológicas que vinculan la obesidad y el estado proinflamatorio (Marcos-Gómez *et al.*, 2008). Sin embargo, no se había esclarecido una relación fisiopatológica que demostrara cómo el exceso del tejido adiposo podría provocar inflamación crónica (Andrés *et al.*, 2009).

Por otra parte, estudios en modelo murino axénicos el proceso de colonización aumenta la capacidad del huésped para extraer energía de la dieta y el almacenamiento de grasa en el adipocito. También se ha observado que el aumento de microorganismos favorece la expresión de enzimas clave para la biosíntesis de *novo* de ácidos grasos en el hígado (Bäckhed *et al.*, 2010).

La inoculación de *Bacteroides thetaiotaomicron* (microorganismos Gram negativo común en la microbiota), después de 14 días, indujo la expresión de genes comprometidos en la defensa del organismo y la función intestinal (DiBaise *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que pacientes humanos con obesidad presentan mayor cantidad de *Bacteroidetes* y una menor proporción de *Firmicutes* (Gram positivas) (Figura 19) (Azucona *et al.*, 2009; Ley, 2010).

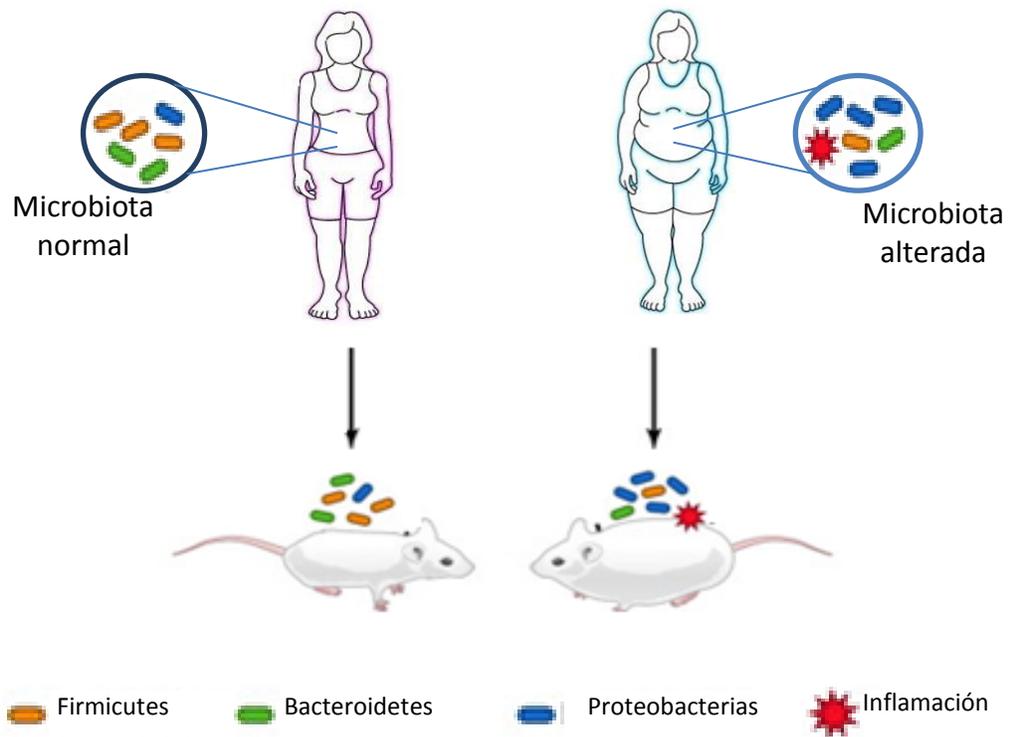


Figura 1. Diferencias en la microbiota intestinal de obesos y no obesos (modificada de Bäckhed *et al.*, 2010).

Por lo anterior, el desbalance de la microbiota en el organismo podría estar relacionado con la extracción de energía de los alimentos, el metabolismo de ácidos grasos y la síntesis de hormonas intestinales que además están involucradas de alguna forma con la homeostasis energética y la regulación del depósito de tejido adiposo (Quigley *et al.*, 2010). Las bacterias fermentan la fibra

dietética y mucina que generan azúcares simples, liberan agua, gases y ácidos grasos de cadena corta, principalmente acetato (60%), propionato (20%) y butirato (20%). Estos ácidos grasos de cadena corta son absorbidos y oxidados, proporcionando energía para los colonocitos (O'Hara *et al.*, 2006; DiBaise *et al.*, 2008; Sanz *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2010).

El acetato puede contribuir a la síntesis de colesterol y lípidos en el hígado por la activación de la acetil-S CoA sintetasa 2 del citosol, mientras que el propionato puede disminuir o inhibir la síntesis de lípidos provenientes del acetato, esto se ha observado en hepatocitos de roedores. Tanto el acetato como el propionato están involucrados en la regulación del metabolismo hepático de glucosa y la respuesta insulínica (Santacruz, 2012). El butirato presenta efectos sobre la mucosa por ser la principal fuente de energía para los enterocitos regulando también el crecimiento celular (Sanz *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2010).

Por otro lado, Cani en el 2009 demostró que la administración de una dieta alta en grasa por 4 semanas, además de alterar la microbiota intestinal por bacterias Gram negativas en ratones, también afecta la función de la barrera intestinal al inhibir la expresión de proteínas que une a las células epiteliales entre sí. Asimismo, el desbalance provoca que los microorganismos consuman H₂ producido en el colon por la fermentación para reducir el CO₂ hacia metano.

La eliminación de H₂ reduce la presión intraluminal de gas, que promueve el crecimiento de las poblaciones bacterianas, lo que hace más eficiente el almacenamiento de grasa (Turnbaugh *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010). Este desbalance es llamado endotoxemia metabólica, que es determinada por aumento en los niveles séricos de lipopolisacáridos (LPS) que se relacionan a

dietas hiperlipídicas y son consideradas como un factor inflamatorio ocasionado por el aumento en el peso corporal (Cani *et al.*, 2007, Cani *et al.*, 2008).

Se ha reportado que los LPS de la membrana celular de las bacterias Gram-negativas y los ácidos grasos saturados de la dieta, pueden actuar como ligando del receptor toll-like 4 (TLR4) y receptor toll-like 2 (TRL2), que tienen la función de estimular la liberación de citocinas inflamatorias endógenas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 β (IL-1 β), tanto en adipocitos como por macrófagos (Ley *et al.*, 2010).

El epitelio intestinal, el sistema inmune y la microbiota intestinal representan un sistema funcional encargado del balance dinámico de la barrera intestinal en el hospedador (Santacruz, 2012). La integridad de la mucosa intestinal obedece a múltiples factores como los fisiológicos, dieta, edad, consumo de antibióticos y sobre todo por la microbiota intestinal alojada. La presencia de antígenos externos y microorganismos patógenos atacan constantemente los sitios activos para la supresión del sistema inmune, también se encarga de proteger el equilibrio inmune del hospedador (Cani *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2011).

Las respuestas locales y sistémicas del sistema inmune innato y adaptativo están en gran medida regulados por la microbiota intestinal, por tanto, también podría influir en la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad y resistencia insulínica. Los receptores de las células del sistema inmune innato, como los receptores Toll-like (TLR), activan la inmunidad como respuesta a estímulos microbianos o derivados de la dieta (proteínas o lípidos) alertando al sistema inmune. Éste activa un ligando, los TLR interactúan con proteínas que activan la transcripción de distintos factores (tales como MAPKs y NF- κ B) y la

síntesis de citocinas y mediadores inmunológicos de la inflamación (Farías *et al.*, 2011a).

Por otra parte, investigaciones han mostrado cómo microorganismos probióticos pueden modular la formación del NF-kB en el duodeno humano tras su consumo. Esto es de particular importancia para el diseño de alimentos fermentados que contengan cepas probióticas con la capacidad de sobrevivir al estrés gástrico y producir células efectoras que ayudan en la interacción de la respuesta inmunitaria innata (Van Baarlen *et al.*, 2008; Hylckama *et al.*, 2011).

2.6 Productos Fermentados y Componentes Bioactivos Implicados en el Control de Peso

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procedimiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos. La fermentación de los alimentos es ampliamente utilizada y en la actualidad existe una gran variedad de alimentos funcionales. La mayoría de los procesos para la fermentación de alimentos han pasado de las prácticas artesanales a la industrial. La industria alimentaria se encuentra en constante búsqueda de desarrollos novedosos para mejorar la aceptación de alimentos y para la obtención de nuevos productos. Los alimentos fermentados y bebidas fermentadas son cada vez más familiares para la población y conocen los impactos positivos de la actividad microbiana, así como los efectos positivos nutricionales benéficos para la salud (Hylckama *et al.*, 2011; Van Baarlen *et al.*, 2008).

Los nutrientes del yogur y otras leches fermentadas se asimilan y aprovechan mejor que los de la leche, debido a la acidificación producida durante fermentación por las bacterias ácido lácticas que espesan hasta darle el sabor y la consistencia típica del producto. Esta transformación aumenta la conservación del producto, además de que mejoran sus propiedades nutricionales mediante la biodisponibilidad de nutrientes o por la producción de sustancias biológicamente activas (Carmuega, 2004; González-Córdova *et al.*, 2011).

Los componentes de los productos lácteos fermentados y la relevancia de ellos, se presentan a continuación.

2.6.1 Proteínas

Las proteínas son biomoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Son los compuestos que desempeñan más funciones en las células de los seres vivos y forman parte de la estructura básica de los tejidos, músculos, huesos, etc. Asimismo, desempeñan importantes funciones metabólicas y reguladoras en la asimilación de nutrientes. El consumo de proteínas es de gran importancia y la fuente primaria de ésta, son los productos de origen animal como los productos lácteos.

Las proteínas de la leche contienen secuencias de péptidos bioactivos, que son liberados durante la digestión gástrica, el proceso de fermentación o por algunos procesos tecnológicos como la maduración de quesos o leches fermentadas (Torres-Llanez *et al.*, 2005). Dichas secuencias de péptidos pueden representar diferentes efectos fisiológicos en el sistema digestivo, endocrino, cardiovascular, sistema inmune y nervioso (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012). También se ha reportado que mediante la ingesta de las proteínas del suero, se

activan algunos componentes que contribuyen a la regulación del peso, enviando señales de saciedad a corto y largo plazo, éstas son una fuente barata y de alta calidad nutricional (Luhovyy *et al.*, 2007).

El componente de mayor importancia en el lactosuero debido a su actividad biológica es el glicomacropéptido (GMP) (Requena *et al.*, 2010), el cual se ha asociado a actividades biológicas como:

- Unión de la toxina colérica
- Unión de la enterotoxina *Escherichia coli*
- Inhibición de bacterias
- Adhesión viral
- Supresión de la secreción gástrica
- Promoción del crecimiento de *Bifidobacterias*
- Modulación de la respuesta inmune

Además, el GMP induce saciedad, debido a la estimulación del organismo para producir colecistoquinina, hormona liberada tras la ingestión de alimentos, responsable de dar la sensación de saciedad, lo que contribuye a la reducción de peso (Mikkelsen *et al.*, 2006).

2.6.2 Lípidos

Los lípidos son biomoléculas formadas por cadenas alifáticas, saturadas o insaturadas, en general lineales. Es un importante macronutriente. Provee sustratos para el recambio energético, es una parte integral de las membranas biológicas y regula la expresión de genes. Los componentes más importantes de

los lípidos de nuestra dieta son los triglicéridos, seguidos por los fosfolípidos y pequeñas cantidades de glicerolípidos, esteroides y vitaminas liposolubles.

