



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

**EFFECTO HIPOGLUCEMIANTE ASOCIADO A LA
ADMINISTRACIÓN DE LECHE FERMENTADA POR
CEPAS ESPECÍFICAS DE *Lactobacillus* EN UN
MODELO MURINO**

Por:

Sinaí Ojeda Villa

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

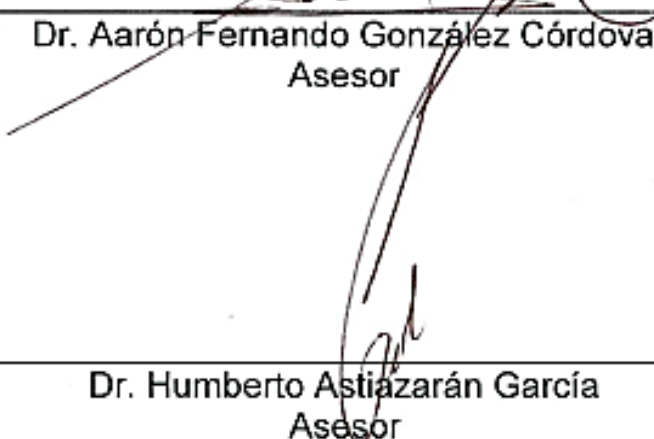
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Sinái Ojeda Villa, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestra en ciencias.



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 dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director 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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mi estancia en el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por permitirme realizar mis estudios de posgrado que me formaron como Maestra en Ciencias.

A la Dra. Belinda Vallejo que me dio la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos, me recibió como su alumna y fue pilar de mi formación y paso en CIAD. Al Dr. Aarón González por su apoyo y enseñanzas durante mi estancia estos dos años y medio. Al Dr. Adrián Hernández por tener ese acercamiento especial para con nosotros los estudiantes, y estar al pendiente de nosotros y el laboratorio.

A la Dra. Belinda Vallejo, Dr. Aarón González, Dr. Adrián Hernández y Dr. Humberto Astiazarán por aportar sus conocimientos y su apoyo para la realización de este proyecto, así como las instalaciones y recursos necesarios.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos, a M.C. Carmen Estrada, M.C. Ricardo Reyes, Dr. Miguel Mazorra, Dra. María de Jesús Torres y Faly por su apoyo y consejos.

A Olga, que me recibió como compañera y alumna durante toda esta aventura que fue el desarrollo de mi tesis. Por siempre estar al pendiente de mí, por sus enseñanzas y por ser una guía y ejemplo durante todo este proyecto. Te agradezco que me llevaras de la mano durante cada etapa, me aguantaras mis locuras, me escucharas durante mis momentos de frustración y sobre todo por siempre tener un consejo para mí. Gracias por tu amistad y por hacerme formar parte de tu vida y verte crecer en otras facetas de tu vida. De igual manera le agradezco a Francisco por su gran apoyo y ayuda para nosotras dos, por formar parte de este proyecto y ayudarnos a su realización.

A mis compañeros: Aline, Lulú, Alejandro, Eleazar, Lilia, Isidro, Carmen, Karen y Glen. De igual manera para Chistian, Daniel, Fausto, Trinidad, Isaac y Erick; porque cada uno formo parte de mi experiencia en la maestría, me apoyaron y ayudaron durante la realización de mi tesis. A Tanya y Karmina que aportaron un “extra” enorme a esta experiencia y porque la distancia no ha sido motivo de lejanía entre nosotras.

A esas personas tan especiales que compartieron esta experiencia de la maestría conmigo, Rox, Dey, Fer, Agustín, Lupita, Ramón, Caro y Patty. Por esa convivencia y amistad, por su ayuda y cariño durante este tiempo.

A Elena, que yo no sé qué habría sido de mi sin ti estos dos años amiga. Gracias por esas pláticas interminables llenas de apoyo mutuo y comprensión. A Ana Karenth, Cynthia, Valeria, Bethel, Karla, Xochitl y Adán; cada uno aportó su granito de arena para ayudarme a seguir y salir adelante con este proyecto. Un sincero agradecimiento con mucho cariño.

A mis padres, Eva Angelina y Carlos, que son la fuerza y el motivo que me impulsa a salir adelante, confían en mí y me han apoyado en cada reto que he afrontado durante mi vida.

A mis hermanos Jesús Abraham y Salma, por su apoyo durante este tiempo y durante mi vida.

A la familia Jaime Cruz por su interés, apoyo y ánimos durante todo este tiempo. Gracias por su cariño.

A Juan Carlos, nadie más que tú me ha apoyado durante tanto tiempo. Por tu confianza en mí y por toda la ayuda que me has brindado. Por acompañarme e incentivar me a alcanzar todas mis metas. Gracias por hacer todo esto con tanto amor.

A Dios, porque sin el nada de lo anteriormente mencionado hubiera sido posible, por brindarme la capacidad y oportunidad de ser quien soy y quien quiero ser.

DEDICATORIA

A mis padres, los amo mucho

*A mis hermanos Jesús Abraham y Salma
y la nueva luz en mi vida: Danna Victoria*

A Juan Carlos

A las ratitas que hicieron posible este estudio

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Diabetes Tipo 1 (DT1).....	4
II.2. Diabetes Tipo 2 (DT2).....	5
II.3. Estrés Oxidativo en Diabetes Mellitus.....	6
II.4. Alimentos Funcionales.....	7
II.5. Leches Fermentadas con Bacterias Ácido Lácticas.....	8
II.5.1. Efecto Hipoglucémico de Bacterias Ácido Lácticas Probióticas.....	10
II.6. Otros Componentes de la Leche con Efecto Hipoglucemiante.....	14
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS	17
V.1. Selección de Bacterias.....	17
V.2. Preparación de Leches Fermentadas.....	17
V.3. Experimento <i>in vivo</i>	18
V.3.1. Tamaño de Muestra.....	18
V.3.2. Modelos para DT1 y DT2.....	19
V.4. Valoración de Niveles Séricos de HbA1c, Insulina y Lípidos.....	26
V.4.1. HbA1c.....	26
V.4.2. Insulina.....	26
V.4.3. Colesterol Total y HDL.....	27
V.4.4. Triglicéridos.....	27
V.5. Evaluación de Parámetros de Estrés Oxidativo.....	27
V.5.1. Cuantificación de la Capacidad Antioxidante Plasmática (ABTS).....	27

CONTENIDO (Continuación)

V.5.2. Peroxidación de Lípidos (MDA).....	28
V.6. Análisis Estadístico.....	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	29
VI.1. Modelo de DT1.....	29
VI.1.1. Inducción Química de DM.....	29
VI.1.2. Evaluación de Glucosa durante el Tratamiento.....	32
VI.1.3. Evaluación de Peso Corporal.....	32
VI.1.4. Evaluación del Consumo de Alimento	35
VI.1.5. Evaluación del Consumo de Agua	35
VI.1.6. Prueba de Tolerancia a la Glucosa.....	38
VI.1.7. HbA1c e Insulina en Plasma.....	38
VI.1.8. Lípidos en plasma.....	41
VI.1.9. Antioxidantes (Trolox) en Plasma.....	43
VI.1.10. MDA en Plasma.....	43
VI.2. Modelo de DT2.....	47
VI.2.1. Evaluación de Glucosa durante el Tratamiento.....	47
VI.2.2. Evaluación de Peso Corporal.....	47
VI.2.3. Evaluación del Consumo de Alimento.....	50
VI.2.4. Evaluación del Consumo de Agua	52
VI.2.5. Prueba de Tolerancia a la Glucosa.....	52
VI.2.6. HbA1c e Insulina en Plasma.....	55
VI.2.7. Lípidos en Plasma.....	57
VI.2.8. Antioxidantes (Trolox) en Plasma.....	59
VI.2.9. MDA en Plasma.....	59
VII. CONCLUSIONES.....	63
VIII. REFERENCIAS.....	64

LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
1. Inyección intraperitoneal.....	20
2. Alimentación por vía orofaríngea.....	25
3. Niveles de glucosa en sangre durante la inducción de DT1 mediante IP de STZ.....	30
4. Molécula de STZ y glucosa.....	31
5. Niveles de glucosa en sangre del modelo de DT1 durante tratamiento.....	33
6. Peso de los grupos del modelo de DT1 durante el tratamiento.....	34
7. Consumo de alimento de los grupos en tratamiento del modelo de DT1.....	36
8. Consumo de agua de los grupos en tratamiento del modelo de DT1..	37
9. Prueba de tolerancia a la glucosa en los grupos de DT1 al final del tratamiento.....	39
10. Antioxidantes totales en plasma de los grupos del modelo DT1.....	44
11. MDA en plasma de los grupos del modelo DT1.....	45
12. Niveles de glucosa en sangre del modelo de DT2 durante el tratamiento.....	48
13. Peso de los grupos del modelo de DT2 durante el tratamiento.....	49
14. Consumo de alimento de los grupos en tratamiento del modelo de DT2.....	51
15. Consumo de agua con fructosa de los grupos en tratamiento del modelo de DT2.....	53
16. Prueba de tolerancia a la glucosa en los grupos de DT1 al final del tratamiento.....	54
17. Antioxidantes totales en plasma de los grupos del modelo DT2.....	60
18. MDA en plasma de los grupos del modelo DT2.....	61

LISTADO DE TABLAS

Tabla	Página
1. Probióticos con efecto hipoglucémico en modelos murinos.....	11
2. Tiempos de monitoreo de glucosa en sangre durante la inducción de DT1.....	21
3. Tratamientos en el modelo murino con DT1.....	22
4. Tratamientos en el modelo murino con DT2.....	23
5. Niveles plasmáticos de HbA1c e insulina de los grupos del modelo DT1	40
6. Niveles plasmáticos de lípidos de los grupos del modelo DT1.....	42
7. Niveles plasmáticos de HbA1c e insulina de los grupos del modelo DT2	56
8. Niveles plasmáticos de lípidos de los grupos del modelo DT2.....	58

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno crónico caracterizado por la alteración del metabolismo de la glucosa y los lípidos debido a un defecto en la secreción o acción de la insulina. La DM es un problema de salud pública y es de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Aunque la administración de fármacos es la primera opción para el control de la enfermedad, se ha demostrado que la administración de cepas específicas de bacterias ácido lácticas probióticas tiene un efecto hipoglucemiante e hipolipemiante. Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto hipoglucemiante de la administración de leches fermentadas por cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* (LP24 y LP35) en un modelo murino. Se evaluó el efecto de la administración de las leches fermentadas sobre los niveles de glucosa, HbA1c, insulina y perfil de lípidos en plasma de ratas Wistar con diabetes tipo 1 (DT1) inducida por la administración de estreptozotocina y en ratas con diabetes tipo 2 (DT2) inducida por la administración de una solución con alta fructosa. Además, se evaluó el efecto en la capacidad antioxidante total plasmática y la peroxidación de lípidos. Los resultados mostraron que los grupos con DT1 tuvieron una elevación drástica en los niveles de glucosa después de la inducción de DM. Sin embargo, el efecto hipoglucemiante del tratamiento con leche fermentada LP24 fue demostrado, ya que presentó los niveles más bajos de HbA1c ($p < 0.05$). Además, disminuyó los niveles de C-LDL y la peroxidación de lípidos, y aumentó los niveles de C-HDL con respecto al grupo testigo sano ($p < 0.05$). El modelo de DT2 presentó un aumento en los niveles de glucosa en sangre para los grupos con dieta alta en fructosa, con respecto al grupo testigo sano ($p < 0.05$). Sin embargo, estos se mantuvieron dentro de los niveles normales por lo que no se indujo un estado de DT2. El grupo que consumió la leche fermentada LP24 mostró una mejor respuesta en la prueba de tolerancia a la glucosa, sin embargo, el efecto hipoglucemiante no pudo ser confirmado en este modelo (DT2). En este estudio se mostró que la administración de leche fermentada por LP24 presentó un efecto hipoglucemiante e hipolipemiante en un

modelo de DT1. Estos efectos podrían ser atribuibles a una mejora de la absorción de la glucosa por implantación de los *Lactobacillus* en el intestino. Sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan establecer los mecanismos operantes.

Palabras clave: diabetes, hipoglucemiante, *Lactobacillus*

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disorder characterized by impaired metabolism of glucose and lipids due to a defect in the secretion or action of insulin. The DM is a public health problem and a major cause of mortality and morbidity worldwide. Although administration of drugs is the first choice for disease control, it has been shown that administration of specific strains of probiotic lactic acid bacteria has a hypoglycemic and hypolipidemic effect. Therefore, this study aimed to evaluate the hypoglycemic effect of the administration of milk fermented by specific strains of *Lactobacillus plantarum* (LP24 and LP35) in a murine model. The effect of the administration of fermented milk on the levels of glucose, HbA1c, insulin and lipid profile in plasma of Wistar rats with type 1 diabetes (T1D) induced by the administration of streptozotocin and with type 2 diabetes (T2D) induced by the administration of a high fructose solution was studied. Furthermore, the effect on total plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation was evaluated. The results showed that the groups with T1D had a drastic rise in glucose levels after induction of DM. However, the hypoglycemic effect of the group treated with fermented milk LP24 was demonstrated, since it presented the lowest levels of HbA1c ($p < 0.05$). In addition, decreased LDL-C levels and lipid peroxidation, and increased HDL-C levels compared to the healthy control group ($p < 0.05$) were shown. T2D model showed an increase in blood glucose levels for the groups with the high fructose diet, compared to the healthy control group ($p < 0.05$). However, it remained within normal levels, so that a diabetic T2D state was not induced. The group consuming the fermented milk LP24 showed a better response in the glucose tolerance test, however, the hypoglycemic effect could not be confirmed in this model (T2D). This study showed that the administration of milk fermented by LP24 presented a hypoglycemic and hypolipidemic affect in a model of T1D. These effects may be attributable to an improvement in glucose uptake by implantation of *Lactobacillus* in the gut. However, more studies are necessary to establish the operative mechanisms.

Keywords: diabetes, hypoglycemic, *Lactobacillus*.

I. INTRODUCCIÓN

Enfermedades como la diabetes mellitus (DM) tienen gran impacto a nivel mundial. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, 371 millones de personas padecían diabetes mellitus durante el año de 2012 (Banerjee y Vats, 2014). La DM es un problema de salud pública y es de las principales causas de mortalidad y morbilidad (Bejar y col., 2013; Punaro y col., 2014). La DM es un trastorno crónico caracterizado por la alteración del metabolismo de la glucosa y los lípidos, debido a un defecto en la secreción de insulina o su acción (Banerjee y Vats, 2014). La DM se caracteriza por anormalidades en los niveles séricos de glucosa debido a fallas en el metabolismo de las células β formadas en el páncreas y la resistencia a la insulina (RI).

En el desarrollo de la DM, se ha buscado explicar las reacciones que se producen durante el curso de esta enfermedad y el estrés oxidativo, para de esta manera asociar los padecimientos que conducen a la RI, la disfunción de las células β y la tolerancia a la glucosa en diabetes mellitus tipo 2 (Banerjee y Vats, 2014). Con el estudio de estos factores se busca encontrar coadyuvantes que aminoren los efectos de esta enfermedad, de una manera más natural y de conveniencia al consumidor.

Existe evidencia científica que muestra que las leches fermentadas por cepas probióticas específicas han mostrado tener efecto hipoglucémico. En el laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) se aislaron, identificaron y caracterizaron cepas de *Lactobacillus plantarum* potencialmente probióticas

(Heredia-Castro, 2011; Méndez-Romero, 2011; Santiago-López, 2011). Además en un estudio con ratas Sprague Dawley administradas con leche fermentada con dichas cepas y una dieta alta en grasa, estas presentaron una ganancia en peso significativamente menor ($p < 0.05$) que el grupo control (Ramírez-Valdez, 2013). También se demostró que los niveles séricos de insulina y citosinas proinflamatorias en los grupos tratados con leches fermentadas fueron significativamente ($p < 0.05$) menores que el grupo testigo. Por ello, esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto hipoglucemiante tras la administración de leches fermentadas por estas cepas de *Lactobacillus plantarum* en un modelo murino (Ramírez-Valdez, 2013).

II. ANTECEDENTES

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno crónico caracterizado por la alteración del metabolismo de la glucosa y los lípidos debido a un defecto en la secreción de insulina (disfunción de células β) o su acción (resistencia a la insulina) (Banerjee y Vats 2014). La insulina es una hormona producida por las células β de los islotes del páncreas, la cual estimula la captación, utilización y almacenamiento de glucosa, aminoácidos y proteínas e impide la degradación de glucógeno, grasa y proteína. Las células β sintetizan la insulina a partir de una cadena de 110 aminoácidos llamada proinsulina, la cual se transporta al aparato de Golgi donde se almacena, y se transforma a insulina, almacenándose en la célula β . La glucosa transportada al interior de la célula β y su posterior metabolismo a glucosa-6-fosfato, es el principal estímulo que libera a la insulina. (Mendoza, 2008).

Varios procesos patogénicos están envueltos en el desarrollo de la diabetes. Estos van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas que produce una deficiencia de insulina y da lugar a la resistencia a la insulina (RI). La base de las anormalidades en carbohidratos, grasas y el metabolismo de las proteínas en la DM es la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana. Una deficiente acción de la insulina es resultado de una inadecuada secreción de insulina y/o de una respuesta disminuida de los tejidos a la insulina en uno o más puntos en las complejas vías de acción de la hormona.

El deterioro de la secreción de insulina y los defectos en la acción de la insulina coexisten en el mismo paciente, y es frecuente que no sea claro cuál anomalía, es la causante de la hiperglucemia (American Diabetes Association, 2014).

La DM se ha convertido en un serio problema de salud pública que ha afectado a millones de individuos en todo el mundo, y representa una de las principales causas de mortalidad y morbilidad (Bejar, y col., 2013; Punaro, y col., 2014). De acuerdo a la Federación Internacional de la Diabetes, 371 millones de personas han sido reportadas con DM y la OMS predice que 439 millones de personas tendrán esta enfermedad en el año 2030 (Banerjee y Vats, 2014; Punaro, y col., 2014). En el caso de México, en el 2012 la Encuesta Nacional en Salud y Nutrición (ENSANUT) menciona que las proporciones de la población con diagnóstico previo fueron de 0.7% para adolescentes y 9.2% en adultos. La proporción de adultos con DM aumentó con el paso del tiempo ya que se había reportado que en 2006 fue de un 7% (Gutiérrez y col., 2012).

La DM puede ser diagnosticada de varias maneras, una de ellas está basada en glucosa en plasma A1c, otro es la toma de glucosa plasmática en ayunas o el valor de glucosa en plasma después de una prueba de tolerancia a la glucosa de (PTG) (American Diabetes Association, 2015).

II.1. Diabetes Tipo 1 (DT1)

La DT1 es causada por una reacción autoinmune en donde el sistema de defensa del cuerpo ataca a las células β del páncreas, las cuales son las productoras de insulina. Como resultado de lo anterior el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero generalmente se presenta en niños o adultos jóvenes. Las

personas que padecen este tipo de diabetes necesitan insulina diariamente para controlar sus niveles de glucosa en sangre.

La DT1 suele desarrollarse repentinamente y puede producir los siguientes síntomas: sed anormal y sequedad de la boca (polidipsia), micción frecuente (poliuria), falta de energía o cansancio extremo, hambre constante (polifagia), pérdida repentina de peso, heridas de cicatrización lenta, infecciones recurrentes y visión borrosa (Federación Internacional de Diabetes, 2013).

Las personas con DT1 con cuidados terapéuticos de insulina adecuados, una vigilancia constante, una dieta saludable y ejercicio regular pueden llevar una vida normal y saludable.

II.2. Diabetes Tipo 2 (DT2)

La DT2 es el tipo de diabetes más común en la población, y de manera más específica en la población adulta. En la DT2 el cuerpo si produce insulina, pero puede que no la produzca en cantidades suficientes o que el cuerpo no puede responder a sus efectos, dando lugar a una acumulación de glucosa en sangre. El tratamiento común de la DT2 se enfoca en una buena alimentación, mayor actividad física y medicación oral, sin embargo hay personas que para regular sus niveles de glucosa en sangre requieren de dosis diarias de insulina para sobrevivir.

El desarrollo de la DT2 está íntimamente ligado al estilo de vida de la persona, y hay varios factores de riesgo como la obesidad, la mala alimentación, la inactividad física, la edad avanzada, los antecedentes familiares, el grupo étnico y la alta glucosa en sangre durante el embarazo; que propician el desarrollo de la DT2 (Federación Internacional de Diabetes, 2013). Acciones

preventivas frente a estos factores de riesgo disminuyen la probabilidad de llegar a padecer de esta enfermedad.

II.3. Estrés Oxidativo en Diabetes Mellitus

Actualmente la hipótesis favorecida para explicar los padecimientos de la DM es que el estrés oxidativo (EO) conduce a la RI, la disfunción de las células β y la tolerancia a la glucosa en DT2 (Banerjee y Vats, 2014). De igual manera la DT1 está asociada con la hiperglicemia y el alto estrés oxidativo. El estrés oxidativo es causado por la acumulación de radicales libres y esto conduce al daño de múltiples tejidos, las células β del páncreas y la disfunción de varios órganos, incluyendo el hígado y el riñón (Bejar y col., 2013).

Existen varios mecanismos implicados en el incremento del EO en la DM: la autooxidación de glucosa, la glicación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes. Además, el desbalance de las especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes es un elemento importante de la RI, ya que en el EO no se estimulan adecuadamente las vías de señalización mediados por la insulina. Otro factor importante en el EO es la peroxidación lipídica, y se ha demostrado una abundancia de estos productos en sangre, los cuales afectan a las membranas celulares así como a las lipoproteínas plasmáticas. El equilibrio de los sistemas biológicos del ser humano se puede ver afectado por dichos mecanismos protagonizados por las especies reactivas de oxígeno (Hernández y col. 2011).

En el caso específico de la hiperglucemia en DT2, hay un aumento de los productos finales de glicación avanzada (PGA). Los productos de la PGA son moléculas formadas por la reacción no enzimática de azúcares reductores con grupos amino libres de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En la superficie de células como los macrófagos, células endoteliales vasculares y células del

musculo liso vascular existen receptores de PGA, y su unión con los PGA provoca respuestas prooxidantes y proinflamatorias. Se ha demostrado que estos PGA en la dieta pueden aumentar los niveles de proteína C reactiva y TNF- α en células mononucleares de pacientes con DM (Calle y Fernández, 2012).

Hoy en día se buscan alternativas terapéuticas para reducir el estrés oxidativo en la DM. Uno de los principales cambios que se deben generar es tener un óptimo control metabólico, el cual tendrá por consecuencia la disminución de la disponibilidad de las moléculas que son precursoras de los radicales libres. La respuesta de los profesionales hacia el EO en la DM ha sido enfocada hacia la terapia antioxidante. Existen estudios donde se han probado sustancias con propiedades antioxidantes como el α -tocoferol, el ácido ascórbico, los omega-3 y el aminoácido glicina entre otros, donde se han encontrado resultados favorables en la prevención de la formación de especies reactivas al oxígeno o hasta la mejora de la defensa antioxidante (Hernández y col. 2011).

II.4. Alimentos Funcionales

Debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida y con el fin de aumentar la longevidad de la población, hoy en día las personas están más conscientes de la relación existente entre la dieta y la salud. Los especialistas consideran que el lugar donde se va a desarrollar el futuro de la alimentación es, sobre todo, en la mejora de la salud a través de la prevención de ciertas enfermedades o factores de riesgo como el colesterol o la presión arterial y cuya meta sería conseguir alimentos precisos para patologías concretas.

Esto ha dado paso al desarrollo y comercialización de “alimentos funcionales”, los cuales son alimentos que además de aportar nutrientes necesarios para el adecuado funcionamiento del organismo, ofrecen beneficios a la salud (Granatto y col., 2010). De acuerdo con el International Life Science

Institute (Roberfroid, 2002), “un alimento puede ser considerado funcional si se logra demostrar científicamente que posee efectos benéficos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales, de modo tal que mejore el estado general de salud, reduzca el riesgo de alguna enfermedad o ambas cosas” (Beltrán-Barrientos, 2013).

Así mismo también se incluye dentro de la gran variedad de definiciones que “un alimento funcional puede ser un alimento natural o un alimento al cual se le ha añadido o removido algún componente o un alimento donde la naturaleza de uno o más componentes han sido modificados” (Kazeem y Davies, 2016). Un ejemplo de este tipo de alimentos modificados son los productos lácteos. En el mercado mundial de los alimentos funcionales, los productos lácteos son productos clave, y dentro de estos mismos las bebidas funcionales representan una fracción importante de este sector. Los probióticos y los prebióticos pueden encontrarse en algunos alimentos funcionales, principalmente en los productos lácteos (Rodrigues y col., 2012).

II.5. Leches Fermentadas con Bacterias Ácido Lácticas

Los efectos benéficos de alimentos con probióticos, particularmente los productos lácteos para los niños y otras poblaciones de alto riesgo, están siendo promovidos cada vez más por profesionales de la salud. Los probióticos están definidos como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico a la salud del huésped. Para utilizar probióticos en los alimentos, se debe de tener la certeza de que no solo son capaces de sobrevivir el trayecto en el tracto digestivo, sino también tener la capacidad de proliferar en el intestino. (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006).

Los efectos benéficos atribuidos a los probióticos de mayor uso hasta ahora son, como tratamiento de enfermedades infecciosas incluyendo diarrea viral o bacteriana, e inflamación de enfermedades crónicas como la colitis ulcerativa. Los mecanismos y la eficacia de los efectos de los probióticos frecuentemente depende de las interacciones con la microbiota específica del huésped o con las células inmunocompetentes de la mucosa intestinal (Saad y col., 2013). Algunos efectos se han relacionado con el consumo de leches fermentadas probióticas, incluyendo la modulación del sistema inmune, reducción de la intolerancia a la lactosa, reducción de los niveles de colesterol, actividad antimicrobiana, antidiarreica, antimutagénica y propiedades anticarcinogénicas (Rodrigues y col., 2012).

La leche fermentada es el resultado de la acidificación de la leche a través de la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas (BAL), lo que provoca grandes cambios fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos en los productos lácteos fermentados (Casarotti y col., 2014). En los últimos años, los probióticos han sido adicionados en las leches fermentadas para satisfacer la demanda del consumidor. En el mercado de los alimentos funcionales, los productos lácteos son clave, y entre ellos las bebidas funcionales representan una fracción importante de este sector (Rodrigues y col., 2012).

En los productos que contienen probióticos, la cantidad de microorganismos que contienen es muy importante ya que está íntimamente ligada con la capacidad del efecto que ellos puedan ejercer en el huésped. Por otro lado, no sólo su efecto benéfico es de importancia para su selección en un producto, también se seleccionan por su desempeño tecnológico (estabilidad genética, tasa de crecimiento, tasa de acidificación), de manera que se promueva una mayor supervivencia y funcionalidad del mismo (Rodrigues y col., 2012). Es por ello, que los niveles o dosis recomendadas sugeridas oscilan entre 10^6 UFC/mL hasta 10^7 y 10^8 UFC/mL (Casarotti y col., 2014).

II.5.1. Efecto Hipoglucémico de Bacterias Ácido Lácticas Probióticas

El efecto hipoglucémico de cepas probióticas es objeto de estudio como un efecto benéfico hacia la salud del huésped (Tabla 1). Se ha demostrado que la administración de algunas cepas probióticas tiene una correlación positiva con los retrasos en la tolerancia a la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinemia, dislipemia y el estrés oxidativo. Aunado a lo anterior se ha demostrado que aumenta la secreción de moléculas antiinflamatorias que protegen a las células β en la DT1 (Bejar y col., 2013).

Tabla 1. Probióticos con efecto hipoglucémico en modelos murinos.

Cepa	Vehículo de Administración	Dosis/duración	Modelo	Inducción de DM	Resultados	Referencia
<i>Lactobacillus</i> GG	Dieta normal adicionada con 2% de liofilizado	2% de células liofilizadas 9 semanas	Machos Wistar, 8 semanas de edad	IP de STZ a los 2 días de nacidos, (60 mg/Kg)	HbA1c igual entre los grupos DM-T (3.1±0.1) y normal (3±0.1)*.	Tabuchi y col., 2003
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Agua destilada con la células liofilizadas	7.56x10 ⁷ UFC/mL 2 semanas	Machos Wistar, 200 - 250 g	Después del inicio del tratamiento II de 2-DG (40 µmol/20 µL de FCA) IP de STZ (50 mg/Kg)	Reducción de los niveles de glucosa en plasma en hiperglicemia inducida por II de 2-DG*. Reducción del incremento de los niveles de glucosa en plasma en PTG*.	Yamano y col., 2006
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Dahi</i> fermentado	Dieta normal suplementada con <i>dahi</i> al 15% 8 semanas	Machos Wistar, 6-8 semanas de edad, 150-160 g	Inició con el tratamiento Inducción de hiperglucemia con solución de fructosa al 21% <i>ad libitum</i>	Reducción de glucosa y HbA1c*. Aumento en insulina en suero (14%) respecto al grupo sano.	Yadav y col., 2007
<i>Lactobacillus reuteri</i> GMNL-263	Solución buffer PBS	1x10 ⁹ organismos/día 28 días	Machos Sprague-Dawley, 12 semanas de edad	Antes del tratamiento IP de STZ/citrato de sodio 10 mM, pH=4.5, (50 mg/Kg)	Reducción de las concentraciones de HbA1c y glucosa en sangre* e iguales estadísticamente al grupo DM con insulina (4-5 U/Kg/día).	Lu y col., 2010
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Solución salina	10 ⁹ y 10 ¹¹ UFC/mL 3 semanas	Machos Sprague-Dawley, 6 - 8 semanas de edad, 200-250 g	Antes del tratamiento IP de STZ/citrato 0.05 M, pH de 4.5, (50 mg/Kg)	Reducción de los niveles de glucosa en sangre del 13.5% en la 1 semana de tratamiento.	Zarfeshani y col., 2011

IP: inyección intraperitoneal; STZ: estreptozotocina; PTG: prueba de tolerancia a la glucosa, DM-T: grupo DM-tratamiento; DM-C: grupo DM control; II: inyección intracraneal; 2-DG: 2-desoxi-D-.glucosa; FCA: fluido cerebroespinal artificial; AUC-G: área bajo la curva de la glucosa. *: diferencias significativas entre DM-T y DM-C.

Tabla 1. Probióticos con efecto hipoglucémico en modelos murinos (continuación).

Cepa	Vehículo de Administración	Dosis/duración	Modelo	Inducción de DM	Resultados	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i> TN627	Solución buffer PBS	0.9x10 ⁹ UFC/mL 4 semanas	Machos Wistar 179 ± 10 g	Antes del tratamiento IP de Alloxan/NaCl 0.9%, pH=4, (150 mg/Kg)	Reducción de los niveles de glucosa en sangre de 43% y en la PTG del 31.25%*.	Bejar y col., 2013
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i>	Agua para beber	1 g/12 h ~10 ¹⁰ UFC/g por cada cepa 56 días	Machos Wistar, 45 días de edad	Antes del tratamiento IP de STZ/citrato de sodio 0.1 M, pH=4.5, (65 mg/Kg)	Reducción de los niveles de glucosa en suero: DM-T* (410.10±33.44mg/dL < 520.6 ±28.15 mg/dL). Reducción de insulina en suero: DM-T* (5.88±0.19 ng/dL < 3.26±0.14 ng/dL).	Davari y col., 2013
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCFM0528		4x10 ⁹ UFC/mL 12 semanas	Ratones machos C57BL/6J, 4 semanas, 16 - 19 g	3 semanas después del inicio del tratamiento IP de STZ 50 mmol/L de buffer de citrato, pH=4.5, (100 mg/Kg)	Reducción de los niveles de glucosa en ayunas y posprandial después de 4 semanas*. Reducción de los valores de AUC-G en PTG en 4ta semana (30%) y a las 13 semanas (50%)*.	Chen y col., 2014

IP: inyección intraperitoneal; STZ: estreptozotocina; PTG: prueba de tolerancia a la glucosa, DM-T: grupo DM-tratamiento; DM-C: grupo DM control; II: inyección intracraneal; 2-DG: 2-desoxi-D-glucosa; FCA: fluido cerebroespinal artificial; AUC-G: área bajo la curva de la glucosa. *: diferencias significativas entre DM-T y DM-C.

Tabla 1. Probióticos con efecto hipoglucémico en modelos murinos (continuación).

Cepa	Vehículo de Administración	Dosis/duración	Modelo	Inducción de DM	Resultados	Referencia
<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	IP	~73x10 ⁸ UFC/g 30 días	Machos albinos, 6 meses de edad, 150 - 250 g	Antes del tratamiento IP de STZ/citrato 0.05 M, pH=4.5, (50 mg/rata)	Reducción de los niveles glucosa en sangre referentes al tiempo de inducción de DM (295.32±34.97 < 206.85±42.75), e iguales estadísticamente al grupo DM tratado con insulina (1 u/día).	Eagappan y col., 2014
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Streptococcus termophilus</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , y levadura Kefir	Kefir	10 ¹⁰ UFC/g 8 semanas	Machos Wistar, 8 semanas, ± 250 g	Antes de iniciar el tratamiento Inyección intravenosa de STZ/buffer de citrato 0.1 M, pH = 4.5, (45 mg/Kg)	Reducción de los niveles de glicemia del grupo DM-T (325±32 mg/dL < 457±31 mg/dL)*.	Punaro y col., 2014

IP: inyección intraperitoneal; STZ: estreptozotocina; PTG: prueba de tolerancia a la glucosa, DM-T: grupo DM-tratamiento; DM-C: grupo DM control; II: inyección intracraneal; 2-DG: 2-desoxi-D-.glucosa; FCA: fluido cerebroespinal artificial. *: diferencias significativas entre DM-T y DM-C.

II.6. Otros Componentes de la Leche con Efecto Hipoglucemiante

Los productos lácteos son parte fundamental de una dieta saludable, ya que son una buena fuente de calcio, proteínas, minerales y vitaminas (Akter y col., 2013). Además, los componentes de la leche al ser ingeridos, ejercen diferentes funciones, no sólo como fuente de energía, sino también como componentes de tejidos, en reacciones metabólicas, entre otras.

Algunos componentes de la leche pueden tener un efecto en el metabolismo de la glucosa. En un estudio se demostró que la ingesta de leche junto a comida alta en grasas mejora la respuesta de insulina postprandial, además de moderar los aumentos de glucosa (Da Silva y Rudkowska, 2014).