Existen diversas fuentes de lípidos y una de ellas es la de origen lácteo. Los lípidos de la leche se concentran en glóbulos grasos de distintos tamaños y aproximadamente el 97.5% de éstos están formados por moléculas sencillas de triglicéridos (Jensen y Kroger, 2000). Éstos juegan un papel esencial, y de la misma forma, controversial en la dieta humana. Las propiedades sensoriales de los lípidos están íntimamente asociadas con la percepción positiva del sabor y la textura de los alimentos (Mattes, 2005). Sin embargo, los lípidos son macro nutrientes con mayor densidad energética, lo cual al tener un exceso en su consumo provoca una de las causas principales que conducen a obesidad. En contraste la digestión de las grasas no es solamente importante para la obtención de energía en el organismo, sino que también tiene un papel en la saciedad y en la regulación energética (Mourao *et al.*, 2007).

La liberación de ácidos grasos en la primera porción del intestino delgado provoca la secreción de una amplia gama de neuropéptidos como colecistocinina y péptido YY, que actúan alterando el vaciamiento gástrico y el consumo de alimentos (Mattes, 2005).

Desde hace algunas décadas, la grasa presente en los productos lácteos sufre una mala imagen para los consumidores de los países industrializados. No obstante, se ha manifestado interés por ciertos tipos de ácidos grasos presentes en la materia grasa de la leche, como el ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés). El CLA es un ácido graso que posee propiedades anticancerígenas, antilipogénicas, antiobesogénicas, inmunomoduladoras y antiteratogénicas (De la torre *et al.*, 2006).

Algunos estudios en humanos y animales de laboratorio han demostrado reducción en grasa corporal al ser alimentados con CLA. Además estudios *in vitro* han demostrado que el CLA inhibe la actividad de la enzima lipoproteína lipasa y estimula la lipólisis (DeLany *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha observado un incremento en la actividad de la enzima carnitín palmitoil transferasa, lo cual sugiere un aumento en la oxidación de ácidos grasos y un incremento en la tasa metabólica (Sisk *et al.*, 2001).

2.6.3 Minerales

Estudios han mostrado que los productos lácteos son la fuente más dietaria importante de calcio en nuestra dieta (50-98% biodisponibilidad) y se ha evidenciado que el calcio influye sobre el balance energético. Por lo tanto, incrementar la ingesta de lácteos se asocia a la reducción del tejido adiposo y como consecuencia la reducción del peso corporal (Pilvi *et al.*, 2010).

Se han planteado diferentes mecanismos que explican el efecto antiobesogénico del calcio incluyendo:

- I. Existe una relación entre la acción del calcio intracelular con el metabolismo de los lípidos. Al aumentar la ingesta del calcio en la dieta, produce una disminución del calcio intracelular, lo que inhibe así la lipogénesis (almacenamiento de grasa en el tejido adiposo) y promueve la lipólisis, la oxidación de lípidos y la termogénesis (Pilvi *et al.*, 2007; Rodríguez-Rodríguez y Anta, 2010).

Este mecanismo está relacionado con el descenso de la producción del calcitriol por la ingesta de calcio. Esto se traduce en la disminución de los

niveles calcitriol con un aumento en la producción de la proteína desacoplante 2 (UCP 2), lo que da como resultado un descenso en la termogénesis debido a dietas hipocalóricas y por lo tanto, produce un aumento de la apoptosis de los adipocitos (Pilvi *et al.*, 2007). Este último mecanismo explica el efecto antiobesogénico del calcio mediante la capacidad de estimular el incremento en la excreción de ácidos grasos en heces y conjuntamente obteniendo la pérdida de energía (Rodríguez-Rodríguez y Anta, 2010).

- II. También se ha sugerido que el calcio podría disminuir o inhibir la absorción de la grasa en el tracto gastrointestinal mediante la saponificación y con ello aumentar la pérdida de ácidos grasos en heces (Tejeda-López *et al.*, 2009).

2.7 Cultivos Lácticos Multifuncionales

En la elaboración de algunos productos lácteos se utilizan microorganismos llamados cultivos iniciadores, los cuales producen cambios deseables en los productos. Estos cultivos microbianos pueden ser formados por bacterias ácido lácticas, propionibacterias, levaduras y/o mohos. Los cultivos iniciadores desempeñan un papel multifuncional en los productos lácteos fermentados, ya que tienen gran capacidad para producir ácido láctico, el cual facilita la separación del suero en la cuajada y modifica la textura, sabor y aroma de los quesos y leches fermentadas (Marth y James, 2001). Debido al desarrollo industrial, se han utilizado distintas especies de bacterias lácticas como cultivos adjuntos para la producción del yogur como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium*, la inclusión de algunas de estas bacterias han demostrado

provocar ciertos beneficios para la salud (Aureli *et al.*, 2011). Por ejemplo la mejora del tracto gastrointestinal, control en los niveles de colesterol, la disminución de la hipertensión arterial, combate de diarreas, estreñimientos, infecciones urinario, desórdenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, alergias y algunos tipos de cáncer entre otros (Arribas *et al.*, 2008; Lannitti y Palmieri, 2010).

Estos microorganismos son llamados probióticos ya que estimulan el sistema inmune y ayudan a proteger al sistema digestivo; este efecto protector está dado por el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patógena (Aureli *et al.*, 2011).

2.7.1 Probióticos

En 1907 el biólogo ruso Metchnikoff propuso que el consumo de microorganismos vivos a través de leches fermentadas podía justificar la longevidad de ciertas poblaciones en Europa Oriental. Fuller (1989) definió probióticos como “complementos alimenticios compuestos de microbios vivos que afectan benéficamente al huésped al mejorar el equilibrio microbiológico intestinal” (Lannitti y Palmieri, 2010). Los probióticos son capaces de sobrevivir a la digestión ácida y biliar, colonizar el intestino, y son “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés), las bacterias de mayor estudio pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (DiBaise *et al.*, 2008; Lannitti y Palmieri, 2010). Los microorganismos que se encuentran en el intestino de un hospedero sano es llamada microbiota intestinal para denotar al conjunto de microorganismos presentes en el hospedador (Backhed, 2007)

Por otro lado, han mostrado que animales libres de gérmenes presentan una alta susceptibilidad a infecciones y enfermedades, lo que indica que una simbiosis intestinal genera una importante barrera para la colonización de patógenos potenciales, este proceso es llamado “exclusión competitiva” aquí los microorganismos compiten por un mismo nicho ecológico, nutrientes y sitio de adhesión (Eckburg, *et al* 2005).

En un estudio realizado por Kadooka *et al* (2010) en humanos con tendencia a obesidad, se observó que después del consumo de leche fermentada por *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) administrada durante doce semanas, presentaron disminución en el tejido adiposo. Sin embargo, no es posible definir si los resultados son exclusivamente debido al efecto de las bacterias o a la leche debido a que por sí sola también puede presentar efecto antiobesogénico. Por ello, Kadooka *et al.*,(2011) realizaron otro estudio para esclarecer esta confusión por ello utilizó leche y leche fermentada (LG2055) en los tratamientos, observó que la leche fermentada presentó correlación con el efecto antiobesogénico y antiinflamatorio después de su administración. De la misma forma, se obtuvieron resultados positivos al evaluar el efecto antiobesogénico con la cepa *Bifidobacterium brevi* B-3 en ratas, además, se observó una disminución en los niveles séricos de colesterol total, glucosa e insulina en ayunas (Kondo *et al.*, 2010). En la Tabla 2 se presentan otras investigaciones relacionadas con el efecto sobre el control de peso o/y marcadores tempranos de la enfermedad de diferentes bacterias probióticas.

Tabla 2. Efecto en la modulación de peso corporal asociada a bacterias probióticas

Especie	Dosis (duración)	Modelo/ dieta	Resultados	Referencia
<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	6 x 10 ⁷ UFC / LF (4 semanas)	Ratas S-D / Hipercalórica	Reducción de biomarcadores séricos (cHDL, glucosa, leptina, triglicéridos) tamaño de adipocito, sin efecto en adiponectina y el peso corporal	Sato <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST 11	1x 10 ⁹ UFC /2ml agua(11 semanas)	Rata Wistar / DIO	Reducción en grasa abdominal, peso corporal	Tanida <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	Liofilizado de LF con 6 x 10 ⁷ UFC /g de alimento (4 semanas)	Ratas S-D, Zucker	Reducción en biomarcadores séricos, reducción de peso y tamaño de adipocito en ambos casos, sin efecto en glucosa y leptina en las ratas Zucker	Hamad <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactobacillus plantarum</i> No.14	1 x 10 ⁸ UFC/mL (11 semanas)	Ratón C57BL / DIO / 0.2ml	Reducción en biomarcadores séricos excepto colesterol, leptina, peso corporal, tejido adiposo.	Takemura <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	5 x 10 ¹⁰ UFC por c/100g de LF (12 semanas)	Humanos / 200G de LF por día	↓ Adiposidad abdominal, Peso corporal, Colesterol, Glucosa, Leptina.	Kadooka <i>et al.</i> , 2010
<i>Bifidobacterium breve</i> B-3.	10 ⁸ UFC (8 semanas)	Ratón C57BL / DIO	Reducción en los biomarcadores séricos, peso en órganos(hígado, colon, epidídimo), no hubo cambios significativos en Adiponectina, Leptina y triglicéridos	Kondo <i>et al.</i> , 2010
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ⁹ UFC/mL / 0.2ml PBS (7 semanas)	Rata S-D/DIO	Reducción de peso corporal y grasa visceral, mejora en la sensibilidad insulina	An <i>et al.</i> , 2011
<i>Lactobacillus sakei</i> NR28	10 ⁸ UFC/mL /10µl de PBS (8 semanas)	Ratón C57BL / CJ	Reducción en los biomarcadores séricos y grasa epididimal	Ji <i>et al.</i> , 2012
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NTU 101 y 102	10 ⁶ - 10 ¹⁰ UFC/mL de LF de soya (5 semanas)	Ratas Wistar	Reducción en los biomarcadores séricos aunque el cHDL no se vio afectado, reducción en el tamaño de adipocito, aumento leptina sérica	Bao-Hong <i>et al.</i> , 2013
<i>Lactobacillus plantarum</i> KY1032, <i>Lactobacillus curvatus</i> HY7601	2 x 10 ⁷ - 2 x 10 ¹⁰ UFC/1 ml PBS (10 semanas)	Ratón C57BL / CJ / DIO	Reducción en los biomarcadores séricos (colesterol HDL, insulina y leptina), peso corporal y la grasa abdominal, no hubo efecto en los niveles de colesterol total y en triglicéridos no hubo efecto.	Do-Young <i>et al.</i> , 2013

DIO; dieta para inducción de obesidad, LF; leche fermentada, S-D; Sprague Dawley

3. HIPÓTESIS

La ingesta de leche fermentada con cepas específicas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas tiene efecto antiobesogénico en un modelo murino con obesidad inducida.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto antiobesogénico por la ingesta de leches fermentadas con cepas específicas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas en un modelo murino con obesidad inducida.

Específicos

1. Determinar la ganancia de peso en ratas Sprague Dawley con obesidad inducida durante 12 semanas bajo tratamiento con leches fermentadas con cepas específicas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas.
2. Determinar el efecto en los valores séricos del colesterol HDL/LDL, triglicéridos y glucosa en ratas Sprague Dawley en tratamiento.
3. Evaluar el efecto de la administración de las leches fermentadas en los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α), así como, los niveles de insulina y leptina en suero sanguíneo.
4. Evaluar el efecto de la administración de las leches fermentadas sobre la masa de grasa en ratas con obesidad inducida mediante el uso densitometría de rayos X (DXA).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bacterias y Condiciones de Cultivo

Las cinco bacterias ácido lácticas (BAL) empleadas en este estudio (Tabla 3) pertenecieron al Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos y Calidad y Autenticidad de Alimentos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Dichas cepas fueron previamente aisladas a partir de queso Cocido artesanal. Catalogadas con potencial probiótico por Santiago-López (2011)

Tabla 3. Bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas empleadas en el estudio.

Código de la cepa	BAL
2	<i>Lactobacillus fermentum</i>
4	<i>Lactobacillus pentosus</i>
6	<i>Lactobacillus pentosus</i>
7	<i>Lactobacillus pentosus</i>
17	<i>Lactobacillus pentosus</i>

Las cepas fueron proporcionadas en glicerol (50% v/v), y fueron reactivadas en caldo MRS (pH 6.2, De Man, Rogosa and Sharpe, MRS Difco™).