Algunos aminoácidos libres provenientes de las proteínas lácteas como la leucina, han demostrado tener propiedades bioactivas. Se ha comprobado en ensayos *in vitro* que la leucina promueve la oxidación de grasas; además aumenta la expresión de SIRT1 y NAD⁺-proteína deacetilasa sensible. Estos están implicados en la activación de la oxidación de las grasas, la biogénesis mitocondrial, así como la mejora de la sensibilidad a la insulina y reducen el estrés oxidativo (Hirahatake y col., 2014). Estos efectos pueden ser efectivos ya que la leucina se encuentra en la leche proveniente de vacuno en cantidades de 290 mg/100 g de leche (Claeys y col., 2014).

El ácido linoleico conjugado es otro componente bioactivo importante de la grasa láctea que ha demostrado tener numerosas vías de señalización moleculares independientes que presentan beneficios a la salud. Estos beneficios potenciales van dirigidos hacia la lucha contra la obesidad, efecto hipoglucemiante (mejora la sensibilidad a la insulina), anticancerígeno, antiaterogénico, inmunomodulación, apoptótico y efectos de osteosíntesis (Akter y col., 2013; Serafeimidou y col., 2013).

III. HIPÓTESIS

La administración de leches fermentadas por *Lactobacillus plantarum* LP24 y/o LP35 tiene efecto hipoglucemiante en un modelo murino.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto hipoglucemiante por la administración de leches fermentada con *Lactobacillus plantarum* LP24 o LP35 en un modelo murino.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la administración de las leches fermentadas sobre parámetros bioquímicos (niveles séricos de glucosa, hemoglobina glicosilada, insulina y perfil de lípidos) en plasma de ratas Wistar con diabetes tipo 1 (DT1) inducida por la administración de estreptozotocina (STZ) y en ratas con diabetes tipo 2 (DT2) inducida por la administración de una solución con alta fructosa.
2. Evaluar el efecto de la administración de las leches fermentadas en plasma de ratas Wistar con DT1 o DT2 en los parámetros de capacidad antioxidante total plasmática y la peroxidación de lípidos (MDA).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Selección de Bacterias

Se utilizaron dos cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* anteriormente estudiadas (Ramírez-Valdez, 2013) y resguardadas en el laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos de la CTAOA en CIAD, A.C.

Las BAL fueron codificadas como LP24 y LP35. Ambas cepas se encontraron almacenadas en caldo MRS y glicerol 50% v/v, y fueron reactivadas de manera individual en caldo MRS (pH 7.2, De Man, Rogosa and Sharpe, Difco™) a 37 °C durante 24 horas (Ramírez-Valdez, 2013).

V.2. Preparación de Leches Fermentadas

La preparación de las leches fermentadas para los tratamientos del modelo murino se llevó a cabo en base al método descrito por Ramírez-Valdez (2013).

La leche para el tratamiento fue leche semidescremada en polvo Alpura® (Edo. de México, M), la cual fue reconstituida al 10% (p/v) y esterilizada a 110 °C por 10 minutos. Posteriormente se realizó un preinóculo y un inóculo en leche para cada cepa por separado al 3% (v/v) y se incubaron a 37 °C por 18 h y 12 h. Por último, se fermentó la leche por 18 h para obtener una concentración de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL⁻¹. La leche fermentada se almacenó

en refrigeración (4 °C – 10 °C) al término de las 18 horas de fermentación (Ramírez-Valdez, 2013).

V.3. Experimento *in vivo*

V.3.1. Tamaño de Muestra

El tamaño de la muestra de ratas Wistar se calculó con un nivel de confianza de 95%, mediante la siguiente ecuación:

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

Dónde:

$z = 95\%$

Nivel de confianza = 1.96

$\delta = 0.03$

$\beta = \sigma \times (\text{media})$

$\sigma = 0.05$

Los datos de referencia se tomaron de investigaciones de referencia, Zarfeshani y col. (2011) y Yadav y col. (2007); así como de un estudio preliminar. El número resultante de este cálculo fue de 10 y 7 ratas por tratamiento, para el modelo DT1 y DT2 respectivamente.

V.3.2. Modelos para DT1 y DT2

Se utilizaron ratas Wistar (Laboratorios UNAM-Harlan, México, D.F.) de 5 a 7 semanas de edad y de 150 a 200 g de peso corporal. Las ratas fueron alojadas en grupos de 3 en jaulas, bajo un ambiente controlado con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas; según lo establece la NOM-062-ZOO-1999. La primera semana fue de adaptación, proporcionándoles agua *ad libitum* y una dieta estándar (Laboratorios Harlan).

La DT1 fue inducida mediante dos inyecciones intraperitoneales de estreptozotocina. Se les administró una inyección intraperitoneal de 25 mg/Kg de STZ al tiempo cero y otra después de 72 h de la primera dosis (Fig. 1) (Sigma-Aldrich, Saint Louis MO) en un buffer de citrato (0.1 M, pH 4.5) (Zarfeshani y col., 2011). Se midieron los niveles de glucosa basal (Tabla 2) vía incisión en la cola, utilizando el glucómetro One Touch Ultra Mini® (Johnson & Johnson) (Yadav y col., 2007). Al término de la evaluación de la glucosa, las ratas fueron divididas en grupos para la asignación de tratamientos (Tabla 3). A las ratas en el modelo DM 2, se les proporcionó una solución alta en fructosa (SAF) al 21% *ad libitum* (Yadav y col., 2007) que proporciona un estado de DT2 asociada a la RI, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión (Yadav y col., 2007). Al término del periodo de adaptación se formaron los grupos para los tratamientos mediante una aleatorización (Tabla 4).



Fig. 1. Inyección intraperitoneal.

Tabla 2. Tiempos de monitoreo de glucosa en sangre para las ratas durante la inducción de DT1.

Antes de la inducción	Después de la inducción
T0 = después de las 8 horas de ayuno	T1 = 24 h
	T2 = 48 h
	T3 = 72 h
	T4 = 96 h
	T5 = 120 h
	T6 = 144 h

Tabla 3. Tratamientos en el modelo murino con DT1.

Grupos Testigo	Grupos de leche fermentada
Grupo sano, administración de 1 mL PBS	DT1 positiva, 1mL de leche fermentada LP24
DT1 positiva, administración de 1 mL de PBS	D1 positiva, 1 mL de leche fermentada LP35
DT1 positiva, administración de 1 mL de leche sin fermentar	

Tabla 4. Tratamientos en el modelo murino con DT2.

Grupos Testigo	Grupos de leche fermentada
Grupo sano, administración de 1 mL PBS	Dieta alta en fructosa, 1mL de leche fermentada LP24
Dieta alta en fructosa, administración de 1 mL de PBS	Dieta alta en fructosa, 1 mL de leche fermentada LP35
Dieta alta en fructosa, administración de 1 mL de leche sin fermentar	

La administración diaria de los tratamientos y la solución de alta fructosa fue por vía orofaríngea con una cánula para rata No. 20 (Fig. 2), por 14 semanas. El registro del peso se realizó dos veces por semana con 4 horas de ayuno en una balanza modelo Triple Beam de 0.1-610 g de la marca OHAUS®. Además, se llevó a cabo la determinación de los niveles de glucosa semanalmente vía incisión en la cola utilizando un glucómetro One Touch Ultra Mini®. En la última semana de tratamiento se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, previo un ayuno de 12 h. Se administró a las ratas una solución concentrada de glucosa Dextrosol® (100 g/250 mL), 2 g/Kg de peso vía orofaríngea, con mediciones de glucosa en sangre a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 min.

Al término de las 14 semanas de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas previo a un ayuno de 12 h y una anestesia, mediante la técnica de punción cardiaca (Ramírez, 2013). Durante el sacrificio, se llevó a cabo la recolección de muestras de sangre, mediante una punción cardiaca con una jeringa estéril con aguja hipodérmica. La muestra fue recolectada en tubos eppendorf y conservada en hielo previo a su centrifugación. Posteriormente se obtuvo el suero sanguíneo al centrifugar la sangre en una centrífuga eppendorf Modelo 5417R, a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Marazza y col., 2013).

Los materiales químicos y biológico infecciosos que se generaron durante el experimento fueron desechados de acuerdo al manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos regulado por el departamento correspondiente de CIAD.

El suero fue utilizado para los análisis de glucosa, lípidos, insulina, HbA1c, peroxidación de lípidos y cuantificación de la capacidad antioxidante plasmática ((Mora, y col., 2009; Zarfeshani, y col., 2011; Marazza y col., 2013; Ramírez-Valdez, 2013; Nakatsuji, y col., 2014).



Fig. 2. Alimentación por vía orofaríngea.

V.4. Valoración de Niveles Séricos de HbA1c, Insulina y Lípidos

Los niveles de triglicéridos, colesterol total y HDL fueron determinados en suero mediante el uso de un kit enzimático colorimétrico en un equipo semiautomático Microlab100 marca Merk.

V.4.1. HbA1c

La determinación de HbA1c se realizó en sangre mediante el método de intercambio iónico en columna de resina de débil afinidad (Eagle Diagnostics®, TX, U.S.A.). La HbA₀ se une a la resina, después se utiliza un filtro separador para separar la resina del sobrenadante el cual contiene la glicohemoglobina. El porcentaje de la glicohemoglobina se determina por la absorbancia a 415 nm de la fracción de glicohemoglobina y la hemoglobina total, calculando el cociente de las absorbancias, y comparando el cociente obtenido con el calibrador utilizado (Yadav y col., 2007).

V.4.2. Insulina

La determinación de insulina en el suero sanguíneo se realizó mediante un kit de ELISA 80-INSRT-E01 ALPCO® Diagnostics, el cual es un inmunoensayo amplificado mediante enzimas tipo sándwich. En el ensayo las muestras se incubaron en una microplaca con un anticuerpo con insulina, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro Spectra MAX 3 Multi-Mode Microplate Reader Molecular Devices, LLC. La concentración de insulina fue directamente proporcional a la absorbancia medida en la evaluación

correspondiente. Para calcular la concentración de insulina se realizó una curva estándar.

V.4.3. Colesterol Total y HDL

Las determinaciones de colesterol total y HDL fueron realizadas mediante el sistema enzimático colesterol oxidasa/peroxidasa. Los kits a emplear fueron CH 200 y HDL cholesterol 3811 (Randox Laboratories Limited®, QY, U.K.).

V.4.4. Triglicéridos

La determinación de los niveles de triglicéridos en suero sanguíneo fueron realizados con el kit TR 1697 (Randox Laboratories Limited®, QY, U.K.) en un equipo semiautomático MicroLab100 marca Merk (según el proveedor).

V.5. Evaluación de Parámetros de Estrés Oxidativo

V.5.1. Cuantificación de la Capacidad Antioxidante Plasmática (ABTS)

Se utilizó un ensayo antioxidante que se basa en la formación del radical ferril-mioglobina de la mioglobina y el peróxido de hidrógeno, que oxida el ABTS (2,2'-azino-bis (3-ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) para producir un catión radical $ABTS^+$, un cromógeno soluble de color verde que puede ser determinado a 405 nm. Se utilizó el kit de ensayo Antioxidante de Sigma-Aldrich® de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Mora, y col., 2009).

V.5.2. Peroxidación de Lípidos (MDA)

Los niveles de peróxido de lípidos en suero sanguíneo se midieron mediante la reacción colorimétrica del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) medidos a 532 nm. La reacción se llevó a cabo utilizando el kit de ensayo peroxidación de lípidos (MDA) de Sigma-Aldrich®, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Nakatsuji y col., 2014).

V.6. Análisis Estadístico

Para el análisis de los niveles de glucosa en sangre, peso corporal, consumo de agua o fructosa y alimento se llevó a cabo un diseño en bloques al azar. Las variables de respuesta fueron los niveles de la glucosa en sangre, ganancia en peso corporal y el consumo de alimento y agua o fructosa, con el tiempo como el factor de bloqueo. Los niveles séricos de HbA1c, insulina, lípidos, la capacidad antioxidante total plasmática y la peroxidación de lípidos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar.

Los resultados de ambos diseños fueron realizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia del 95%, mediante el uso del paquete estadístico NCSS 2007. Las determinaciones de las diferencias significativas se evaluaron mediante pruebas de Fisher.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI.1. Modelo de DT1

VI.1.1. Inducción Química de DM

La inducción de DM se llevó a cabo durante la semana 3 de iniciado el tratamiento. En la figura 3 se observa el aumento en los niveles de glucosa a partir de las 96 h de inducción. Este aumento fue notorio después de la segunda IP de STZ la cual fue administrada a las 72 h. Al término de la evaluación (144 h), los grupos alcanzaron niveles de glucosa >200 mg/dL, confirmando la inducción de DM1. Como fue de esperarse, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$).

La molécula de STZ tiene una similitud a la estructura molecular de la glucosa (Fig. 4), por lo tanto puede competir en su absorción en las células β pancreáticas a través del transportador GLUT-2, además de provocar la alquilación del ADN (Szkudelski, 2001). Posteriormente se produce una reducción en el número de islotes y su volumen, teniendo como consecuencia una reducción en la capacidad de la secreción de insulina.

Las diferentes especies tienden a tener diferentes concentraciones de glucosa en sangre que los humanos, y por lo tanto las definiciones para diabetes en los humanos no necesariamente pueden ser aplicadas a los animales. En el caso particular de las ratas Wistar tienden a tener concentraciones de glucosa mayores que los humanos (145.03 mg/dL). De acuerdo a Harlan Laboratories,

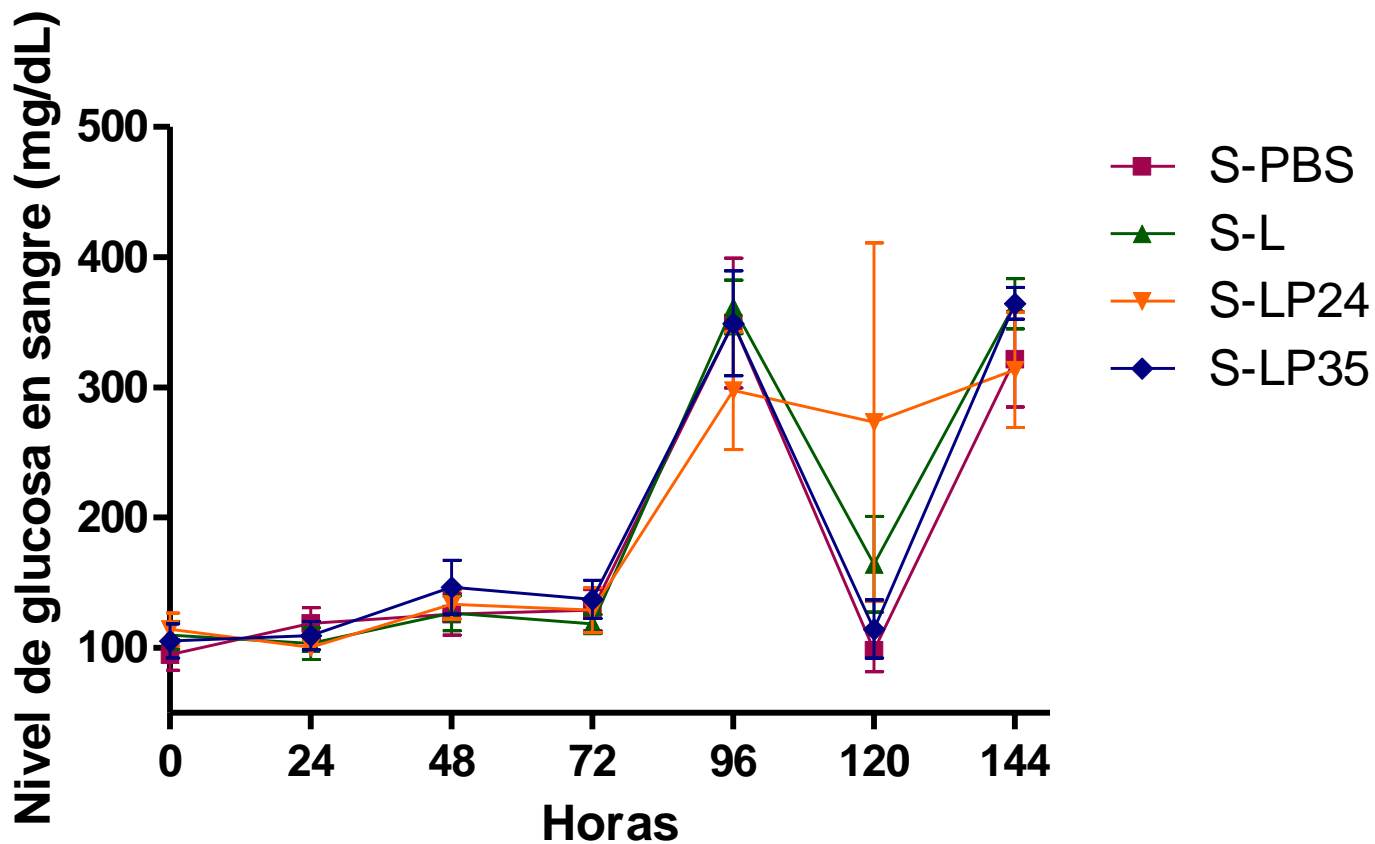


Fig. 3. Niveles de glucosa en sangre durante la inducción de DT1 mediante IP de STZ. IP de STZ al tiempo 0 y 72 h. Los niveles de glucosa fueron medidos antes de la inducción y durante un periodo de 144 h posteriores. S-PBS: grupo con DT1 con PBS como tratamiento; S-L: grupo con DT1 con leche como tratamiento; S-LP24 y S-LP35: grupos con DT1 con leche fermentada como tratamiento (cepa LP24 y LP35 respectivamente). Valores expresados en media \pm desviación estándar.

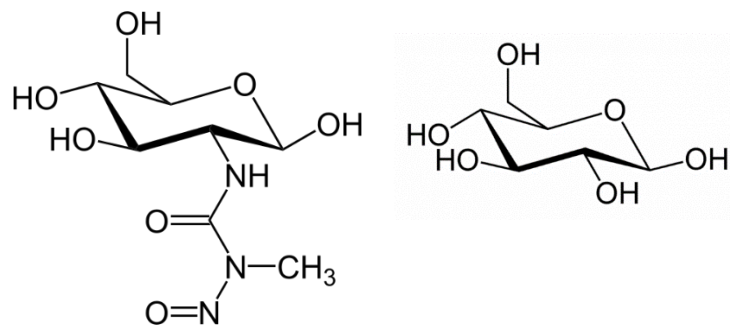


Fig. 4. Molécula de STZ (izquierda) y glucosa (derecha).

INC, (Indianapolis, IN, USA, 2008), una concentración de glucosa en sangre en ayunas superior a 200 mg/dL es considerado un estado de diabetes en ratas, como ocurre con el caso del uso de la STZ (King, 2012; Davari y col., 2013; Punaro y col., 2014).

VI.1.2. Evaluación de Glucosa durante el Tratamiento

En la figura 5 se muestra que los grupos tratados con STZ tienen una elevación drástica en los niveles de glucosa después de la inducción de la DM. Sin embargo, los niveles de glucosa de los grupos diabéticos administrados con LP24 y grupos testigo disminuyeron a partir de la semana 10 y se observó una disminución de los niveles de glucosa por debajo de los 200mg/dL, los cuales fueron similares a los niveles de las ratas sanas. El nivel normal de glucosa de una rata sana Wistar está considerado en 145.03 mg/dL según lo reportado por la casa comercial Harlan, por lo anterior, los niveles de glucosa del grupo administrado con LP24 por 14 semanas fueron considerados como normales. Algunos estudios sugieren que la implantación de células de *Lactobacillus* GG en el intestino podrían afectar la absorción de la glucosa (Tabuchi y col., 2003). Aunque en el presente estudio no se evaluó la implantación del *Lactobacillus plantarum* (LP24), podría ser que la disminución de los niveles de glucosa estuviesen asociados a una menor absorción de ésta.

VI.1.3. Evaluación de Peso Corporal

En la figura 6 se observa la evolución del peso de los diferentes grupos durante los tratamientos. Los grupos no fueron diferentes entre sí al inicio del experimento, esto como resultado de la aleatorización de los sujetos para la formación de grupos homogéneos para la administración de los tratamientos. Sin

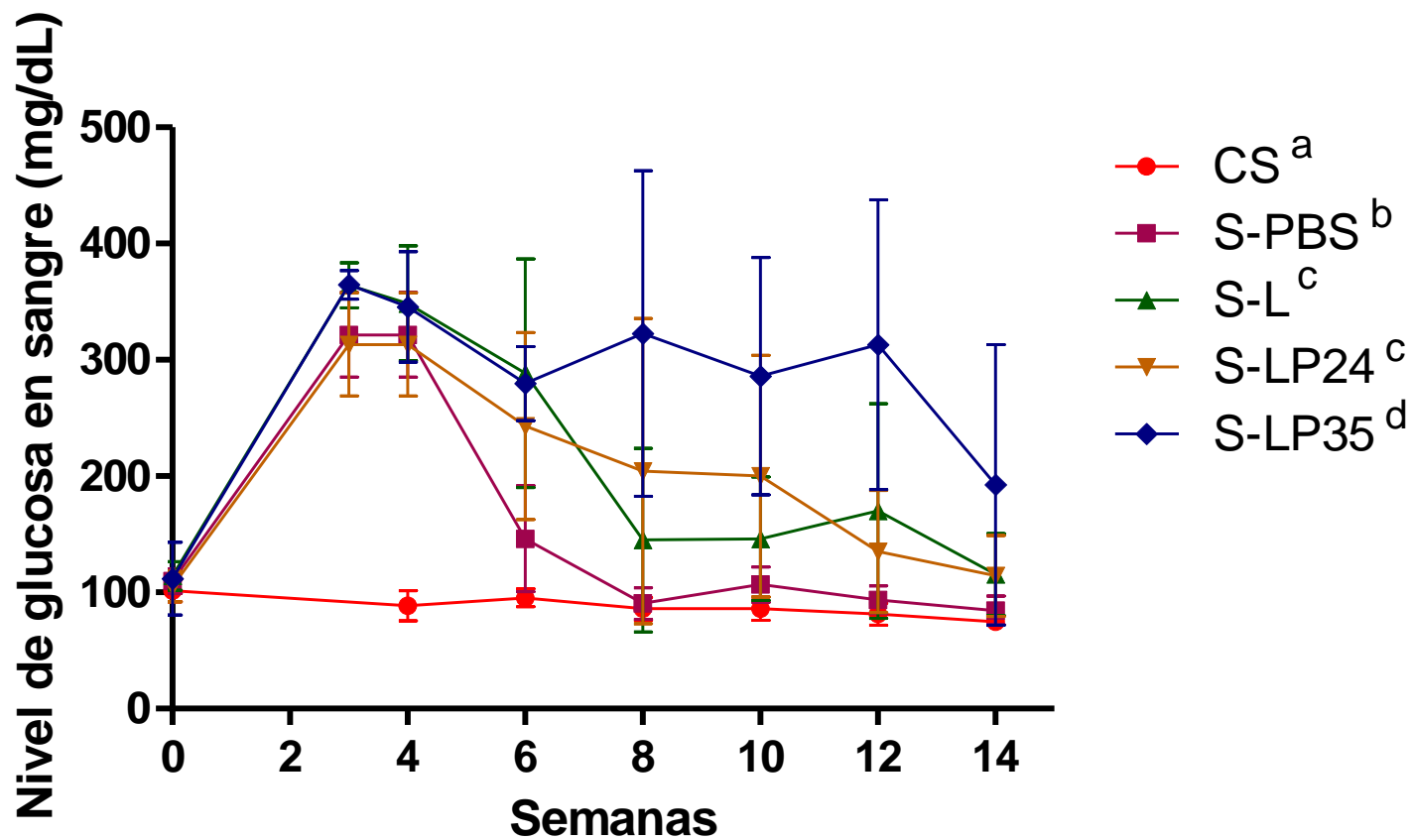


Fig. 5. Niveles de glucosa en sangre del modelo de DT1 durante el tratamiento. CS: grupo control sano con PBS como tratamiento; S-PBS: grupo con DT1 con PBS como tratamiento; S-L: grupo con DT1 con leche como tratamiento; S-LP24 y S-LP35: grupos con DT1 con leche fermentada como tratamiento (cepa LP24 y LP35 respectivamente). Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

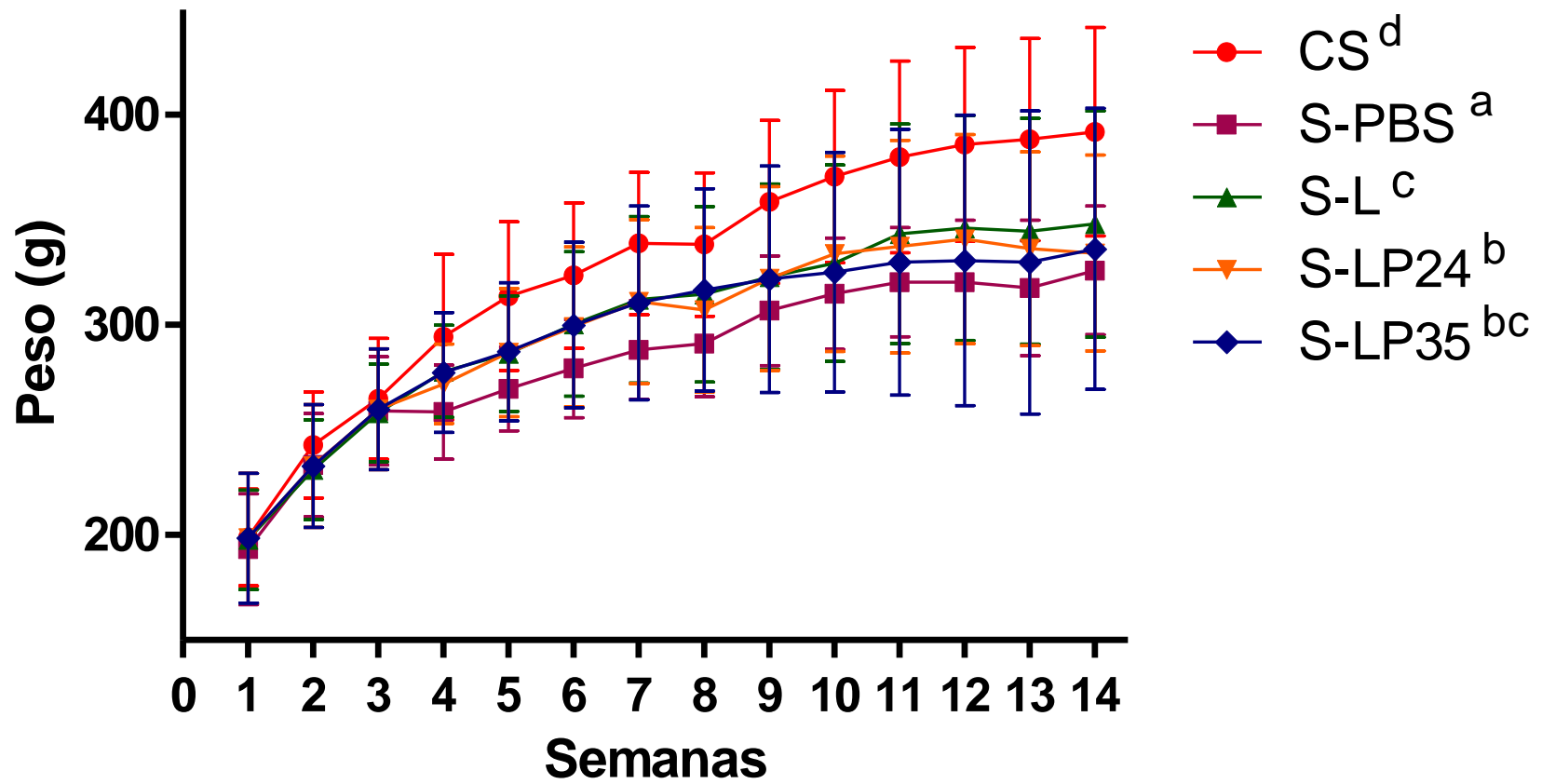


Fig. 6. Peso de los grupos del modelo de DT1 durante el tratamiento. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

embargo, al final del experimento, todos los grupos con DM inducida con STZ presentaron menor peso que el grupo testigo sano.

En los modelos de diabetes inducidas químicamente, un alto porcentaje de las células beta endógenas son destruidas, por lo que hay poca producción endógena de insulina y esto conduce a la hiperglucemia y la pérdida de peso (Tabuchi y col., 2003; King, 2012; Bejar y col., 2013). Por lo anterior, el menor peso de todos los grupos con DT1 con respecto al grupo control sano, podría deberse a la destrucción de células β .

VI.1.4. Evaluación del Consumo de Alimento

En la figura 7 se observa que los grupos inducidos con DT1 tuvieron un aumento en la ingesta de alimento ($p < 0.05$) con respecto al grupo control sano (CS). El aumento de la ingesta de alimento se observó a partir de la semana 4 de tratamiento, lo cual podría deberse a que la inducción de la DM se dio en la semana 3 de tratamiento.

VI.1.5. Evaluación del Consumo de Agua

En la figura 8 se observa que los grupos inducidos con DM presentaron niveles superiores de consumo de agua que el grupo control sano (CS) ($p < 0.05$). Se ha reportado que una elevada concentración de glucosa en la sangre, origina un aumento de la osmolaridad plasmática y se estimulan los receptores hipotalámicos produciendo polidipsia, un trastorno representativo de la DM. Aunado a lo anterior, un medio hiperosmolar produce glucosuria y cuando se excreta el exceso de glucosa por la orina existe una pérdida excesiva de líquidos y electrolitos y como consecuencia se produce poliuria y polidipsia (Rodríguez y Vivas, 2003).

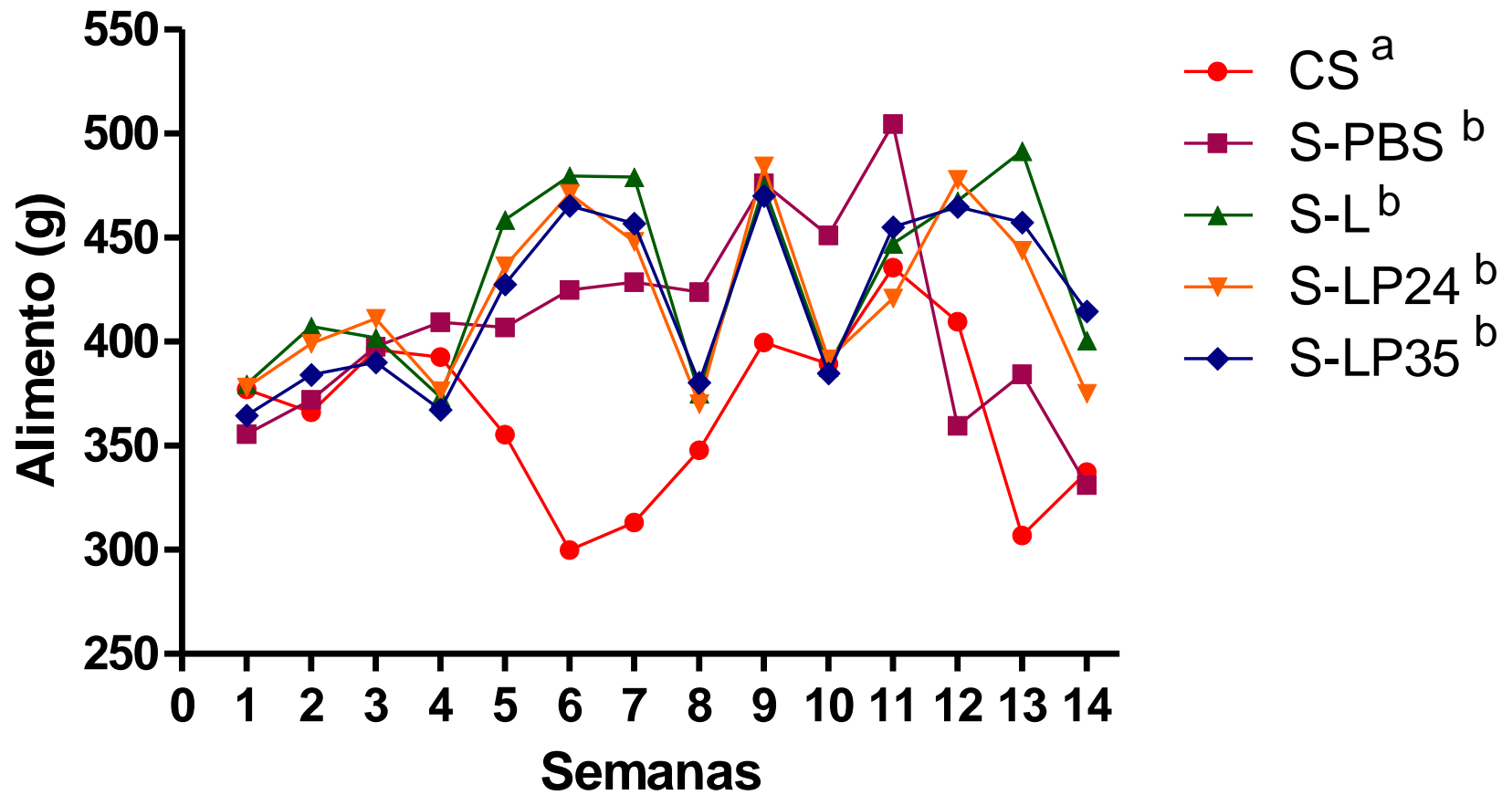


Fig. 7. Consumo de alimento de los grupos en tratamiento del modelo de DT1. Valores expresados en media muestral. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