Las cepas activadas fueron propagadas con dos subcultivos que involucraron un inóculo (1%) e incubar a 37 °C por 24h (Santiago-López, 2011).

5.2 Preparación de Leches Fermentadas

La preparación de las leches fermentadas para los tratamientos de las ratas se llevó a cabo según el método descrito por González-Córdova *et al* (2011) con algunas modificaciones. Estas leches fermentadas fueron preparadas una vez por semana durante las 12 semanas de tratamiento.

La leche usada para el tratamiento fue leche descremada en polvo Organic Valley® USDA Organic Grande A (La Farge, WI, EUA). La leche se reconstituyó al 10% (p/v) y se esterilizó a 110 °C por 10 minutos. El inóculo fue preparado mediante dos subcultivos inoculado (3% (v/v) cada cepa por separado en 15mL de leche estéril. Este incubada a 37 °C por 18 y 12 h respectivamente. Esto último con la finalidad de obtener una concentración de 10^5 - 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y ser utilizada para la inoculación de la leche fermentada final incubada a 37 °C por 18 horas. La leche fermentada fue colocada en refrigeración (4 – 10°C). La cuenta microbiana se determinó mediante la técnica de vaciado en placa empleando agar MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE marca Sigma) Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37 °C.

5.3 Análisis Fisicoquímicos de las Leches Fermentadas

Se realizó el análisis fisicoquímico de grasa y proteína a la leche fermentada por triplicado. La grasa fue determinada por el método de Babcock (989.04) de la AOAC (2000) y la proteína por el método de microkjeldahl (991.20) de la AOAC (2000). En el caso de Calcio, Magnesio y Potasio fue por el método oficial de análisis (EPA 3052, 962.09, AOAC 1998).

5.4 Experimento *in vivo*

Se utilizaron 49 ratas machos Sprague Dawley (Laboratorios Harlan México), de 4 - 6 semanas de edad (150 a 250g de peso corporal). Cada uno de ellos fue alojado en jaulas individuales bajo ambiente controlado con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Las ratas tuvieron un periodo de adaptación de una semana con dieta estándar (Laboratorios Harlan México con número de catálogo 2018S) (NOM-062). Después de la adaptación, las ratas fueron divididas en 8 grupos. Posteriormente, se inició la introducción del alimento hiperlipídico mezclándola con el alimento estándar por un período de dos semanas de adaptación. Se inició con el 10% de la comida hiperlipídica y el resto de la dieta estándar hasta llegar al 100% de la dieta hiperlipídica (10, 25, 50 y 75 y 100%) por 10 días.

Posterior a la adaptación, las ratas fueron administradas con 1ml de la leche fermentada por vía orofaríngea, diariamente por 12 semanas con una cánula para rata No. 20 (figura 2). El peso fue monitoreado en una balanza marca OHAUS® modelo Triple Beam de 0.1g a 610g, una vez por semana por la tardes

(considerando que las ratas son nocturnas) con 3 a 4 horas de ayuno para evitar variaciones por el consumo de alimento. Al cumplir las 12 semanas de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas usando la técnica de punción cardiaca, después de un ayuno de 12 h.

Se recolectó sangre para los análisis serológicos, la cual permaneció en hielo de 30 a 60 minutos, después fue centrifugada en una centrifuga Eppendorf modelo 5417R por 20 min a 2000 rpm (371g) a 4 °C. Posteriormente, el suero fue separado y usado para análisis de lípidos y glucosa y el resto fue almacenado a -20 °C para su uso futuro. Posteriormente se procedió a la extracción de algunos tejidos (adiposos perirenal y epididimal) y órganos. Los tejidos adiposos fueron colocados en formol al 10% y almacenados para su posterior uso. El hígado, riñón, testículos y corazón fueron colocados en bolsas individuales y almacenados a -20 °C (Kondo *et al.*, 2010).



Figura 2. Forma de administración de leche fermentada

5.5. Cálculo del Número de Muestra

El número de muestra de ratas empleadas en este trabajo se calculó con un nivel de confianza del 95% utilizando la siguiente ecuación ($\alpha = 0.05$, $Z = 1.96$).

$$2n = \frac{4(z\alpha + z\beta)\sigma^2}{\delta^2}$$

Donde $Z = 95\%$ confianza = 1.96, $\delta = 0.03$, $\beta = (\sigma) \times (\text{media})$, $\sigma = 0.05$.

Los datos usados para determinar el número de muestra fueron tomados de un estudio de referencia semejante realizado por Yukio Kadooka *et al* (2011). El número resultante de este cálculo fue de 7 ratas por tratamiento

5.7 Densitometría de Rayos X (DXA)

La técnica de DXA permite la visualización directa de grasa sin el sacrificio de la rata. La determinación de grasa corporal se hizo una semana antes del sacrificio de las ratas en los laboratorios de nutrición de la Universidad de Sonora por la técnica de imagen con el densitómetro HOLOGIC™, (modelo Explorer). Después del ayuno de 4 horas, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico, la dosis administrada fue la más baja en base a su peso (50 – 70 mg / Kg, intra peritoneal (IP)) (figura 3). Una vez que las ratas fueron anestesiadas, se colocaron en una base de cartón con la espalda y las piernas bien estiradas y fijas al cartón (Kondoh *et al.*, 2008).



Figura 3. Sitio de punción para anestesia intraperitoneal

5.8 Dieta para Inducción de Obesidad

El alimento hipercalórico- lipídico para la inducción de obesidad fue adquirido en Research diets, Inc (New Brunswick, New Jersey, USA). La cantidad necesaria se calculó en base al número de ratas y el tiempo del estudio, con la siguiente fórmula:

(número de ratas) x (consumo diario en g) x (días de consumo)= Kg de dieta base.

La composición del alimento se encuentra especificada en la tabla 4, la cual muestra el contenido calórico de proteínas, carbohidratos y grasa por gramo de alimento que fue consumido.

Tabla 4. Composición de la dieta hiperlipídica

Macronutrientes	Concentración (%)	Calorías (Kcal / g)
Proteína	20	1.048
Carbohidratos	20	1.048
Grasa	60	3.144
Contenido energético (Kcal/g)	-	5.24

Formulada en E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc.

5.9 Cuantificación de los Niveles séricos de Lípidos, Glucosa, Citocinas (IL-6, TNF-alfa) y Hormonas (insulina y leptina)

La concentración de los niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL fueron determinados con un kit enzimático Randox (Randox laboratories, Inglaterra) en un equipo clínico semiautomático MicroLab100 (Merk).

5.9.1. Glucosa

La determinación de glucosa en suero sanguíneo se realizó con el kit GL2614 A de laboratorios Randox (Randox laboratories, Inglaterra) en un equipo clínico semiautomático MicroLab100 (Merk).

Triglicéridos

La determinación de los niveles de triglicéridos en suero sanguíneo fue realizado con el kit TR 1697 de laboratorios Randox (Randox laboratories, Inglaterra). en un equipo clínico semiautomático MicroLab100 (Merk).

5.9.2. Colesterol Total y HDL

Las determinaciones de colesterol total y HDL fueron realizadas mediante el sistema enzimático colesterol oxidasa/peroxidasa. Los kit empleados fueron CH 199 y HDL CH 3811 de laboratorios Randox (Randox laboratories, Inglaterra).

5.9.3. Insulina

La determinación de insulina en suero sanguíneo se realizó utilizando un kit de ELISA 80-INSRT-E01 ALPCO® Diagnostics, el cual es un inmunoensayo amplificado mediante enzimas de tipo sandwich. En el ensayo los estándares,

controles y muestras se incubaron con un anticuerpo con insulina en una micro placa de 96 pocillos siguiendo las recomendaciones y cuidados del proveedor. La medición de la absorbancia fue a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro spectra MAX 3 Multi-Mode Microplate Reader Molecular devices, LLC. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de la insulina presente. Para calcular la concentración de insulina en las muestras problema se construyó una curva estándar.

5.9.4. Leptina

Se determinaron los niveles de leptina en suero sanguíneo utilizando un kit de ELISA Rat Leptin KRC2281 Invitrogen™ (Life Technologies Corporation), el cual es un inmunoensayo amplificado mediante enzimas de tipo sándwich. En el ensayo los estándares, controles y muestras se incubaron con un anticuerpo con leptina en una micro placa de 96 pocillos siguiendo las recomendaciones y cuidados del proveedor. La medición de la absorbancia fue a una longitud de onda de 450nm en un espectrofotómetro spectra MAX 3 Multi-Mode Microplate Reader Molecular devices, LLC. Para calcular la concentración de leptina en las muestras problema se construyó una curva estándar.

5.9.5. IL-6 y TNF- alfa

Ambas citocinas se cuantificaron en suero sanguíneo utilizando un kit de ELISA Invitrogen™ (Life Technologies Corporation), basado en un inmunoensayo amplificado mediante enzimas de tipo sándwich. En el ensayo los estándares, controles y muestras se incubaron con un anticuerpo en una micro placa de 96 pocillos siguiendo las recomendaciones y cuidados del proveedor. La medición de la absorbancia fue a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro spectra MAX 3 Multi-Mode Microplate Reader Molecular

devices, LLC. Para calcular las concentraciones de citocinas en las muestras problema se construyó una curva estándar.

5.10 Análisis Estadístico

Los resultados correspondientes al peso corporal y consumo semanal de alimentos fueron analizados mediante un diseño en bloques al azar. Las variables de respuesta fueron la ganancia en peso corporal y masa grasa de los animales y el factor de bloqueo fue el tiempo. Los niveles séricos de lípidos y glucosa, hormonas y citocinas, así como el peso de cada órgano y tejido, fueron analizados mediante un diseño completamente al azar. Todos los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% con el uso del paquete estadístico NCSS 2007. La determinación de las diferencias significativas se realizó mediante la prueba de Fisher.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Preparación de Leches Fermentadas

Se utilizaron 5 cepas de *Lactobacillus* (2, 4, 6, 7 y 17) para la fermentación de leche que correspondieron a cada tratamiento, a las cuales se les evaluó la concentración viable celular bacteriana a las 0 y 18 horas de fermentación, así como a los 7 días de almacenamiento (a 4°C) posterior a la fermentación. Dicho monitoreo se realizó con el fin de confirmar la viabilidad bacteriana y de esta forma asegurarse de que la población se mantuviera durante el almacenamiento.

Los resultados se muestran en la Figura 4, en donde se puede observar un incremento de 6.4 a 8.0 Log₁₀ UFC/mL del tiempo 0 a las 18 horas. A su vez, esta última concentración se mantuvo hasta los 7 días de almacenamiento. Lo anterior garantizó que a partir de un mismo lote de leche fermentada, se realizara una administración homogénea durante toda la semana para todos los tratamientos. Estos valores se encuentran dentro lo establecido por el CODEX (2011) para microorganismos específicos (≥ 6 Log₁₀ UFC/ml), para brindar el efecto esperado.

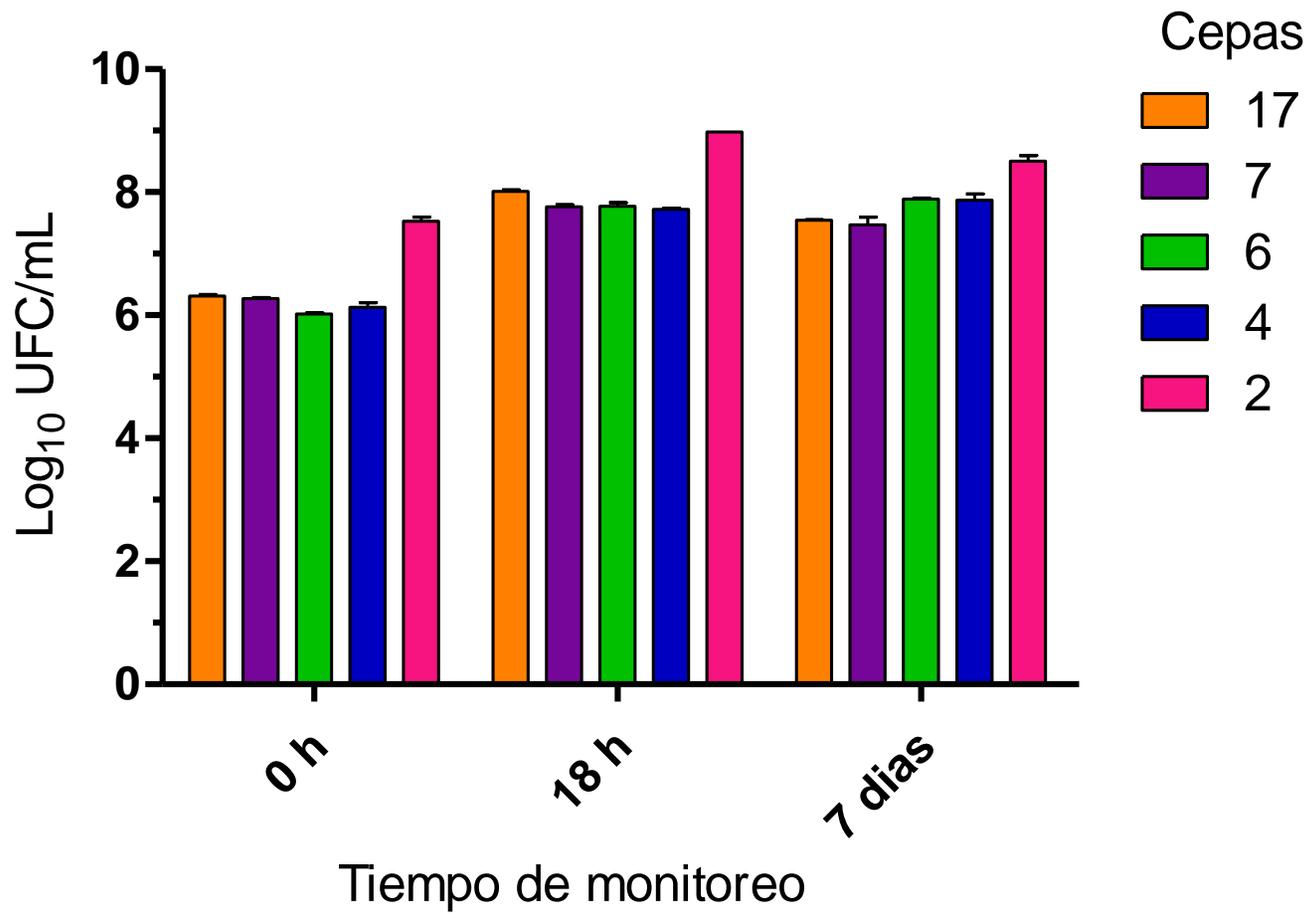


Figura 4. Cuenta total en agar MRS de las BAL en las leches fermentadas.

6.2 Análisis Composicional de las Leches Fermentadas

La tabla 5 muestra la composición de macronutrientes (proteína, grasa y carbohidratos) y micronutrientes (calcio, magnesio y potasio) de las leches fermentadas por las diferentes cepas. Los resultados indicaron que las leches fermentadas con las diferentes cepas no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en composición de macro y micro nutrientes. Además, el contenido energético no fue significativamente diferente ($p>0.05$) entre las leches fermentadas y varió en un rango de 1.03-1.05 Kcal/mL. Estos resultados garantizaron que el aporte calórico brindado por las leches fermentadas fuera equivalente.

6.3 Experimento *in vivo*

El tamaño de muestra fue de siete ratas por grupo, uno control positivo para obesidad (DIO) alimentado con dieta para inducción de obesidad, un grupo control negativo (DN) alimentado con una dieta estándar, un grupo alimentado con DIO más leche sin fermentar, y 5 grupos más a los cuales, además de la dieta DIO, se les administró leche fermentada con la cepa de BAL correspondiente.

Tabla 5. Análisis composicional de leches fermentadas por BAL

Componente	Cepa de BAL				
	17	7	6	4	2
Proteína (%)	35.84	35.24	36.62	38.29	35.37
Grasa (%)	ND	ND	ND	ND	ND
Carbohidratos (%)	65.08	65.32	63.38	62.03	63.38
Calcio (mg/dL)	1.38	1.35	1.37	1.32	1.33
Magnesio (mg/dL)	0.10	0.10	0.105	0.10	0.10
Potasio (mg/dL)	1.69	1.68	1.77	1.70	1.73
Contenido energético (Kcal/mL)	1.05	1.03	1.03	1.04	1.03

ND; No detectada

En la Figura 5 se muestra la ganancia de peso semanal durante el experimento para el control positivo de obesidad (DIO) y el control negativo (DN). En nuestro modelo experimental, la obesidad se alcanzó entre la 3^a y 4^a semana después de iniciar la administración de leches fermentadas. Según datos reportados por Harlan Laboratories, INC (Indianapolis, IN, USA, 2006), el peso corporal normal para ratas Sprague Dawley de nueve semanas de edad, debería variar de 250 a 300 g y se ha reportado que una ganancia en peso mayor a 85g al peso corporal basal de referencia, es considerado un estado de obesidad (Farley *et al.*, 2003).

En la Figura 6 se muestra la ganancia de peso corporal semanal acumulada por los grupos tras la administración de leche sin fermentar (L, como grupo control) y leches fermentadas con las cepas de *Lactobacillus* (2, 4, 6, 7 o 17, como tratamientos). El monitoreo de la ganancia de peso fue determinada una vez a la semana entre las 12:00 y 15:00 h.

Los resultados mostraron que todos los grupos tratados con leche fermentada presentaron menor ganancia en peso que el grupo control (L) ($p < 0.05$). Además, los grupos tratados con la leche fermentada por las cepas 4, 6 o 17, presentaron una ganancia en peso significativamente menor que el grupo L ($p < 0.05$). Los grupos tratados con leche fermentada con las cepas 2 o 7, no mostraron diferencias significativas en comparación al grupo L ($p > 0.05$); sin embargo, es importante resaltar que las ganancias de peso corporal promedio de estos dos tratamientos fueron menores que el grupo control.

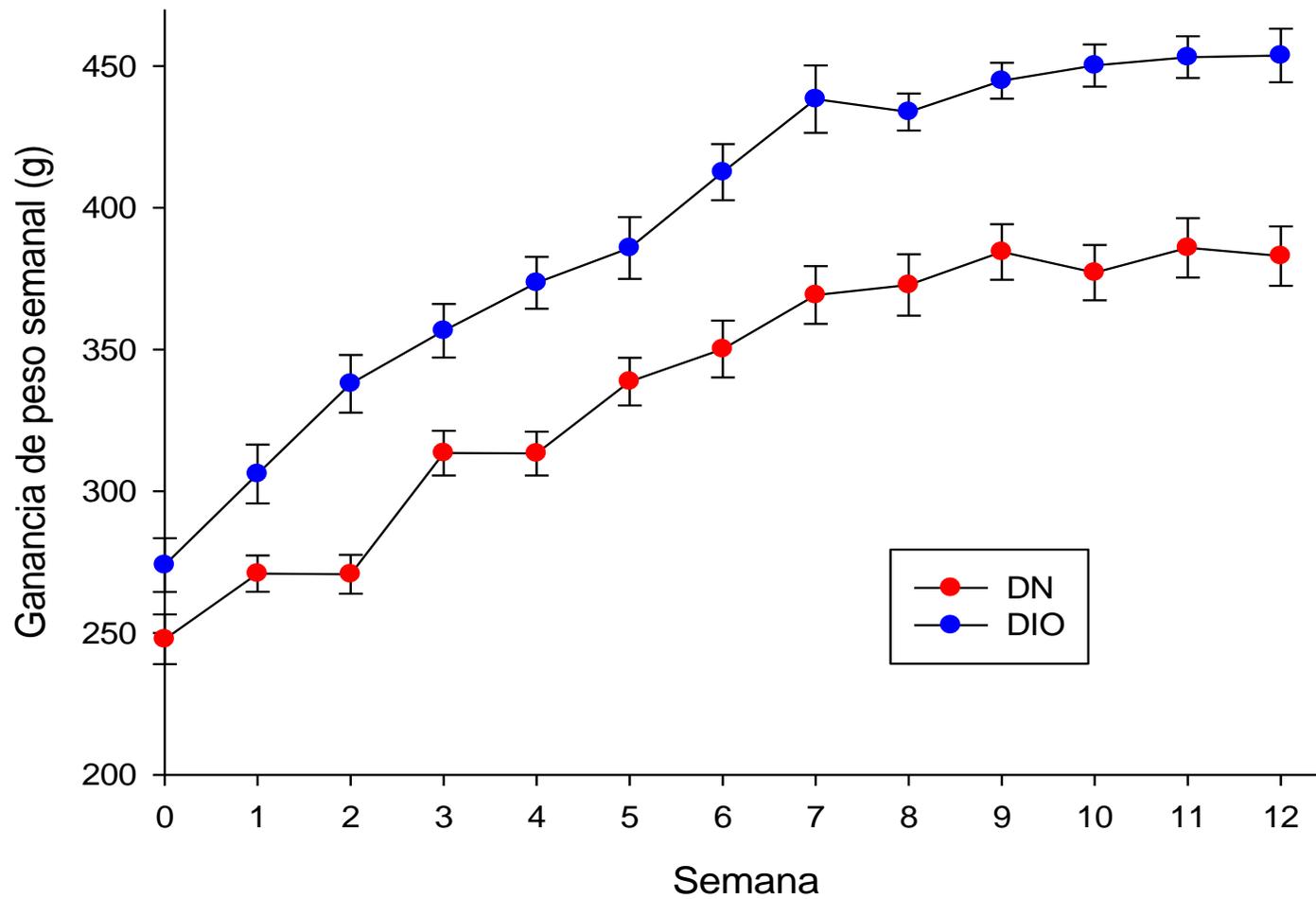


Figura 5. Ganancia de peso semanal en ratas alimentadas con DIO y DN

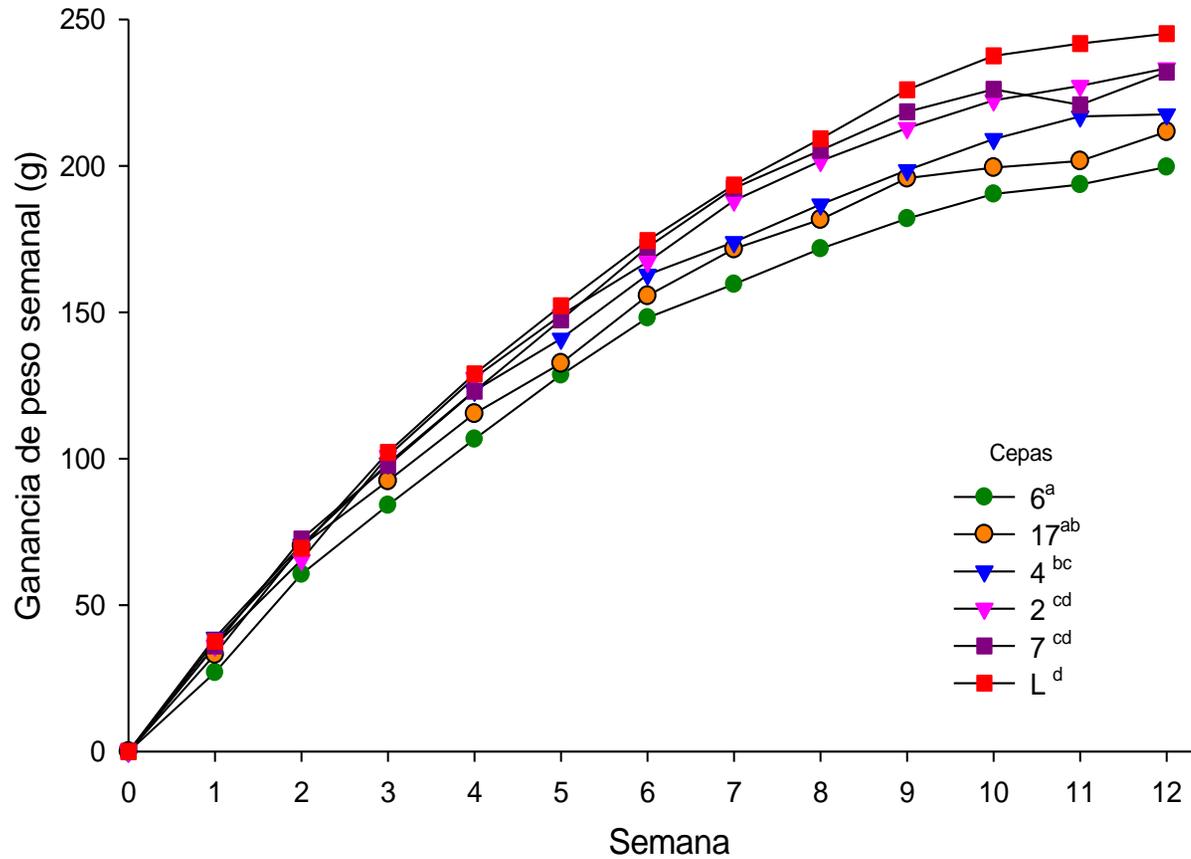


Figura 6. Ganancia de peso corporal acumulado en las ratas durante las 12 semanas de administración con leches fermentadas por diferentes cepas de BAL.