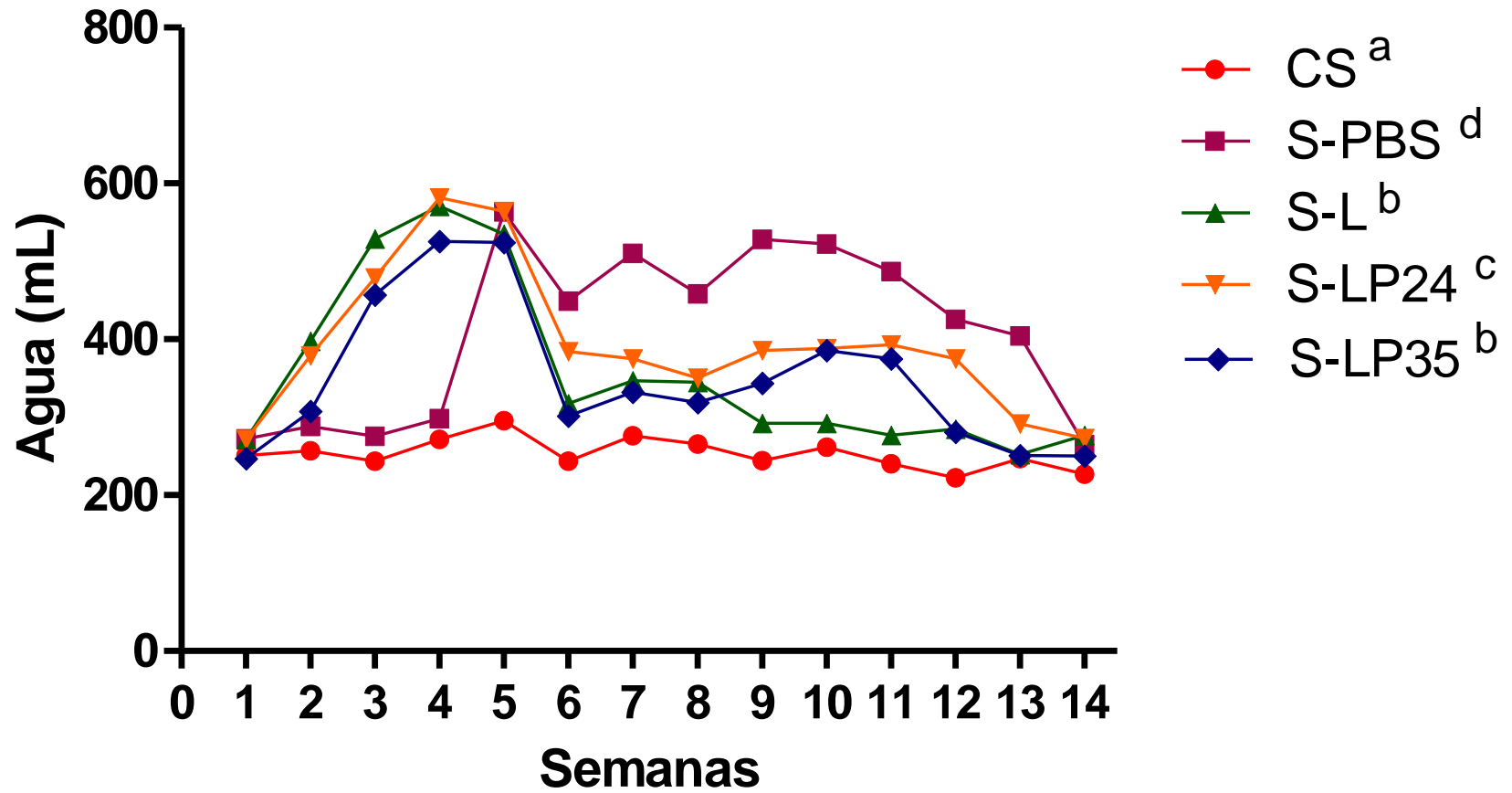


Fig. 8. Consumo de agua de los grupos en tratamiento del modelo de DT1. Valores expresados en media muestral. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

VI.1.6. Prueba de Tolerancia a la Glucosa

En la figura 9 se muestra que el grupo S-LP24 presentó niveles de glucosa significativamente ($p < 0.05$) menores que el grupo S-LP35. El grupo S-LP35 presentó los niveles de glucosa más elevados, especialmente a los 30 y 60 min, lo cual sugiere que existe un trastorno mayor en la respuesta de la insulina. Ambos grupos administrados con leche fermentada presentaron niveles de glucosa por arriba de los 300mg/dL confirmando su estado de diabetes. Si los niveles de glucosa en sangre se encuentran en el rango de 216-280 mg/dL, se puede considerar a las ratas como prediabéticas. Sin embargo, cuando los niveles de glucosa son >280 mg/dL, se pueden considerar como diabéticas (Lukačínová y col. 2013).

VI.1.7. HbA1c e Insulina en Plasma

En la tabla 5 se presentan los parámetros de HbA1c después de 14 semanas de tratamiento. Se observó que el grupo S-LP24 presentó un porcentaje de HbA1c significativamente menor que los otros grupos ($p < 0.05$). Este valor se encontró dentro del rango de los niveles de hipoglicemia (menor del 6%) (Ángel y Ángel, 2006) ya que se ha reportado que niveles de HbA1c de 7 a 9 % indican un buen control de la DM (Páez y col., 2009). Por el contrario el grupo S-LP35 presentó el mayor porcentaje de HbA1c de los grupos bajo estudio y no fue diferente del grupo testigo (S-PBS) ($p > 0.05$). El valor de Hba1c del grupo S-LP35 se encontró dentro de los niveles de Hba1c para diabéticos con un buen control (7- 9%) según lo señala el manual del kit de la prueba.

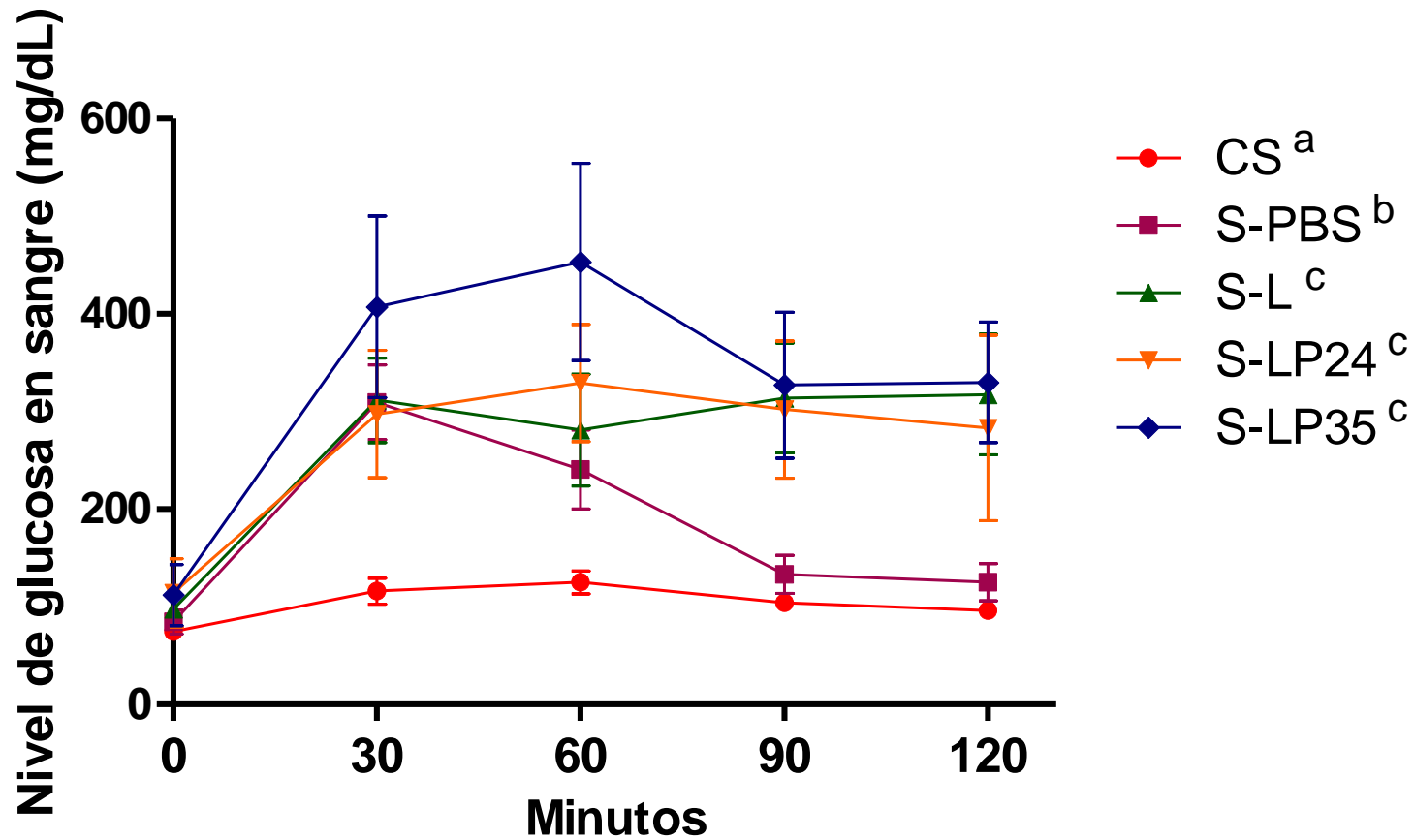


Fig. 9. Prueba de tolerancia a la glucosa en los grupos de DT1 al final del tratamiento. (2 g de glucosa/Kg de peso después de un ayuno de 12 h). Los niveles de glucosa fueron medidos de 0 a 120 min. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 5. Niveles plasmáticos de HbA1c e insulina de los grupos del modelo DT1.

Tratamiento	HbA1c (%)	Insulina (mg/dL)
CS	6.02±0.85 ^b	1.04±0.06
S-PBS	7.74±1.36 ^c	1.08±0.04
S-L	4.64±0.56 ^a	0.88±0.39
S-LP24	3.87±0.65 ^a	1.06±0.04
S-LP35	7.78±1.21 ^c	1.09±0.04

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Superíndices diferentes en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la tabla 5 se muestran los niveles séricos de insulina de los distintos grupos después de 14 semanas de tratamiento y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$). Estos resultados difieren de otros estudios que muestran un aumento en los niveles de insulina después de la ingesta de probióticos o de derivados lácteos fermentados con probióticos. Davari y col. (2013) y Chen y col. (2014) observaron en sus estudios un aumento significativo en los niveles de insulina en suero de ratas Wistar a las que les fue administrados probióticos (*L. acidophilus*, *B. lactis*, *L. fermentum* y *L. rhamnosus* CCFM0528 respectivamente), en comparación con el grupo diabético testigo; y sin diferencias significativas con el grupo sano. Por lo contrario, Tabuchi y col. (2003) encontraron que después de la ingesta diaria de un liofilizado de *Lactobacillus* GG en la comida, en ratas Wistar con inducción de DM por STZ, resultaron con niveles de insulina por debajo de 1 ng/mL (1×10^{-4} mg/dL) y sin diferencia significativa entre ellos.

VI.1.8. Lípidos en Plasma

En la tabla 6 se presentan los lípidos en suero. El colesterol total no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio. Los grupos administrados con leche y leches fermentadas (L, LP24 y LPL35) presentaron mayor concentración de C-HDL, y fueron estadísticamente diferentes a los grupos control sano (CS) y el grupo administrado PBS (S-PBS). Se ha reportado que un aumento en C-HDL se correlaciona con una disminución en los riesgos de enfermedades cardiovasculares (Beltrán-Barrientos, 2013). Por lo que la administración de leche o leche fermentada podría ser benéfica para la salud cardiovascular. Por el contrario, en un estudio que duro 4 semanas en el cual el tratamiento fue *L. plantarum* TN627 administrado a una dosis de 0.9×10^9 CFU/ml, se observó que el C-HDL del grupo diabético (125 ± 9 mg/dL) con *L. plantarum* no fue significativamente diferente que el grupo control sano (136 ± 12

Tabla 6. Niveles plasmáticos de lípidos de los grupos del modelo DT1.

Tratamiento	Colesterol total (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)	C-VLDL (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
CS	125.57±17.23	46.24±5.75 ^a	57.54±9.27 ^c	20.54±2.38 ^{ab}	102.70±11.91 ^{ab}
S-PBS	119.71±10.27	44.65±3.53 ^a	38.98±4.82 ^{ab}	33.48±4.09 ^c	167.44±20.54 ^c
S-L	115.25±13.64	59.03±9.13 ^b	59.42±25.97 ^c	16.44±1.87 ^a	82.20±9.38 ^a
S-LP24	101.66±13.73	58.11±8.04 ^b	28.84±8.76 ^a	19.14±4.14 ^a	95.70±20.71 ^a
S-LP35	119.28±13.21	56.48±5.82 ^b	51.24±13.63 ^{bc}	24.06±2.92 ^b	120.33±14.63 ^b

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Superíndices diferentes en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

mg/dL) ($p>0.05$), pero si del grupo DM testigo (79 ± 9 mg/dL) ($p<0.05$) (Bejar y col., 2013).

Los parámetros de C-LDL, C-VLDL y triglicéridos para el grupo administrado con leche fermentada SLP24 presentaron los niveles más bajos de los grupos en estudio y fueron significativamente diferentes de los demás grupos ($p<0.05$).

VI.1.9. Antioxidantes (Trolox) en Plasma

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de antioxidantes entre los diferentes grupos ($p>0.05$) (Figura 10). Por el contrario, en el estudio de Mora y col. (2009), se reportó una disminución significativa ($p<0.05$) en antioxidantes entre el grupo inducido con DM y el grupo control. En los animales inducidos con DM utilizando 50 mg/Kg de STZ se redujo en un 60% el parámetro de antioxidantes, comparado con los animales sanos. Se ha reportado que la utilización de 50 mg/Kg de STZ como dosis diabetogénica evidencia el posible efecto de un tratamiento antidiabético/antioxidante sobre la modificación del parámetro de antioxidantes (Mora y col., 2009).

VI.1.10. MDA en Plasma

En la figura 11 se muestran los niveles séricos de MDA de los distintos grupos después de 14 semanas de tratamiento. Se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p<0.05$). Los grupos administrados con leches fermentadas (S-LP24 y S-LP35) mostraron niveles inferiores de MDA que los grupos testigo por lo que hubo una menor degradación de lípidos en plasma. Niveles menores en las concentraciones de MDA en suero sanguíneo indican una disminución en la degradación de lípidos que se presenta cuando hay daño

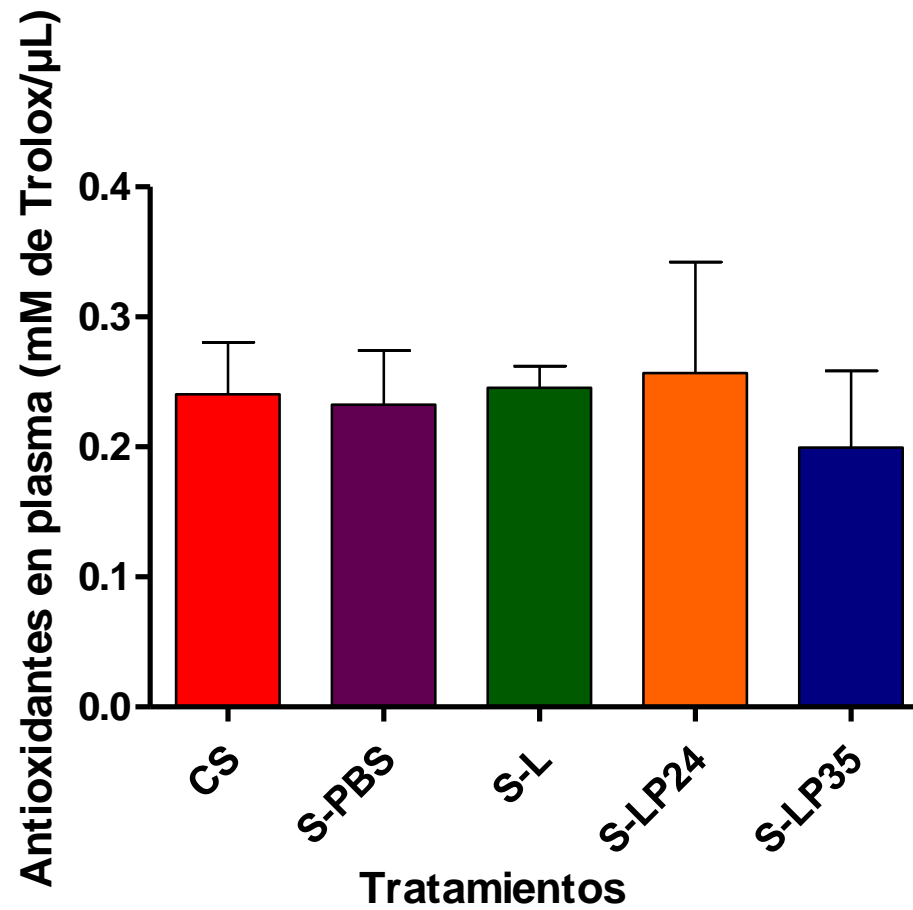


Fig. 10. Antioxidantes totales en plasma de los grupos del modelo DT1. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