Tratamientos con diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

2,4,6,7,17: Cepas de BAL (*Lactobacillus*) usadas para la fermentación de leche.

L: Leche sin fermentar, como tratamiento control.

El efecto en la disminución de la ganancia en peso para los grupos administrados con las leches fermentadas se empezó a observar a la tercera semana de tratamiento. Otras investigaciones han mostrado un efecto desde la tercera semana de tratamiento para el caso de roedores (Kondo *et al.*, 2010) y desde la octava semana para el caso de humanos (Kadooka *et al.*, 2010).

Se ha reportado que las leches fermentadas con bacterias probióticas modifican la microbiota intestinal y que esta a su vez podría estar relacionada con la regulación del peso (Tulika *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos propuestos coinciden en que posiblemente el efecto esté asociado a la supresión del apetito con péptidos inductores de saciedad, a la producción de ácido linoleico conjugado y a la modificación de la termogénesis y absorción de lípidos (Tulika *et al.*, 2013).

En la Figura 7 se muestra la ingesta calórica semanal para cada grupo durante el período de estudio. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos durante las 12 semanas de estudio, siendo el grupo L, el de mayor ingesta calórica y significativamente diferente al resto de los grupos que fueron administrados con leches fermentadas. También, se observó que durante el periodo de tratamiento, la ingesta calórica presentó un comportamiento con tendencia a una ligera disminución conforme transcurrió el tiempo. A excepción de la semana 10, en la cual se mostró una ingesta calórica menor, fuera de tendencia, lo cual pudo deberse a que en esa semana se realizó una reubicación de los animales.

La Figura 8 presenta la ingesta calórica promedio por grupo en las 12 semanas. Los grupos administrados con las leches fermentadas por las cepas 4 o 17 fueron los que presentaron una ingesta calórica significativamente menor a los demás

grupos ($p < 0.05$), seguidas por los grupos 2, 6 y 7, los cuales no fueron significativamente ($p > 0.05$) diferentes entre sí (Figura 8).

Por otro lado, los grupos tratados con leche fermentada por las cepas 2, 4, 6 o 17, presentaron una menor ganancia de masa grasa en comparación al grupo L ($p < 0.05$) (Figura 9). Además, es importante resaltar que los grupos tratados con la leche fermentada por las cepas 2 o 4 presentaron una menor ganancia de masa grasa, a pesar que presentaron mayor ganancia de peso corporal, lo cual podría deberse a una mayor ganancia de peso en masa magra. Considerando los resultados mostrados en las Figuras 6, las leches fermentadas con las cepas 4, 6 o 17 fueron las que mostraron un mayor efecto antiobesogénico y se observó una relación directa entre el consumo calórico, la ganancia de peso y la ganancia de masa grasa.

En la tabla 6 se muestra el peso del hígado, corazón, riñón y tejidos epidídimo y perirenal (asociados al almacenamiento de grasa) en las ratas con los diferentes tratamientos. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos y el grupo control para los pesos de corazón, riñón y los tejidos epididimal y perirenal. Sin embargo, se presentaron pesos del hígado significativamente ($p < 0.05$) menores para los grupos tratados con leche fermentada con las cepas 7 o 17.

En la tabla 7 se muestran los niveles séricos de lípidos y glucosa de las ratas al finalizar las 12 semanas de tratamiento. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos con las cepas 4, 6, 7 o 17 y el grupo control para la concentración de glucosa. Para colesterol total, los niveles séricos significativamente menores al grupo control, se encontraron en los grupos tratados con leches fermentadas por las cepas 6, 7 o 17. Sin embargo, solo el

nivel de triglicéridos séricos del grupo tratado con la leche fermentada con la cepa 7, fue significativamente ($p < 0.05$) menor que el grupo control. Por otro lado, aunque el grupo tratado con leche fermentada con la cepa 4 presentó una menor ganancia de peso y masa grasa que el control, este grupo presentó nivel de triglicéridos significativamente ($p < 0.05$) mayor al grupo control.

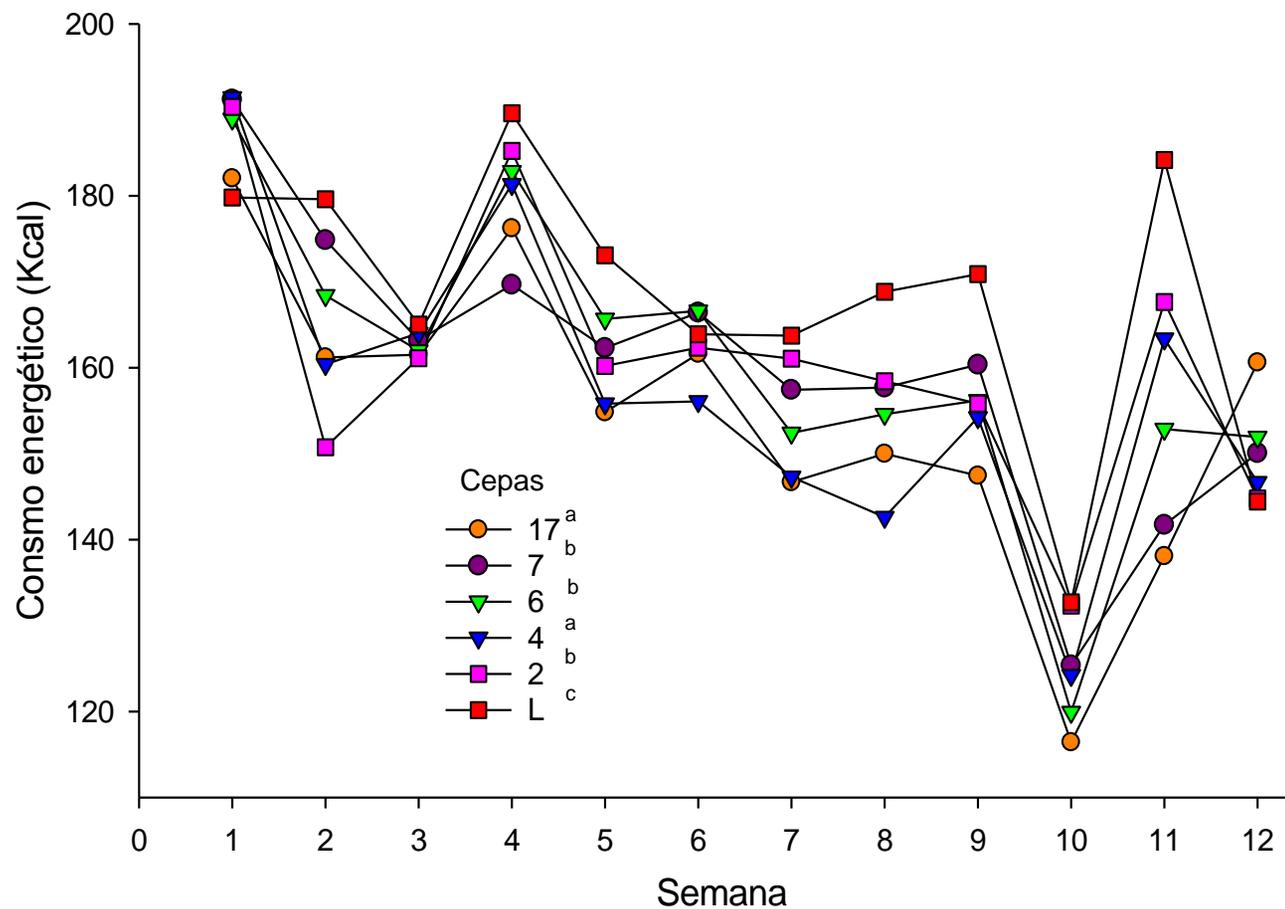


Figura 7. Ingesta calórica semanal consumida durante 12 semanas de administración con leche fermentada por BAL. Los datos muestran el promedio de la ingesta calórica total en cada semana. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos durante las 12 semanas de estudio.

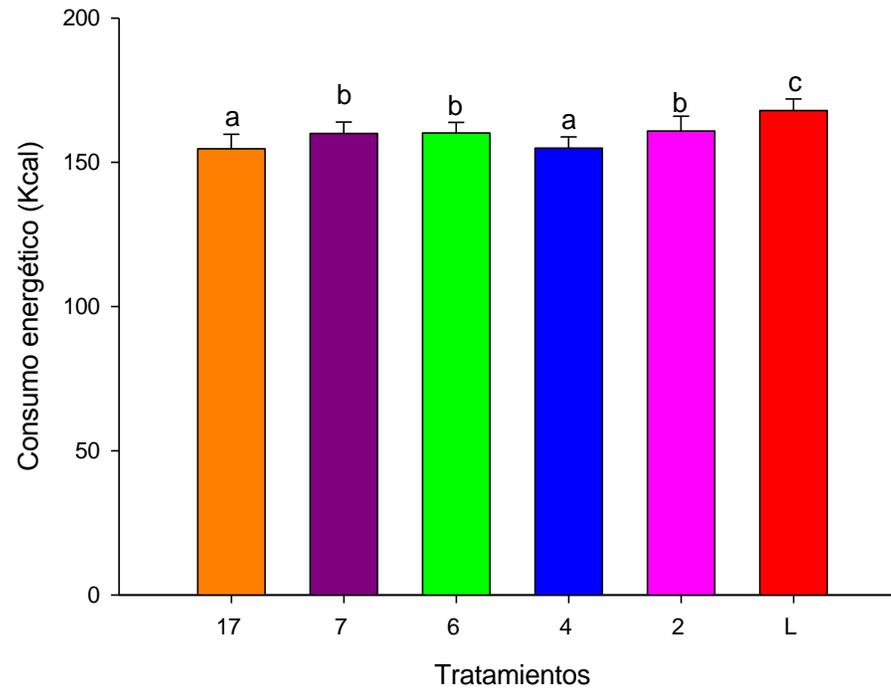


Figura 8. Ingesta calórica consumida durante 12 semanas de administración con leche fermentada por BAL. Los datos muestran el promedio de la ingesta calórica total semanal. Diferentes literales entre barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos durante las 12 semanas de estudio.