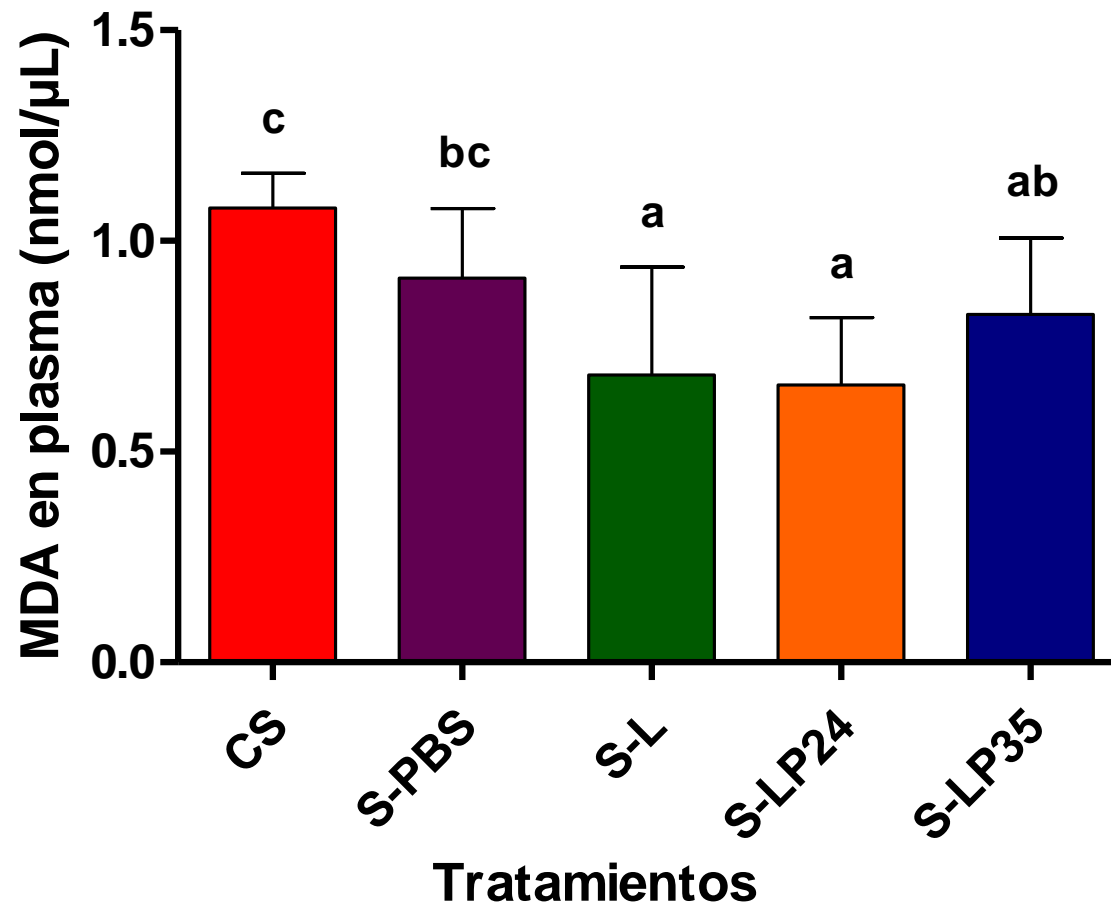


Fig. 11. MDA en plasma de los grupos del modelo DT1. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

oxidativo. El MDA es una molécula que se produce como producto final de la reacción de oxidación. El efecto por la administración de leche fermentada podría haber conducido a la preservación de células β , las cuales son susceptibles al daño oxidativo, o por un efecto antioxidante procedente de la leche. Se conoce que péptidos bioactivos liberados durante la fermentación por BAL proteolíticas pueden captar los ROS e inhibir la peroxidación de lípidos (Punaro y col., 2014).

De manera similar, Punaro y col. (2014) reportaron que en un modelo DM con ratas Wistar inducido con STZ, los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron menores en el grupo DM que consumió *kéfir* con respecto al grupo DM testigo y por el contrario fueron estadísticamente similares a los del grupo testigo sano.

La acción citotóxica de la STZ en modelos de DM en animales, está asociada a la generación de ROS que causan daño oxidativo culminando en la destrucción de las células β mediante la inducción de apoptosis y la supresión de la biosíntesis de insulina (Marazza y col., 2013). Mora y col. (2009) observaron en un modelo de DM administrado con 50 mg/Kg de STZ, un incremento en una relación aproximada de 5:1, de este parámetro de estrés oxidativo, en comparación con el modelo sano. En ese estudio se observó un incremento en el MDA, este aumento procede principalmente del aumento de los niveles de glucosa en sangre que genera ROS después de su autooxidación. Lo anterior podría estar asociado a la reducción de los mecanismos de defensa antioxidante y al desarrollo de las complicaciones diabéticas.

En otros estudios se evaluó la cuantificación de MDA en homogenizados de órganos de las ratas en estudio, inducidas con DM mediante STZ; ya que el hígado, el páncreas y el riñón son órganos diana para la toxicidad del STZ como agente diabetogénico (Mora y col., 2009). Distintos autores han observado en estudios donde se indujo DM a ratas con STZ, un aumento en los niveles de TBARS en hígado en los grupos con DM, así como una disminución significativa

($p < 0.05$) en los grupos tratados con el probiótico (Tabuchi y col., 2003; Yadav y col., 2008; Mora y col., 2009).

VI.2. Modelo de DT2

VI.2.1. Evaluación de Glucosa Durante el Tratamiento

En la figura 12 se observa que los grupos administrados con leche (F-L) y leches fermentadas (F-LP24 y F-L35) presentaron niveles de glucosa significativamente mayores a los grupos testigo (CS y F-PBS) ($p < 0.05$). Estos resultados indican que aunque las ratas no presentaron niveles de glucosa que las clasificaría como diabéticas, los grupos que fueron administrados con leche o leche fermentada mostraron mayor intolerancia a la glucosa que el grupo CS o F-PBS.

Los resultados mostrados difieren de los encontrados por Yadav y col. (2007), ya que los niveles de glucosa del grupo testigo que tuvo la dieta con la solución de fructosa al 21%, llegaron a niveles superiores de glucosa en sangre (192.50 ± 15.77 mg/dL) en un periodo de tratamiento menor (8 semanas). Así mismo, el grupo con consumo de *dahi* y la dieta con la solución alta en fructosa al 21%, presentaron niveles de glucosa en sangre de 120.50 ± 9.33 mg/dL al finalizar el tratamiento y fueron mayores que los obtenidos en el presente estudio.

VI.2.2. Evaluación del Peso Corporal Durante el Periodo de Tratamiento

La evaluación del peso corporal durante el periodo de tratamiento se muestra en la figura 13. Los resultados mostraron que los grupos tratados con leche fermentada tuvieron una menor ganancia de peso corporal que el grupo

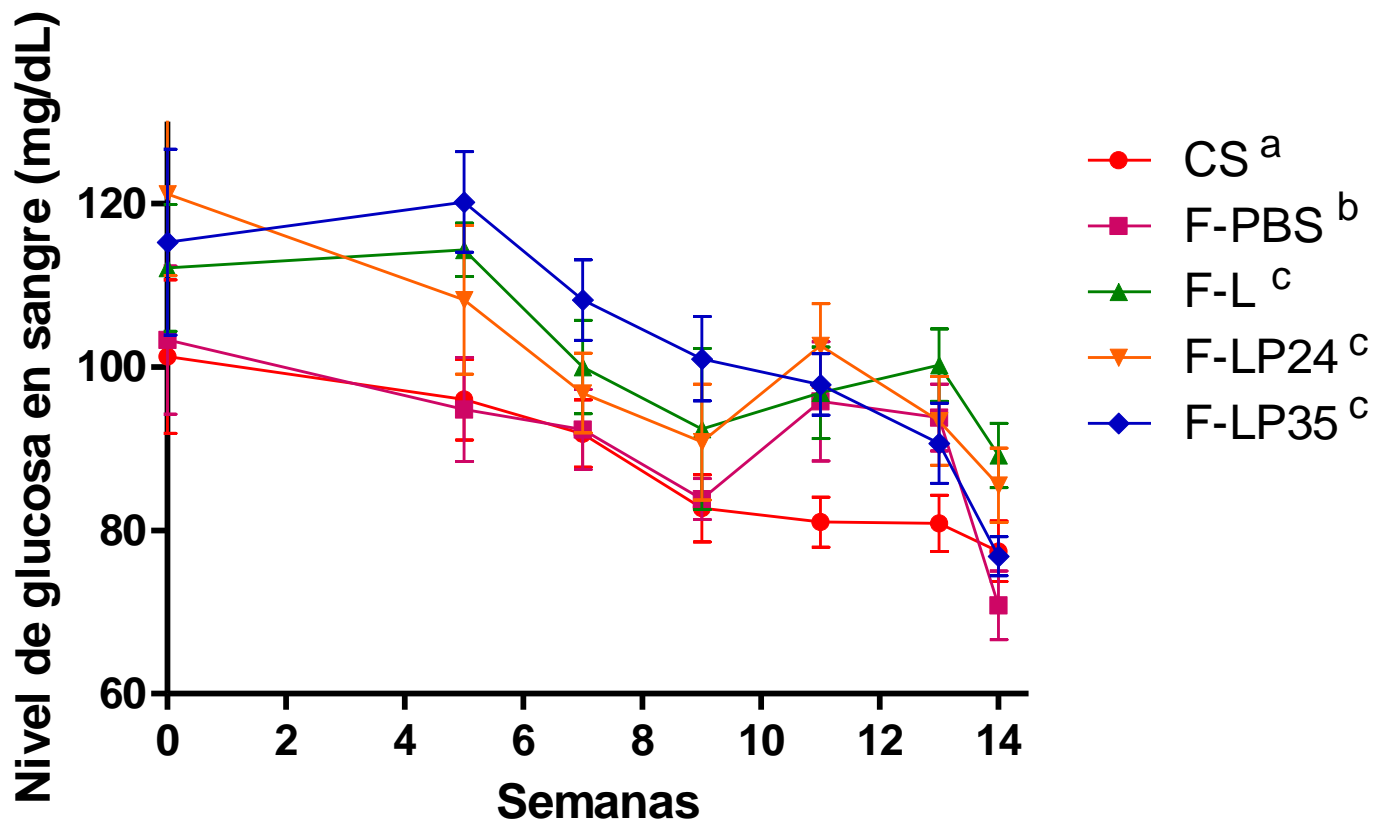


Fig. 12. Niveles de glucosa en sangre del modelo de DT2 durante el tratamiento. CS: grupo control sano con PBS como tratamiento; F-PBS: grupo con SAF con PBS como tratamiento; F-L: grupo con SAF con leche como tratamiento; F-LP24 y F-LP35: grupos con SAF con leche fermentada como tratamiento (cepa LP24 y LP35 respectivamente). Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

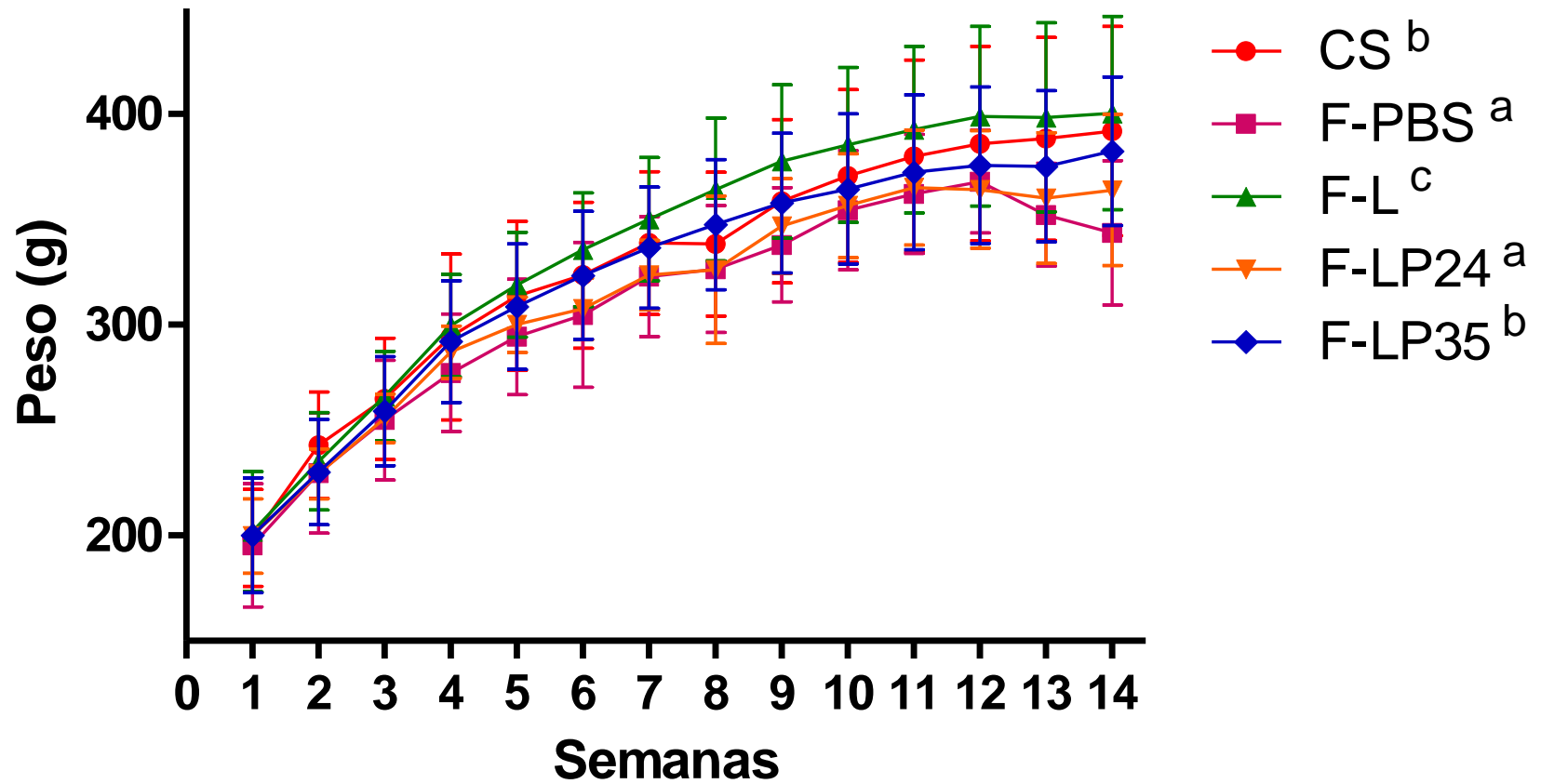


Fig. 13. Peso de los grupos del modelo de DT2 durante el tratamiento. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

testigo (F-L) ($p < 0.05$). El grupo F-LP24 fue significativamente menor que el grupo F-LP35 y el grupo control (CS). En el caso del grupo F-LP35, este fue igual al grupo control (CS) ($p > 0.05$).

VI.2.3. Evaluación del Consumo de Alimento

La figura 14 muestra el consumo de alimento durante las 14 semanas de tratamiento. El consumo de alimento fue significativamente menor en los grupos que consumieron la solución de fructosa al 21%, en comparación con el grupo CS ($p < 0.05$). Particularmente, los grupos administrados con leche y las leches fermentadas presentaron el menor consumo de alimento ($p < 0.05$). Se ha reportado que la fructosa produce cantidades de insulina más pequeñas durante su consumo, ya que no estimula la secreción de insulina de las células β pancreáticas, a diferencia de la glucosa. La insulina regula la leptina, la cual tendría una concentración reducida. La leptina es un péptido que actual en el sistema nervioso central, es secretada como respuesta a la alimentación para suprimir el apetito (Almanza y col., 2008). Efectos limitados sobre la supresión del apetito, combinado con que la fructosa se ve favorecida por el hígado a ser metabolizada en lípidos resultaría en un aumento de peso, hiperinsulinemia y RI (Basciano y col., 2005; Akram y Hamid, 2013; Bárbara y Ortiz, 2014). Sin embargo, los resultados en este estudio sugieren lo contrario, los niveles de insulina en los grupos de estudio fueron iguales a los del testigo sano, por lo que podría no haberse afectado los niveles de leptina en los grupos que consumieron la solución de fructosa y por consecuencia no se vio alterado su consumo de alimento.

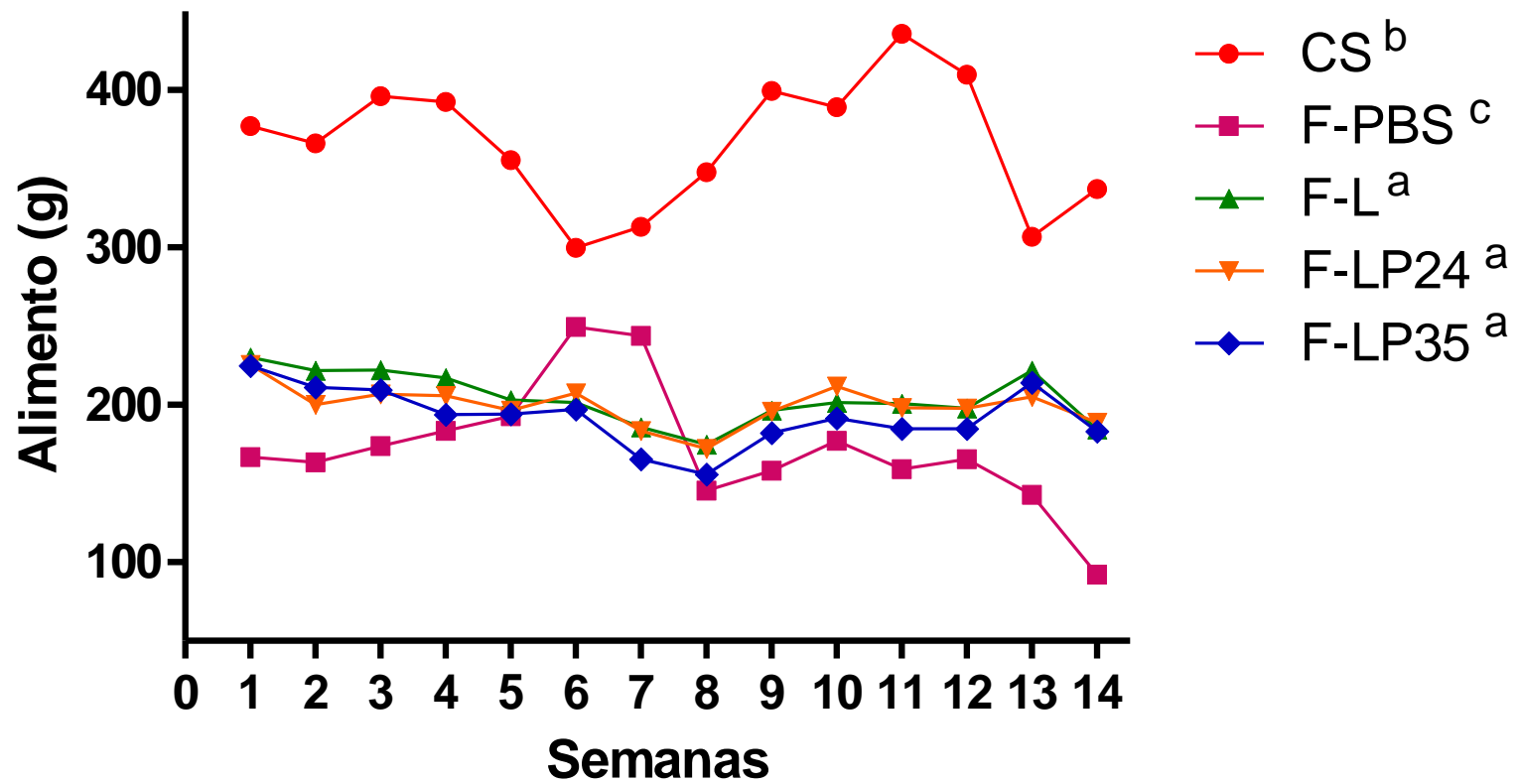


Fig. 14. Consumo de alimento de los grupos en tratamiento del modelo de DT2. Valores expresados en media muestral. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

VI.2.4. Evaluación del Consumo de Agua

En la figura 15 se muestra que el consumo de la solución de fructosa al 21% fue mayor en los grupos que consumieron leche fermentada ($p < 0.05$) con respecto a los grupos testigo (CS, F-PBS y F-L). El mayor consumo de la solución de fructosa al 21% proporcionó energía que resultó en que no hubiera diferencia en peso a pesar de que consumieron menos alimento. Sin embargo, los resultados difieren del estudio de Yadav y col. (2007), que no presentaron diferencias entre el consumo de los grupos testigo administrados con la solución de fructosa al 21%, el grupo que consumió el *dahi* fermentado y la solución de fructosa al 21% y el consumo de agua del grupo control sano.

VI.2.5. Prueba de Tolerancia a la Glucosa

La prueba de tolerancia a la glucosa es un predictor importante de la DT2 (Yadav y col., 2007). En el caso de la PTG en humanos, si a los 120 min de ser iniciada la prueba, los niveles de glucosa en sangre son >200 mg/dL se puede realizar el diagnóstico de DM. En el presente estudio (Fig. 16), los niveles de glucosa para todos los grupos estuvieron por debajo de 150 mg/dL por lo que los animales no fueron diabéticos. En la figura 16 se pudo observar que el grupo F-LP24 presentó niveles de glucosa significativamente menores ($p < 0.05$) que los grupos F-L y F-LP35 e iguales a F-PBS.

Una dieta alta en fructosa induce hiperinsulinemia lo que genera RI y esta se refleja directamente en los niveles de glucosa en sangre (Basciano y col., 2005; Akram y Hamid, 2013; Reyes-Ortiz, 2014). Por lo anterior, estos resultados podrían indicar que la leche fermentada con F-LP24 podría haber disminuido la resistencia a la insulina y reducido la intolerancia a la glucosa.

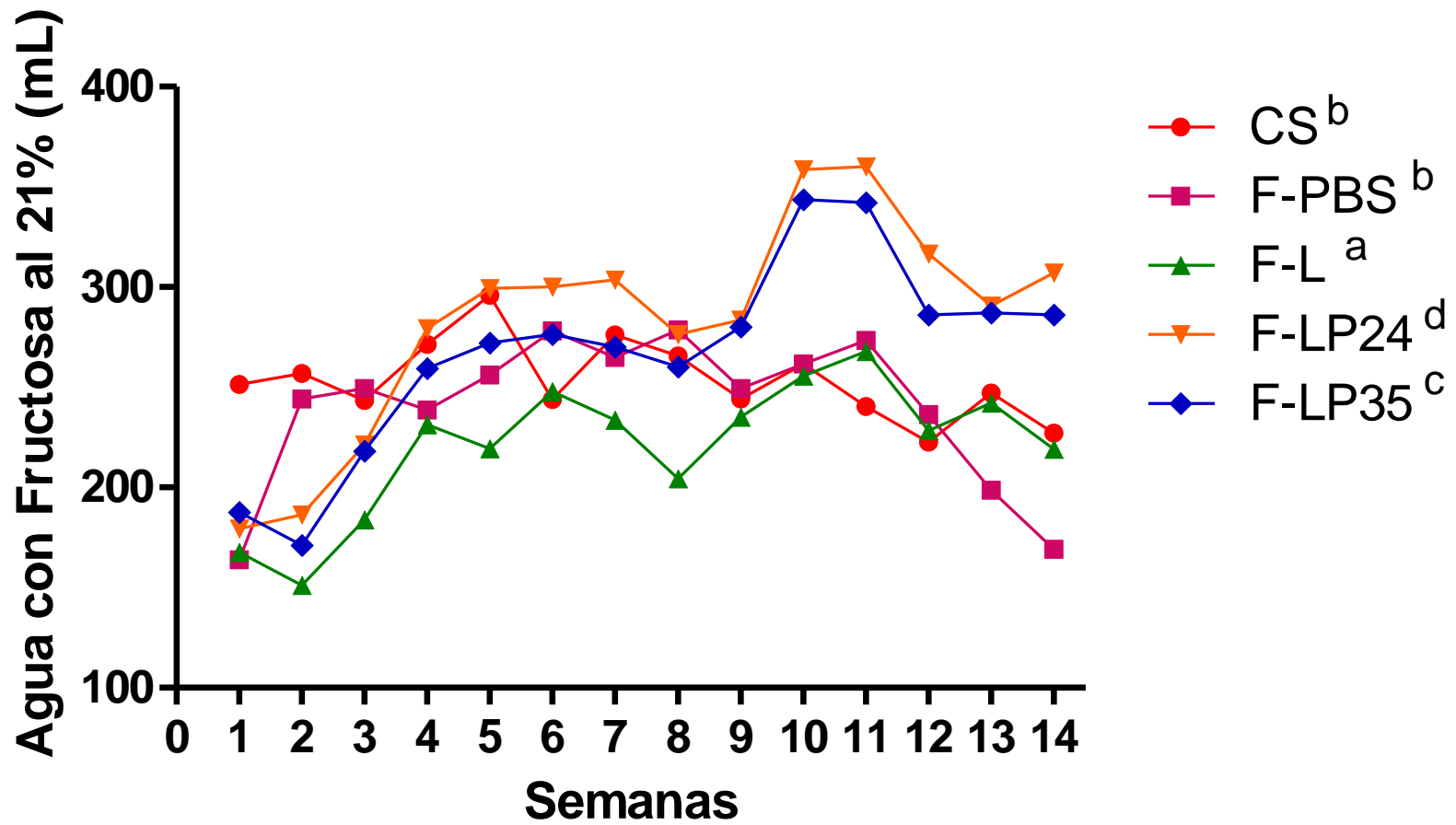


Fig. 15. Consumo de agua con fructosa de los grupos en tratamiento del modelo de DT2. Valores expresados en media muestral. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

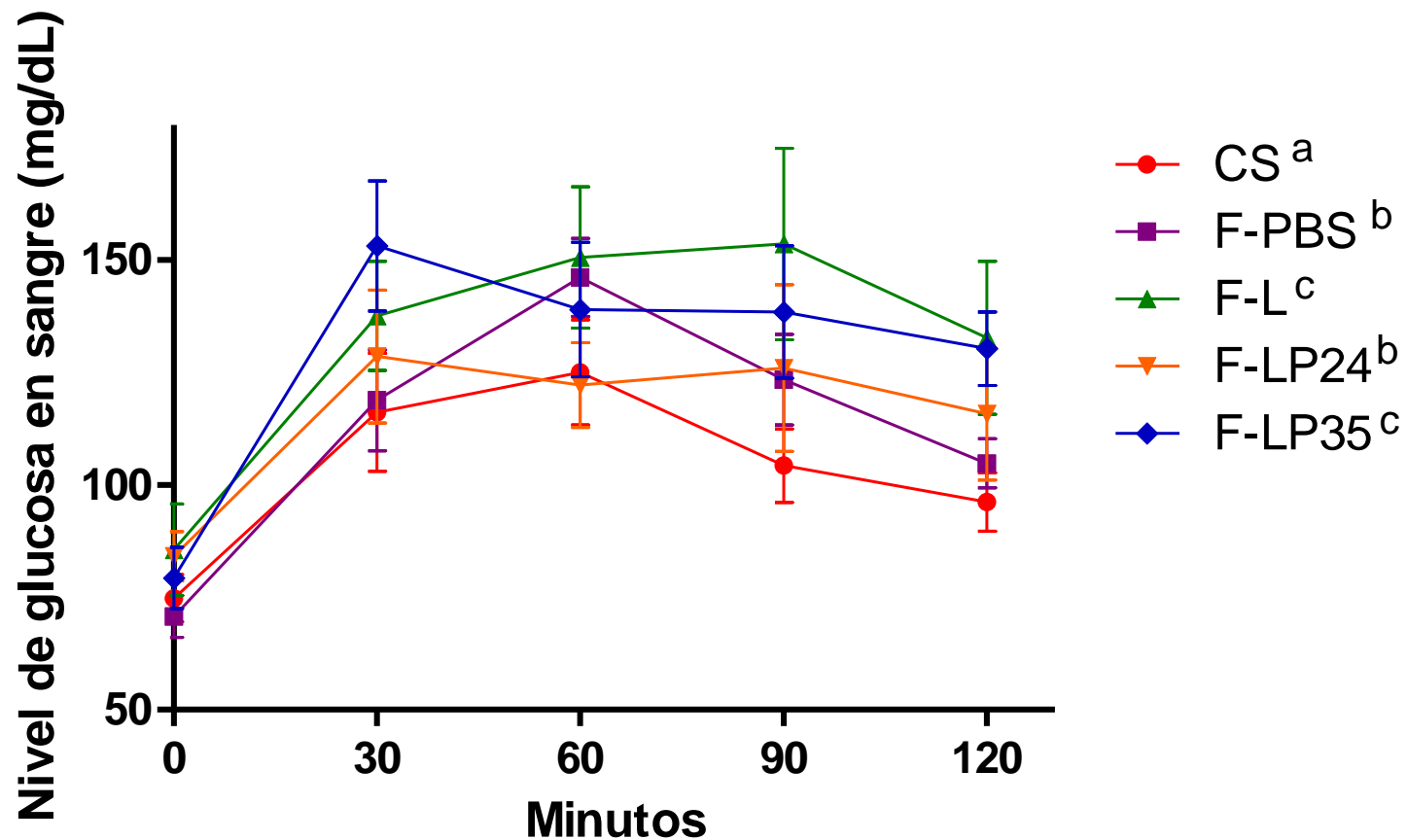


Fig. 16. Efecto de los tratamientos del modelo de DT2 en la prueba de tolerancia a la glucosa al final del tratamiento de 14 semanas (2 g de glucosa/Kg de peso después de un ayuno de 12 h). Los niveles de glucosa fueron medidos de 0 a 120 min. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

VI.2.6. HbA1c e Insulina en Plasma

La tabla 7 muestra los niveles de HbA1c e insulina en suero de los grupos de estudio después de terminado el periodo de tratamiento de 14 semanas. Respecto a HbA1c, los valores en el grupo F-LP24 estuvieron por fuera de los valores límites que establece la prueba de HbA1c (6-12%). Por lo anterior, una explicación podría ser que hubo un problema con la muestra, ya que según lo reportado existe una relación entre la HbA1c y los niveles de glucosa en sangre. Un valor de hemoglobina glicosilada superior al 18% indica un estado clínico con un pésimo control de la diabetes.

Los niveles de glucosa en sangre para el grupo F-LP24 fueron ~100-120 mg/dL durante el tratamiento, por lo que los valores de HbA1c deberían de encontrarse dentro del rango normal de 6.5-8.5% (Páez y col., 2009). Según los resultados de la prueba el grupo F-LP35 y F-L, estos mostraron los niveles mayores de HbA1c, encontrándose dentro de los valores señalados como “diabetes con un buen control” y “diabetes con control regular” según lo indica el manual del kit de la prueba. Estos resultados difieren con los de Yadav y col. (2007) ya que en su estudio, el grupo suplementado con *dahi* y con la solución de fructosa al 21% presentó un valor de HbA1c menor ($4.57 \pm 0.58\%$) que el presentado por los grupos del presente estudio.

En la tabla 7 se presentan los valores de insulina en suero en el modelo de DT2 mostrando que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Estos resultados difieren de estudios en los cuales se mostró un aumento en los niveles de insulina en los grupos a los cuales se aumentó el consumo de fructosa en la dieta, con respecto a los grupos sanos. Yadav y col. (2006) proporcionó a ratas Wistar una dieta con 21% (p/p) de fructosa y observó diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de insulina entre el grupo testigo con DM y el grupo con DM + *dahi* fermentado con *Lactococcus lactis* spp *lactis* biovar *diacetyl lactis* NCDC 60 con respecto al grupo sano. Similarmente, Yadav

Tabla 7. Niveles plasmáticos de HbA1c e insulina de los grupos del modelo DT2

Tratamiento	HbA1c (%)	Insulina (mg/dL)
CS	6.02±0.85 ^a	1.04±0.06
F-PBS	5.53±0.44 ^a	1.05±0.02
F-L	8.93±1.00 ^b	1.03±0.01
F-LP24	28.94±3.40 ^c	1.04±0.06
F-LP35	8.93±1.00 ^b	0.98±0.03

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Superíndices diferentes en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

y col. (2007) administraron a ratas Wistar una solución al 21% de fructosa ad libitum y el dahi fermentado contenía *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. lactis* biovar diacetylactis y encontraron diferencias significativas entre el grupo testigo con DM y el grupo con DM y dahi.

VI.2.7. Lípidos en Plasma

La tabla 8 muestra los niveles de lípidos en suero de los grupos de estudio después de terminado el periodo de tratamiento de 14 semanas. Los niveles de lípidos para el grupo F-LP35 coincidieron con los resultados del estudio de Ramírez-Valdez (2013), ya que se observó el mismo efecto hipolipemiante para la cepa LP35.

El grupo F-LP24 presentó niveles de lípidos significativamente mayores a los demás grupos ($p < 0.05$) con excepción del C-HDL. Los niveles de colesterol total, CC-LDL, C-VLDL y triglicéridos del grupo F-LP35 fueron iguales a los del grupo CS ($p > 0.05$) y diferentes del grupo F-LP24 ($p < 0.05$).

Los estudios de Yadav y col. (2006 y 2007) mostraron que los valores de colesterol total, C-HDL, C-LDL y triglicéridos de los grupos con dieta alta en fructosa (DHFG) fueron iguales al grupo sano ($p > 0.05$). Estudios *in vivo* han demostrado que los probióticos son capaces de disminuir la concentración de colesterol mediante diferentes posibles mecanismos, como la desconjugación de sales biliares mediante la hidrolasa de sales biliares, la asimilación de colesterol, la unión de moléculas de colesterol a las paredes celulares de los probióticos, y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales pueden inhibir la síntesis del colesterol hepático. La capacidad de los probióticos de disminuir el colesterol ha sido reportada en anteriores experimentos en animales (Ejtahed y col., 2011). En pacientes con DT2, los niveles de colesterol total,

Tabla 8. Niveles plasmáticos de lípidos de los grupos del modelo DT2.

Tratamiento	Colesterol total (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)	C-VLDL (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
CS	125.57±17.23 ^b	46.24±5.75	57.54±9.27 ^b	20.54±2.38 ^{bc}	102.70±11.91 ^{bc}
F-PBS	94.58±11.93 ^a	54.52±11.52	26.16±4.30 ^a	12.02±4.05 ^a	60.10±20.26 ^a
F-L	124.14±6.02 ^b	46.32±4.22	53.88±5.56 ^b	23.85±3.52 ^c	119.25±17.64 ^c
F-LP24	166.35±21.62 ^d	47.04±4.68	81.01±11.86 ^c	32.45±2.5 ^d	162.28±12.95 ^d
F-LP35	124.07±17.42 ^b	44.73±3.57	54.70±6.11 ^b	17.55±2.15 ^b	87.78±10.77 ^b

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Superíndices diferentes en una columna indican diferencias significativas (p<0.05).

colesterol LDL y colesterol VLDL aumentan y los de colesterol HDL disminuyen; este estado de alteración en los lípidos aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares de 2 a 4 veces (Ejtahed y col., 2011).