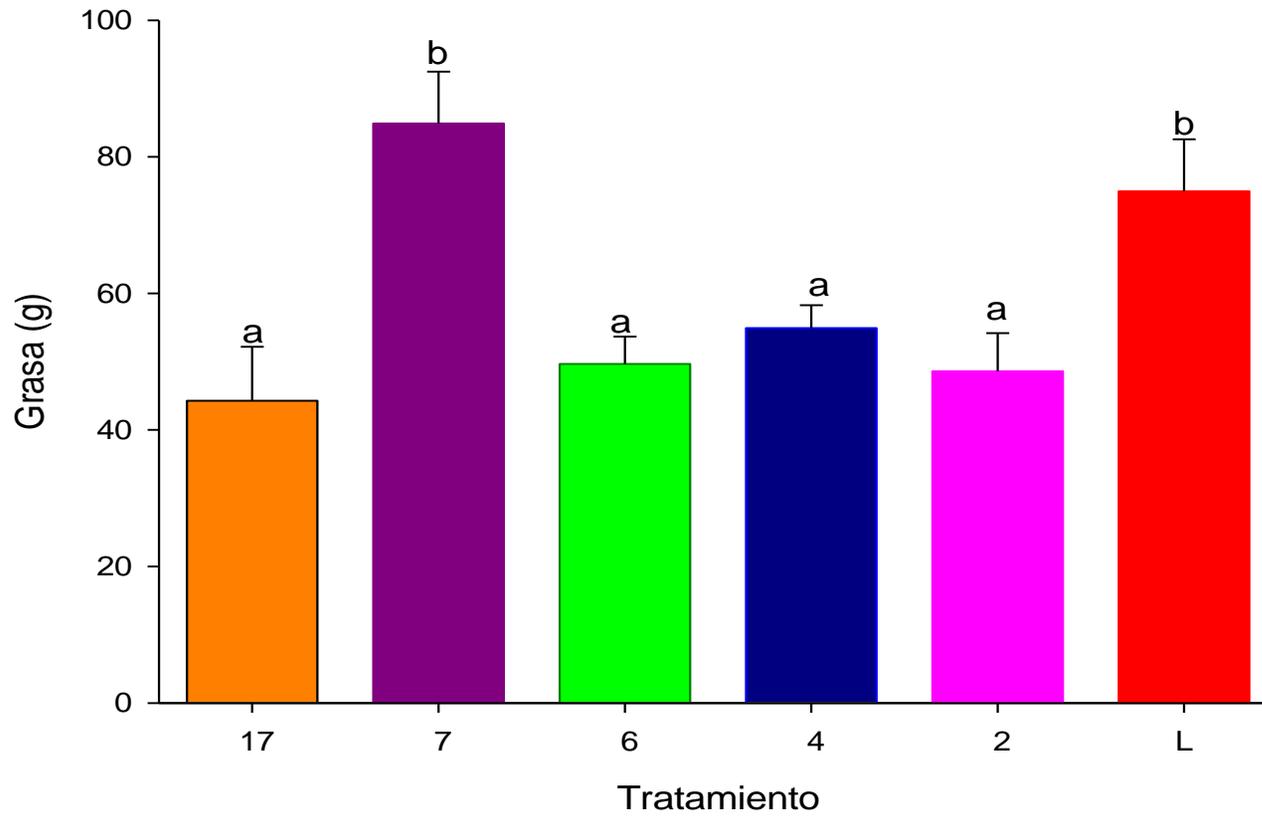


Figura 9. Ganancia total de masa grasa de ratas en tratamiento con leche fermentada con BAL por 12 semanas. Los datos representan al promedio \pm EE. Barras con diferente literal indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 6. Peso de órganos, y tejidos asociados al almacenamiento de grasa, de ratas después de 12 semanas de administración con leches fermentadas por BAL.

Tratamiento	Hígado (g)	Corazón (g)	Tejido Epididimal (g)	Riñón (g)	Tejido Perirenal (g)
17	13.62 ± 0.94 ^a	1.51 ± 0.15 ^a	10.33 ± 1.92 ^a	2.82 ± 0.31 ^a	10.30 ± 3.51 ^a
7	12.53 ± 3.47 ^{ab}	1.45 ± 0.32 ^a	12.22 ± 1.63 ^a	2.60 ± 0.44 ^a	10.60 ± 1.30 ^a
6	15.65 ± 1.67 ^c	1.40 ± 0.26 ^a	11.46 ± 1.83 ^a	2.94 ± 0.22 ^a	9.26 ± 2.02 ^a
4	15.51 ± 1.32 ^c	1.51 ± 0.15 ^a	10.06 ± 1.53 ^a	2.71 ± 0.25 ^a	10.36 ± 2.94 ^a
2	17.60 ± 1.46 ^{cd}	1.48 ± 0.15 ^a	11.96 ± 2.29 ^a	2.91 ± 0.22 ^a	12.53 ± 4.78 ^a
L	17.25 ± 2.42 ^{cd}	1.54 ± 0.01 ^a	11.63 ± 3.18 ^a	3.00 ± 0.25 ^a	10.86 ± 2.50 ^a

Los resultados indican el promedio ± DE. Diferentes superíndices en una columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En el caso de cHDL, los niveles más altos, pero iguales ($p > 0.05$) al grupo control fueron presentados por los grupos con leches fermentadas por las cepas 4 o 2. Para los niveles séricos de cLDL, todos los grupos tratados con leches fermentadas fueron significativamente ($p < 0.05$) inferiores al grupo control. Por último, los valores obtenidos para cVLDL (very-low-density lipoprotein, por sus siglas en inglés) de los grupos tratados con leche fermentada 6, 7 o 17 fueron iguales al control ($p > 0.05$).

Estudios realizados anteriormente mostraron una reducción de colesterol total y cLDL en suero sanguíneo en ratas administradas con leches fermentadas con *Lactococcus lactis* (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2013). Este efecto podría traducirse en una reducción de riesgo para el desarrollo de enfermedades de origen cardiovascular (Sato *et al.*, 2008, Hamad *et al.*, 2009, Kondo *et al.*, 2010, Chung-Yi. *et al.*, 2010).

Tabla 7. Niveles séricos de lípidos y glucosa de ratas después de 12 semanas de administración con leches fermentadas por BAL.

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	cHDL (mg/dL)	cLDL (mg/dL)	cVLDL (mg/dL)
17	157.96 ± 17.70 ^a	80.50 ± 5.79 ^{ab}	88.50 ± 5.49 ^a	20.73 ± 1.48 ^b	45.80 ± 3.24 ^a	16.00 ± 1.12 ^a
7	189.85 ± 25.83 ^a	56.50 ± 4.08 ^a	102.00 ± 11.84 ^{ab}	19.45 ± 1.45 ^{ab}	60.80 ± 8.18 ^{ab}	13.66 ± 1.10 ^a
6	178.16 ± 16.59 ^a	66.00 ± 2.62 ^{ab}	96.60 ± 9.54 ^{ab}	15.90 ± 0.92 ^a	62.40 ± 7.49 ^{ab}	13.33 ± 0.55 ^a
4	195.83 ± 17.59 ^a	161.33 ± 11.47 ^c	116.00 ± 4.35 ^{bc}	27.68 ± 1.33 ^c	65.20 ± 4.61 ^b	32.30 ± 2.29 ^b
2	290.90 ± 41.81 ^b	153.83 ± 13.28 ^c	114.50 ± 5.84 ^{bc}	27.70 ± 1.30 ^c	45.60 ± 3.69 ^a	31.50 ± 3.25 ^b
L	171.33 ± 10.62 ^a	84.50 ± 8.66 ^b	125.50 ± 6.95 ^c	27.63 ± 1.77 ^c	86.60 ± 5.70 ^c	16.83 ± 1.66 ^a
DN	187.07 ± 17.12 ^a	53.33 ± 4.13 ^a	102.16 ± 4.81 ^{ab}	22.36 ± 2.89 ^b	68.83 ± 5.04 ^c	10.66 ± 0.88 ^a

Los resultados indican el promedio ± EE. Diferentes superíndices en una columna son estadísticamente diferentes (p<0.05).

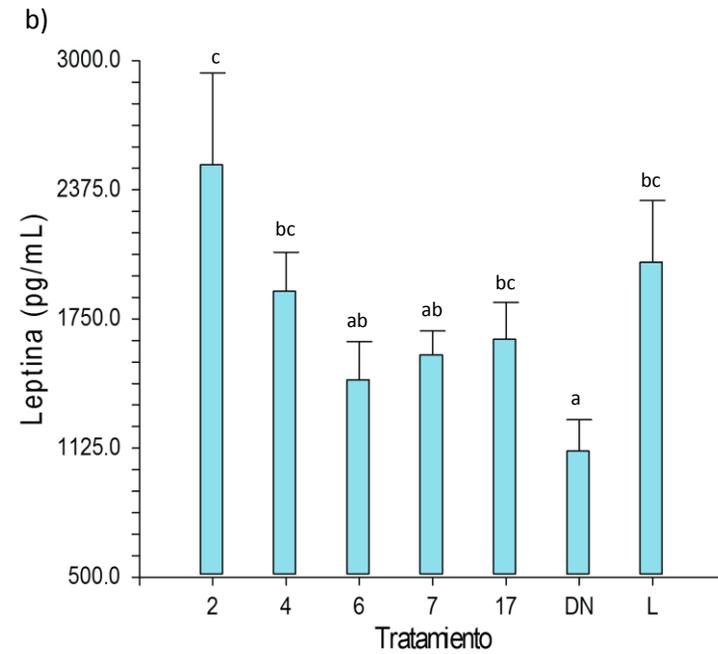
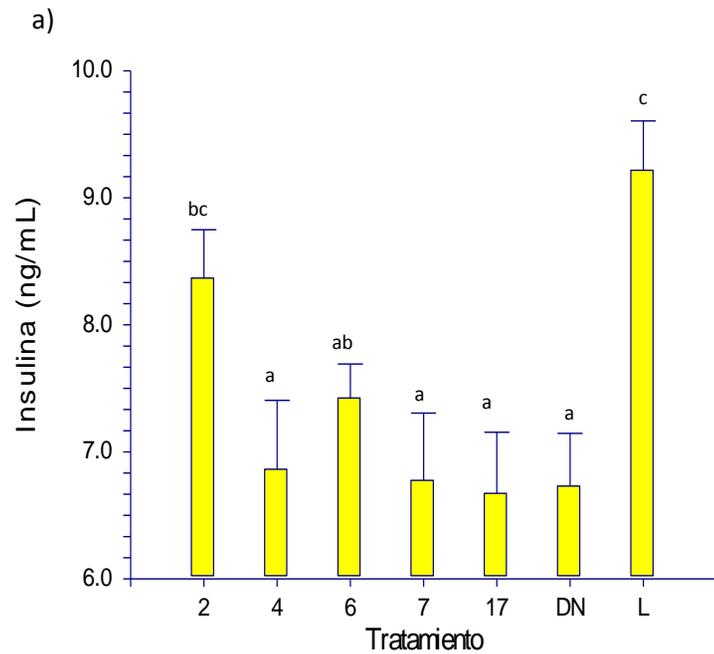


Figura 10. Niveles séricos de insulina (a) y leptina (b) en ratas después de 12 semanas de tratamiento.

17, 7, 6, 4 y 2: grupos con DIO mas leche fermentada por cepas de BAL; L: grupo con DIO mas leche sin fermentar; DN: grupo con DN mas agua. Los resultados indican el promedio \pm EE. Diferentes literales entre barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la Figura 10 se muestran los niveles séricos de insulina y leptina de las ratas bajo los diferentes tratamientos después de las 12 semanas. En el caso de la insulina, se mostraron niveles séricos significativamente ($p < 0.05$) menores al grupo control para los grupos tratados con leche fermentada por las cepas 4, 6, 7 o 17 (Figura 10a). Asimismo, estos grupos presentaron niveles de insulina iguales ($p > 0.05$) al grupo consumiendo una dieta normal (DN).