VI.2.8. Antioxidantes (Trolox) en Plasma

La figura 17 muestra los niveles de antioxidantes en suero de los grupos del modelo DT2. Los niveles de antioxidantes en los grupos tratados con leches fermentadas y leche, fueron estadísticamente iguales y superiores a los niveles del grupo control con PBS ($p < 0.05$). En este ensayo valores altos de Trolox indican una buena presencia de compuestos antioxidantes capaces de reducir al reactivo ABTS. El método del ABTS mide la capacidad antioxidante de la parte hidrofílica o acuosa del plasma donde se localizan los compuestos antioxidantes solubles en agua (ácido ascórbico, ácido úrico y proteínas). Por otra parte, los compuestos antioxidantes endógenos (albúmina, bilirrubina, ácido úrico y el glutatión) o enzimas con actividad antioxidante podrían influir en la capacidad antioxidante del plasma, si su concentración se modifica tras el consumo, como es en este caso, de las leches fermentadas (Fernández y col. 2006).

VI.2.9. MDA en plasma

En la figura 18 se observa la concentración de MDA en suero sanguíneo en los distintos tratamientos del modelo de DT2. Los grupos de leche fermentada (LP24 y LP35) mostraron valores menores y significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los grupos testigo. De manera similar, Park y col. (2013) reportaron que la administración de una dieta alta en fructosa 70% (p/p) y *Lactobacillus*, disminuyeron los niveles plasmáticos de TBARS en un 37% y 50% respectivamente.

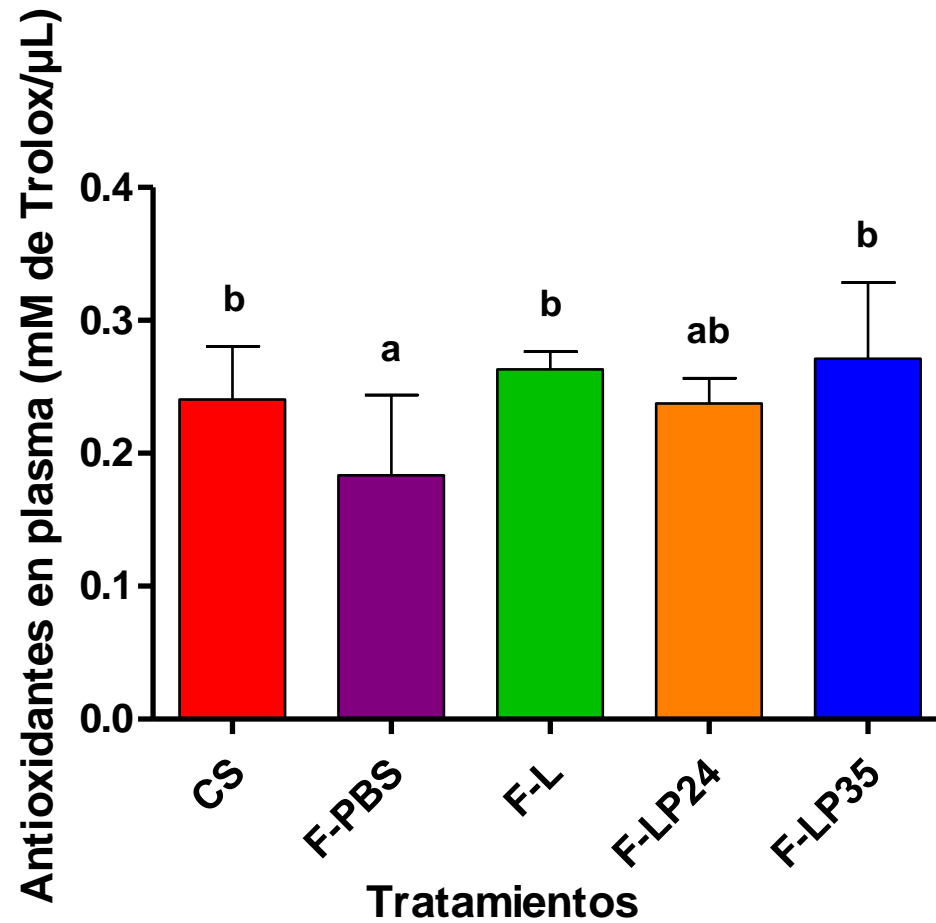


Fig. 17. Antioxidantes totales en plasma de los grupos del modelo DT2. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

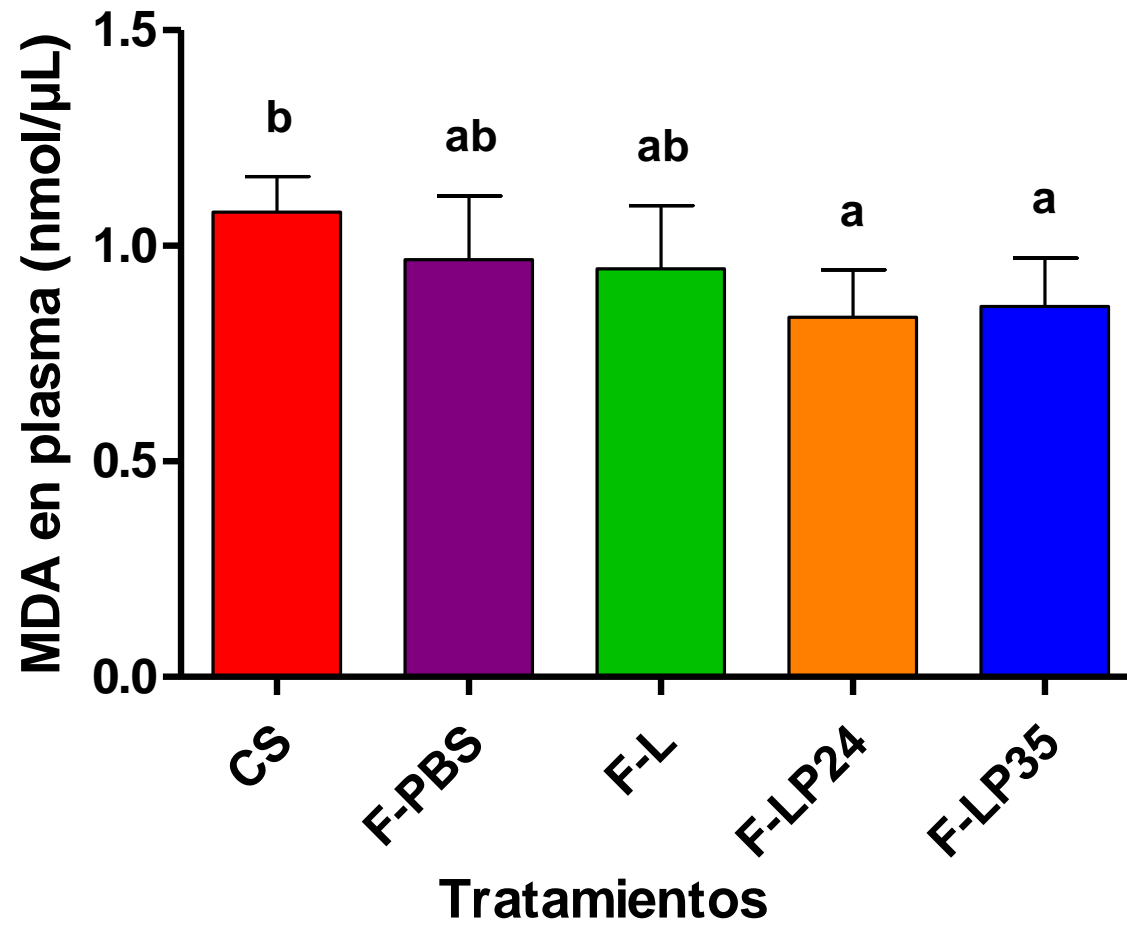


Fig.18. MDA en plasma de los grupos del modelo DT2. Valores expresados en media \pm desviación estándar. Tratamientos con superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Yadav y col. (2007) midieron los niveles de TBARS en hígado de ratas Wistar a las cuales se les proporcionó una solución de fructosa al 21% ad libitum y dahi fermentado y observaron un aumento en los niveles de TBARS de los grupos que consumieron la solución de fructosa. Además, observaron una disminución de dicho parámetro en el grupo que consumió el *dahi*, con respecto al grupo control con fructosa ($p < 0.05$).

El exceso de fructosa en la dieta puede convertirse en triglicéridos a través de la lipogénesis *de novo*, dando como resultado un incremento en la acumulación de lípidos en el hígado y elevados niveles en sangre. Durante un periodo de tiempo prolongado los niveles de lípidos altos a niveles intracelulares y sistémicos pueden causar un aumento en el EO y la inflamación, ambos son iniciadores de resistencia a la insulina, lo que da lugar a un aumento de glucosa en la sangre. Se ha reportado que yogurt con probióticos que contiene cepas de *Lactobacillus* modula los niveles de glucosa en sangre, la insulina en plasma y los niveles de triglicéridos en ratas con dieta alta en fructosa (Park y col., 2013).

En el presente estudio se observó que en el modelo de DT2, la leche fermentada LP35 disminuyó los niveles de lípidos en sangre, por lo que podría disminuir la exposición de los lípidos a los ROS disminuyendo así la reacción de peroxidación. Además, otros estudios han reportado una estimulación en moléculas o enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (Davari y col., 2013; Hsieh y col., 2013; Marazza y col., 2013; Park y col., 2013).

VII. CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que los grupos tratados con STZ tuvieron una elevación drástica en los niveles de glucosa después de la inducción de la DT1. Sin embargo, los grupos de ratas administradas con la leche fermentada LP24 o grupos testigo también presentaron una disminución de los niveles de glucosa, los cuales fueron similares a los de las ratas sanas a las 14 semanas de tratamiento. Además, el efecto hipoglucemiante del tratamiento con leche fermentada LP24 fue confirmado ya que las ratas presentaron los niveles más bajos de HbA1c. Por otro lado, la administración de leche fermentada LP24 podría tener un efecto benéfico a la salud cardiovascular, ya que disminuyó los niveles de C-LDL, aumentó los de C-HDL con respecto al grupo testigo sano y disminuyó la peroxidación de lípidos.

Para el modelo de DT2, se presentó un aumento en los niveles de glucosa en sangre para los grupos con tratamiento que tuvieron una dieta alta en fructosa, con respecto al grupo testigo sano, sin embargo estos se mantuvieron dentro de los niveles normales de glucosa en sangre. El grupo que consumió la leche fermentada LP24 mostró una mejor respuesta en la prueba de tolerancia a la glucosa, no obstante, el efecto hipoglucemiante no pudo ser confirmado.

En este estudio se mostró que la administración de leches fermentadas por LP24 presenta un efecto hipoglucemiante e hipolipemiante en un modelo de DT1. Estos efectos podrían ser atribuibles a una mejora de la absorción de la glucosa por implantación de los *Lactobacillus* en el intestino. Sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan establecer cuáles fueron los mecanismos operantes.

VIII. REFERENCIAS

- Akter, S., Kurotani, K., Nanri, A., Pham, N. M., Sato, M., Hayabuchi, H., & Mizoue, T. (2013). Dairy Consumption is Associated with Decreased Insulin Resistance Among the Japanese. *Nutritional Research*, 33, 286-292.
- Almanza, P. J. C., Blancas, F. G., García, M. R., Alarcón, A. F. J., Cruz, M. (2008). Leptina y su Relación con la Obesidad y la Diabetes Mellitus Tipo 2. *Gac Méd Méx*, 144, 135-142.
- Akram M, Hamid A (2013) Mini review on fructose metabolism. *Obes Res Clin Pract* 7:e89-e94. doi: 10.1016/j.orcp.2012.11.002
- American Diabetes Association (ADA). (2014) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 37:81-90. doi: 10.2337/dc14-S081
- American Diabetes Association (ADA). (2014). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 37.(Suppl. 1). S81-S90.
- American Diabetes Association (ADA). (2015). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 38.(Suppl. 1). S1-S89.
- Angel, M. G., Ángel, R. M. (2006). Interpretación Clínica del Laboratorio. Editorial Medica Internacional. 7ª edición. Bogotá. 730.
- Banerjee, M., & Vats, P. (2014). Reactive Metabolites and Antioxidant Gene Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus. *Redox Biology*, 2, 170-177.
- Basciano H, Federico L, Adeli K (2005) Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2:5. doi: 10.1186/1743-7075-2-5

- Bejar, W., Hamden, K., Salah, R. B., & Chouayekh, H. (2013). Lactobacillus plantarum TN627 Significantly Reduces Complications of Alloxan-Induced diabetes in Rats. *Anaerobe*, 24, 4-11.
- Beltrán-Barrientos. L. M. Estudio Clínico Controlado Aleatorizado del Efecto Antihipertensivo Asociado al Consumo de Leche Fermentada. Tesis para obtener el grado de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Hermosillo, Sonora, 2013.
- Calle, M. C., & Fernández, M. L. (2012). Inflammation and Type 2 Diabetes. *Diabetes & Metabolism*, 38, 183-191.
- Casarotti, S., Monteiro, D. A., Moretti, M. M. S., & Penna, A. L. B. (2014). Influence of the Combination of Probiotic Cultures During Fermentation and Storage of Fermented Milk. *Food Research International*, 59, 67-75.
- Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Gorton, L., & Åkesson, B. (2003). Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13(12), 927-935. doi: 10.1016/s0958-6946(03)00139-0
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, W. (2014). Oral administration of Lactobacillus rhamnosus CCFM0528 improves glucose tolerance and cytokine secretion in high-fat-fed, streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 10, 318-326. doi: 10.1016/j.jff.2014.06.014
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., & Herman, L. (2014). Consumption of Raw or Heated Milk from Different Species: An Evaluation of the Nutritional and Potential Health Benefits. *Food Control*, 42, 188-201.
- Da Silva, M. S., & Rudkowska, I. (2014). Dairy Products on Metabolic Health: Current Research and Clinical Implications. *Maturitas*, 77, 221-228.
- Davari, S., Talaei, S. A., Alaei, H., & Salami, M. (2013). Probiotics Treatment Improves Diabetes-Induced Impairment of Synaptic Activity and Cognitive Function: Behavioral and Electrophysiological Proofs for Microbiome-Gut-Brain Axis. *Neuroscience*, 240, 287-296.
- Eaggapan, K., Sasikumar, S., Ancy, V. J., Mathew, R., Aruna, V., Shah, D. B., Ramalingam, S. (2014). Impact of probiotics Lactobacillus rhamnosus and

Lactobacillus casei on lipoglycemic and antioxidative status of diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(8), 3235-3245. doi: 10.13040/ijpsr.0975-8232.5(8).3235-45

Ejtahed, H. S., Mohtadi, N. J., Homayouni, R. A., Niafar, M., Asghari, J. M., & Mofid, V. (2012). Probiotic Yogurt Improves Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients. *Nutrition*, 28, 539-543.

Federación Internacional de Diabetes (2013) Atlas de la Diabetes de la FID, 6° edición. 159.

Hernández JC, Emiliano M, Puig L, et al (2011) Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin* 58:4-15.

Hsieh F-C, Lee C-L, Chai C-Y, et al (2013) Oral administration of Lactobacillus reuteri GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr Metab (Lond)* 10:35. doi: 10.1186/1743-7075-10-35

Kazeem MI, Davies TC (2016) Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents. *J Funct Foods* 20:122-138. doi: 10.1016/j.jff.2015.10.013

King AJF (2012) The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166:877-894. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x

Lukačínová a, Hubková B, Rácz O, Ništiar F (2013) Animal models for study of diabetes mellitus. *Diabetes mellitus- Insights Perspect* 2030:229-254. doi: 42083

Marazza J a., LeBlanc JG, de Giori GS, Garro MS (2013) Soymilk fermented with Lactobacillus rhamnosus CRL981 ameliorates hyperglycemia, lipid profiles and increases antioxidant enzyme activities in diabetic mice. *J Funct Foods* 5:1848-1853. doi: 10.1016/j.jff.2013.09.005

- Mora H AC, Aragón N DM, Ospina G LF (2009) Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae* 16:311-319.
- Páez IP, Rodríguez Weber FL, Díaz Greene EJ, Jardines RC (2009) Mitos y realidad de la hemoglobina glucosilada. *Med Interna Mex* 25:202-209.
- Park DY, Ahn YT, Huh CS, et al (2013) Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 19:274-283. doi: 10.3748/wjg.v19.i2.274
- Punaro GR, Maciel FR, Rodrigues AM, et al (2014) Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. Nitric Oxide - Biol Chem 37:53-60. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.012
- Reyes-Ortiz, B. (2014) Consecuencias en la salud del consumo excesivo de fructosa. 1:157-162.
- Rodrigues D, Rocha-Santos T a P, Freitas AC, et al (2012) Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods. *TrAC - Trends Anal Chem* 41:27-45. doi: 10.1016/j.trac.2012.08.009
- Rodríguez ML, Vivas G (2003) Localización del daño ocasionado por la Diabetes Mellitus en el eje Hipotálamo-Hipofisario- Gonadal en ratas con diabetes inducida. 32-38.
- Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, et al (2003) Antidiabetic effect of Lactobacillus GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1421-1424. doi: 10.1271/bbb.67.1421
- Yadav H, Jain S, Sinha PR (2007) Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose fed rats. *Nutrition* 23:62-68. doi: 10.1016/j.nut.2006.09.002

Yadav H, Jain S, Sinha PR (2008) Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Dairy Res* 75:189-195. doi: 10.1017/S0022029908003129

Zarfeshani, A., Khaza'ai, H., Mohd Ali, R., Hambali, Z., Wahle, K. W. J., & Mutalib, M. S. A. (2011). Effect of *Lactobacillus casei* on the Production of Pro-Inflammatory Markers in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 3, 168-174.