Estos resultados se han presentado de igual forma en otros estudios por el consumo de leches fermentadas. Por ejemplo, Kondo y colaboradores (2010) encontraron que después de la administración diaria de *Bifidobacterium breve* B-3 en ratones C57BL/6J con obesidad inducida con una dieta alta en grasa, resultaron con una reducción de los niveles séricos de insulina. La insulina es una de las hormonas más importantes en la regulación de la homeostasis energética, es secretada por el páncreas y controla actividades celulares clave tales como la utilización de la glucosa, la síntesis del glicógeno, triglicéridos, proteínas y leptina. Además, en humanos, los niveles circulantes de insulina y leptina son proporcionales al porcentaje de masa grasa (Kelesidis *et al.*, 2009).

En el caso de los valores séricos de leptina, estos siguieron una tendencia semejante a los niveles de insulina, aunque para esta hormona, los grupos consumiendo la leche fermentada con las cepas 4, 6, 7 o 17, no fueron diferentes ($p > 0.05$) al grupo control L (Figura 10b). Efectos similares se han encontrado en otros estudios con la administración de leches fermentadas, lo cual confirma que la reducción en la masa grasa y en el peso corporal está asociada a la reducción de los niveles séricos de leptina (Sato *et al.*, 2008, An *et al.*, 2011, Boa-Hong *et al.*, 2013).

La leptina es una hormona que se expresa principalmente en los adipocitos pero también ha sido detectada en el hipotálamo, pituitaria, placenta, músculo esquelético y el tracto gastrointestinal. Esta hormona circula en el torrente sanguíneo y juega un papel importante en la regulación de la homeostasis energética. Se ha reportado que al presentarse una elevación en la acumulación de grasa en los adipocitos, los niveles de leptina en sangre tienden a incrementarse, por ello los niveles séricos de leptina están estrechamente relacionados al porcentaje de grasa corporal (Santacruz, 2012).

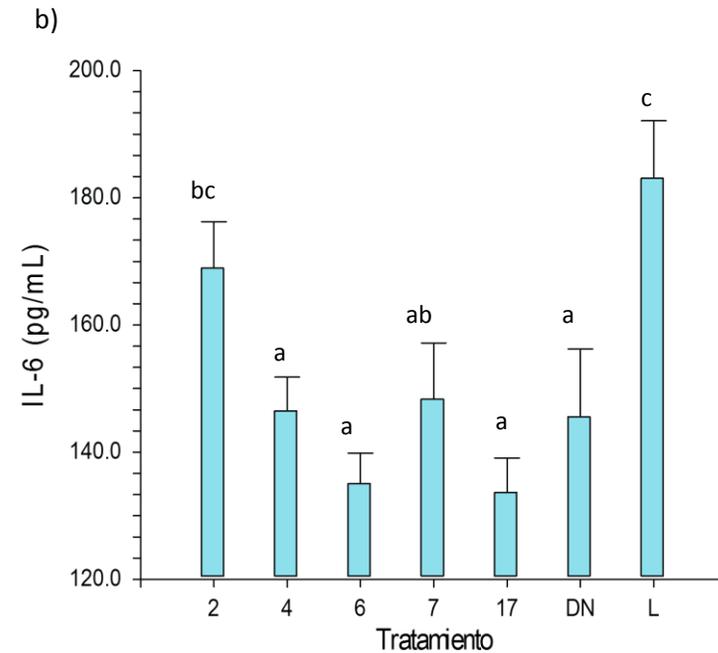
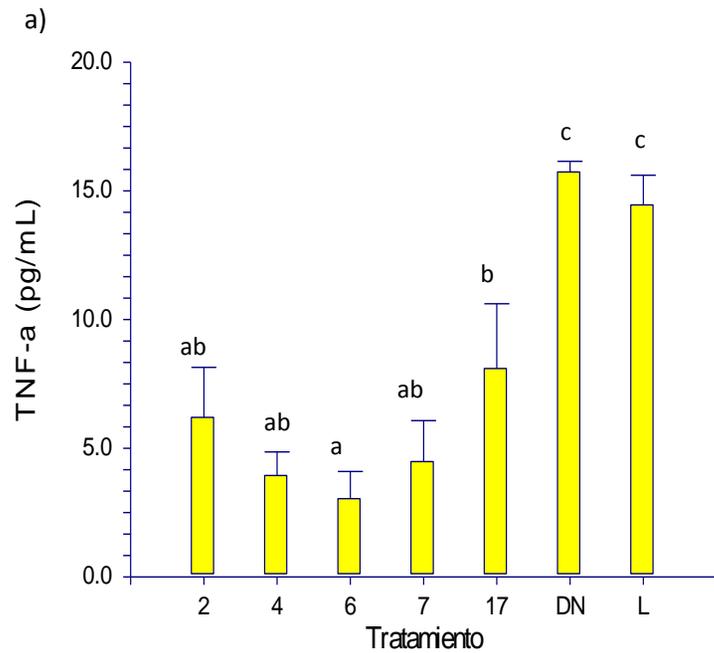


Figura 11. Niveles séricos de citocinas TNF- a (A) y IL-6 (B) en ratas después de 12 semanas de tratamiento.

17, 7, 6, 4 y 2: grupos con DIO mas leche fermentada por cepas de BAL; L: grupo con DIO mas leche sin fermentar; DN: grupo con DN mas agua. Los resultados indican el promedio \pm EE. Diferentes literales entre barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la Figura 11 se muestran los niveles séricos de citocinas TNF- a (a) e IL-6 (b) de las ratas después de las 12 semanas de tratamiento. Los niveles séricos de TNF-a, de los grupos administrados con leches fermentadas fueron significativamente ($p < 0.05$) menores al grupo control (L) y al grupo con la dieta normal (DN). Por otro lado, los grupos administrados con leches fermentadas por las cepas 4, 6, 7 o 17, mostraron niveles séricos de IL6 significativamente ($p < 0.05$) menores al grupo control (L) y no fueron diferentes a los niveles del grupo en la dieta normal (DN). Las citocinas TNF-a (a) e IL-6 (b), son moléculas segregadas por los adipocitos. Estos son células endocrinas muy activas que segregan numerosas proteínas y péptidos bioactivos conocidos como adipocinas, las cuales actúan a nivel local y sistémico, por lo que el tejido adiposo es considerado un verdadero órgano endocrino. Se ha reportado que la IL-6 tiene una función muy importante en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos y su nivel en sangre está relacionado positivamente con el IMC y la masa grasa corporal total por lo que niveles altos de IL-6 están asociados a un estado proinflamatorio (Kelesidis *et al.*, 2009).

Existen algunas cepas de bacterias ácido lácticas probióticas que presentan la capacidad de atenuar las rutas inflamatorias reduciendo la síntesis de citocinas pro inflamatorias como TNF-a e IL-6, disminuyendo así, la endotoxemia en plasma o tejido adiposo (Ma *et al.*, 2008). Por lo tanto, puede influir en la inflamación crónica de bajo grado relacionada a la obesidad. En el presente estudio se observó que los niveles de ambas citocinas pro inflamatorias se vieron reducidas en comparación al grupo control (L) después de la administración diaria de leches fermentadas por *Lactobacillus*, lo cual sugiere que hubo una disminución endotoxémica. Finalmente, la disminución de las citocinas proinflamatorias, la reducción de ganancia en peso corporal y masa

grasa, estuvo asociada con el consumo de leches fermentadas con las cepas 4, 6, o 17. Sin embargo, la leche fermentada con la cepa 4 resultó en un nivel de triglicéridos significativamente ($p < 0.05$) más alto que el grupo control. Por lo anterior, las leches fermentadas con las cepas 6 y 17 fueron las que resultaron en una menor ganancia en peso corporal y masa grasa, y un mejor perfil bioquímico en suero sanguíneo con una reducción en el estado de inflamación.

7. CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que las ratas con obesidad inducida y tratadas con leches fermentadas por cepas específicas de *Lactobacillus* presentaron menor ganancia en peso y masa grasa que el grupo control. Además, el consumo diario de leches fermentadas con las cepas 6 o 17 mostraron un mayor efecto antiobesogénico, hipocolesterolémico y antiinflamatorio que la leche sin fermentar. Aunque actualmente se han propuesto diferentes mecanismos por medio de los cuales el consumo de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas probióticas específicas podrían ejercer el efecto antiobesogénico, aún se desconoce exactamente el o los mecanismos asociados. Algunos de las rutas reportadas están relacionados con la supresión del apetito por péptidos inductores de saciedad, a la producción de ácido linoleico conjugado y a la modificación de la termogénesis y absorción de lípidos por la modificación de la microbiota intestinal. Por lo anterior, es necesario realizar investigación que conduzca a descifrar los mecanismos involucrados.

8. REFERENCIAS

- American Diabetes Association (ADA) (2005). Diagnosis and classification of Diabetes mellitus (Position Statement). *Diabetes Care* 28 (Suppl. 1): S37-S42.
- Amigo-Vázquez, I., Busto Zapico, R., Fernández Rodríguez, C., 2007. La obesidad infantil como resultado de un estilo de vida obesogénico. *Endocrinología y Nutrición* 54, 530-534.
- An H. M., Park S.Y., Lee D.K., Kim J.R., Cha M.K., Lee S.W., Lim H.T., Kim K.J., and Ha N.J., 2011. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, 10:116.
- Andrés, M.C., Jódar, J.G., Font, T.P., Casado, E.B., Collado, J.T.R., Calvo, R.I.L., Valls, J.F.M., 2009. Estudio de las relaciones entre inflamación y resistencia a la insulina en la obesidad. *Revista Española de Obesidad*.
- A.O.A.C., 1998. "Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemistry", 15th Ed., Association of Official Analytical Chemistry. D.C., USA.
- Arribas, B., Rodriguez, M., Camuesco, D., Zarzuelo, A., Gálvez, J., 2008. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharmaceutica* 49, 26.

- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V., 2011. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological research: Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 63, 366-376.
- Azcona, C., Delgado, M., Garcia-Fuentes, M., Collado, M.C., Sanz, Y., Group, E.S., 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 17, 1906-1915.
- Bäckhed F, Manchester J, Semenkovich C. F, Gordon J.I., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 16;104(3):979-84.
- Bäckhed and Crawford, 2010. Coordinated regulation of the metabolome and lipidome at the host-microbial interface. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801: 240–245.
- Bao-Hong L., Yi-Hsuan L., Tzu-Ming P., 2013. Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *Journal of Functional Foods* 5. 905 –9 13.
- Barceló-Acosta, M., Borroto-Díaz, G., 2001. Estilo de vida: factor culminante en la aparición y el tratamiento de la obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 20, 287-295.
- Bogsan, C.S.B., Florence, A.C.R., Perina, N., Barbuti, R.C., Navarro-Rodriguez, T., Eisig, J.N., Oliveira, M.N., 2011. Probiotics intake and metabolic

syndrome: A proposal. Trends in Food Science and Technology 22, 457-464.

Bouchard, C., Rankinen, T., 2008. Exciting advances and new opportunities. Obesity: Genomics and Postgenomics. New York: Informa Healthcare, 549-562.

Cani P. D., Neyrinck A. M., Fava F., Knauf C., Burcelin R. G., Tuohy K. M., Gibson G. R., Delzenne N. M. 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. Diabetes 50:2374–2383.

Cani PD., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes 57:1470-81

Cani P.D., Delzenne, N.M., 2009. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. Current Opinion in Pharmacology 9, 737-743.

Carmuega, E., 2004 Los Beneficios de la leche para la dieta del ser humano. 8to. Congreso Panamericano de Lechería, Miami-USA.

Chung-Yi W., She-Ching W., Chang-Chai N., Yuan-Tay S., 2010. Effect of *Lactobacillus*-fermented adlay-based milk on lipid metabolism of

- hamsters fed cholesterol-enriched diet. *Food Research International* 43: 819–824.
- Corsica, J.A., Hood, M.M., 2011. Eating disorders in an obesogenic environment. *Journal of the American Dietetic Association* 111, 996-1000.
- De La Torre, A., D. Gruffat, *et al.* 2006. Factors influencing proportion and composition of CLA in beef. *Meat Science* 73: 258-268
- DeLany, J.P., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.A., West, D.B., 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 276, R1172-R1179.
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M., Cani, P.D., 2011. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microbial cell factories* 10 Suppl 1, 10.
- DiBaise, J.K., Zhang, H., Crowell, M.D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G.A., Rittmann, B.E., 2008. Gut microbiota and its possible relationship with obesity, in: C.R. Parrish (Ed.). *Mayo Clinic*, 83, 460-469.
- Do-Young P., Young-Tae A., Se-Hoon P., Chul-Sung H., Sae-Rom Y., Rina Y., Mi-Kyung S., Robin A., Myung-Sook C., 2013. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLOS ONE*. 8(3): e59470.

- Eckburg P. B, Bik E. M, Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L, Sargent M., Gill S. R, Nelson K. E., Relman D. A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *NIH-PA*. 10; 308(5728): 1635–1638.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Fariás, M.M., Silva, C., Rozowski, J. 2011a. Gut microbiota: role in obesity. *Revista Chilena de Nutrición*. 38(2): 228-233.
- Fariás, M.M., Cuevas, A.M., Rodriguez, F. 2011b. Set-point theory and obesity. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 9:85-9.
- Farley C., Cook J.A., Spar B.D., Austin T. M., Kowalski T. J., 2003. Meal Pattern Analysis of Diet-Induced Obesity in Susceptible and Resistant Rats. *Obesity Research* 11 (7) 845
- François T., Jan-Hendrik H., Etienne R., Mirjam C.,Gurvan M., 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. 2:93,16.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology* 66, 365-378.
- Gibson, G.R., 2007. Functional foods: probiotics and prebiotics. *Culture* 28, 1-3.
- Gómez Jiménez, J., Ramón-Pardo, P., Rúa Moncada, C., 2008. Manual para la implementación de un sistema de triaje para los cuartos de urgencias. Washington, DC. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. OPS/OMS.

- González Correa C.A. y González Correa C. H., 2009. Globesidad y su posible componente infeccioso. *Biosalud* 8: 132-142.
- González-Córdova AF, Torres-Llenez MJ, Rodríguez-Figueroa JC, Espinosa-de-los-Monteros JJ, Garcia HS, Vallejo-Córdoba B. 2011. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. *Journal of Food*. 9:146–151.
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J.d.A.F., Shah, N.P., 2010. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 455-470.
- Hamad E. M, Sato M, Uzu K, Yoshida T, Higashi S, Kawakami H, Kadooka Y, Matsuyama Abd El-Gawad I. A., 2009. Imaizumi K. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *British Journal of Nutrition*. 101: 716–724.
- Hyang Mi An, Shin Young Park, *et al.* 2011. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease* 10: 116.
- Hylckama V.J., Veiga P., Zhang C., Derrien M., LipingZhao., 2011. Impact of microbial transformation of food on health—from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology* 22:1–9.

- Jensen., R., Kroger., M., 2000. The Importance of Milk and Milk Products in the Diet, in: P.D. Gregory D. Miller, F.A.C.N., M.S. Judith K. Jarvis, R.D., L.D., M.S. Lois D. McBean, R.D. (Eds.), Handbook of Dairy Foods and Nutrition., Second ed, 17 - 21.
- Ji Y.S., Kim H.N., Park H.J., Lee J.E., Yeo S.Y., Yang J.S., Park S.Y., Yoon H.S., Cho G.S., Franz C.M.A.P., Bomba A., Shin H.K. and Holzapfel W.H. 2012. Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. *Beneficial Microbes*, 3(1): 13-22
- Kadooka, Y., Ogawa, A., Ikuyama, K., Sato, M., 2011. The probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits enlargement of visceral adipocytes and upregulation of serum soluble adhesion molecule (sICAM-1) in rats. *International Dairy Journal* 21, 623-627.
- Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M., Tsuchida, T., 2010. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 64, 636-643.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews* 26, 439-451.
- Katiyar D, Singh B, Lall A, Haldar C. 2011. Efficacy of chitoooligosaccharides for the management of diabetes in alloxan induced mice: A correlative

study with antihyperlipidemic and antioxidative activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, 534–543

Kelesidis T., Kelesidis I, Mantzoros C.S., 2009. Nutrition and Health: Nutrition and Metabolism. Mantzoros (Ed.), Humana Press, a part of Springer Science, pp 47- 54.

Kondo, S., Xiao, J.-z., Satoh, T., Odamaki, T., Takahashi, S., Sugahara, H., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Kamei, A., Abe, K., 2010. Antiobesity Effects of *Bifidobacterium breve* Strain B-3 Supplementation in a Mouse Model with High-Fat Diet-Induced Obesity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 1656-1661.

Kondoh T., Torii K, 2008. MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague–Dawley rats. *Physiology & Behavior* xxx-xxx.

Lakdawalla, D., Philipson, T., 2002. The growth of obesity and technological change: a theoretical and empirical examination. *National Bureau of Economic Research*.11, 43.

Lannitti, T., Palmieri, B., 2010. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition* 29, 701-725.

Laparra, J.M., Sanz, Y., 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 61, 219-225.

Ley R. E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J. I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 444: 1022-1023.

- Ley, R.E., 2010. Obesity and the human microbiome. *Current opinion in gastroenterology* 26, 5-11.
- Luhovyy, B.L., Akhavan, T., Anderson, G.H., 2007. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition* 26, 704S-712S.
- Lye H.S., Kuan C.Y., Ewe J.A., Fung W.Y., Liong M.T., 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3755-3775.
- Ma X., Hua J., Li Z. 2008. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol.* 49: 821-830
- Marcos-Gómez, B., Bustos, M., Prieto, J., Martínez, J., Moreno-Aliaga, M., 2008. Obesidad, inflamación e insulino-resistencia: papel de los ligandos del receptor gp 130 Obesity, inflammation and insulin resistance: role of gp 130 receptor ligands. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 31, 113-123.
- Marik P.E., 2012. Colonic flora, probiotics, obesity and diabetes. *Frontiers in Endocrinology.* 3,87, 1-6.
- Marth E., James S., 2001. *Microorganismos Gram Positivos. Applied Dairy Microbiology.* New York 0-8247, 138.

- Martinez Castañeda A.T., Ramitrez Sotelo M.G., Piña Guzman B., 2011. Wereke: Un tratamiento natural para la diabetes. InFARMAte 7(27). 7-15.
- Mattes R.D., 2005. Fat taste and lipid metabolism in humans. Physiology and behavior 86, 691-697.
- Mayer M.A., Hocht C., Puyó A., Taira C.A., 2009. Recent advances in obesity pharmacotherapy. Current Clinical Pharmacology 4, 53-61.
- Mikkelsen T.L., Rasmussen E., Olsen A., Barkholt V., Frøkiær H., 2006. Immunogenicity of [kappa]-Casein and Glycomacropeptide. Journal of Dairy Science 89, 824-830.
- Morales P., Brignardello J., Gotteland M., 2010. La microbiota intestinal: Un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. Revista Médica de Chile 138, 1020-1027.
- Mourao D., Bressan J., Campbell W., Mattes R., 2007. Effects of food form on appetite and energy intake in lean and obese young adults. International Journal of Obesity 31, 1688-1695.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- O'Hara A.M., Shanahan F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Reports 7, 688-693.

- Organización mundial de la salud (OMS), 2004. Medidas de la OMS contra la obesidad infantil. Revisada Julio 2012. http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_WHOs_actions/es/
- Palomer X., Pérez A., Blanco-Vaca F., 2005. Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Medicina Clinica* 124, 388-395.
- Pilvi T.K., Harala S., Korpela R., Mervaala E.M., 2010. Effects of high-calcium diets with different whey proteins on weight loss and weight regain in high-fat-fed C57BL/6J mice. *British Journal of Nutrition* 102, 337.
- Pilvi T.K., Korpela R., Huttunen M., Vapaatalo H., Mervaala E.M., 2007. High-calcium diet with whey protein attenuates body-weight gain in high-fat-fed C57Bl/6J mice. *British Journal of Nutrition* 98, 900-907.
- Quigley E.M., 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological research: Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 61, 213-218.
- Requena P., González R., López-Posadas R., Abadía-Molina A., Suárez M.D., Zarzuelo A., de Medina F.S., Martínez-Augustin O., 2010. The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochemical pharmacology* 79, 1797-1804.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., A. F. González-Córdoba, H. Astiazarán-García, B. Vallejo-Cordoba. 2012. Hypotensive and heart rate-lowering effects in

rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. British Journal of Nutrition 109 (05): 827-833.

Rodríguez-Figueroa, J. C., A. F. González-Córdoba, H. Astiazarán-García, B. Vallejo-Cordoba. 2013. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. British Journal of Nutrition. 96 :4094–4099.

Rodríguez-Rodríguez E., Anta R.M.O., 2010. Papel de la ingesta de calcio y vitamina D en la composición y la regulación del peso corporal. Alimentación Nutrición y Salud 17.

Santacruz López Y. A. Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia (Valencia España) 2012.

Santacruz A., Marcos A., Warnberg J., Marti A., Martin-Matillas M., Campoy C., Moreno L.A., Veiga, O., Redondo-Figuero C., Garagorri J.M., Azcona C., Delgado M., Garcia-Fuentes M., Collado M.C., Sanz Y., Group E.S., 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. Obesity 17, 1906-1915.

Santiago-López L. Estudio potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de queso Cocido artesanal del estado de Sonora. Tesis para obtener el grado de ingeniero Agroindustrial. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Hermosillo, Sonora, 2011

- Sanz Y., Santacruz A., Dalmau J. 2009. Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y las alteraciones del metabolismo. *Acta Pediatr Esp.* 67: 437-442.
- Sato M., Uzu K., Yoshida T., Hamad E.M., Kawakami H., Matsuyama H., Abd El-Gawad I.A., Imaizumi K., 2008. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *British Journal of Nutrition* 99, 1013-1017
- Secretaría de salud., 2012. Obesidad. Revisada Agosto 2012, http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?searchword=obesidad&option=com_search&Itemid=
- Sisk, M.B., Hausman, D.B., Martin, R.J., Azain, M.J., 2001. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *The Journal of Nutrition* 131, 1668-1674.
- Tanida M., Shen J., Maeda K., Horii Y, Yamano T., Fukushima Y., Nagai Y., 2008. High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. *Obesity Research & Clinical Practice.* 2, 159–169
- Tulika A., Satvinder S., Raj K. S., 2013 Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* 29: 591–596
- Takemura N., Okubo T., Sonoyama K. 2010. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Experimental Biology and Medicine* 235:849-856.

- Tejeda-López M.F, Ramírez-Ley K., Bacardí-Gascón M., Jiménez-Cruz A., 2009 Efecto del calcio sobre la pérdida de peso. *Nutrición Hospitalaria*, 24(3):364-367
- Torres-Llanaez M.J., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A.F., 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55, 15.
- Turnbaugh P. J, Backhed F., Fulton L., Gordon J. I., 2008. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe*. 3, 213–223.
- Van Baarlen P., Troost F. J., Van Hemert S., van der Meera, C., de Vose W. M., Groota,g P. J., Hooivelda J. E. J., Brummera R-J M., Kleerebezema M. 2008. Differential NF- κ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *PNAS*. 106: 2371-2376.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E., Gewirtz, A.T. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science*. 328(5975): 228-231.
- Wolowczuk I., Verwaerde C., Viltart O., Delanoye A., Delacre M., Pot B., Grangette C., 2008. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clinical and Developmental Immunology* 2008, 19.
- Xie N, Cui Y, Ya-Ni Y, Zhao X, Jun-Wen Y, Zheng-Gen W, Fu N, Tang Y, Xue-Hong W, Xiao-Wei L, Chun-Lian W, Fang-Gen L. 2011. Effects of two

Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *Complementary and Alternative Medicine*. 53:1472-6882.

Yun J.W., 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review. *Phytochemistry* 71, 1625-1641.

Zhu Y., Luo T. M., Jobin C., Young H. A., (2011). Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Letters* 309: 119–127.