



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

**LECHE FERMENTADA POTENCIALMENTE  
ANTIINFLAMATORIA COMO COADYUVANTE EN LA  
REGULACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL**

---

Por:

**Amelia Alejandra López Pérez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**


## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Amelia Alejandra López Pérez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



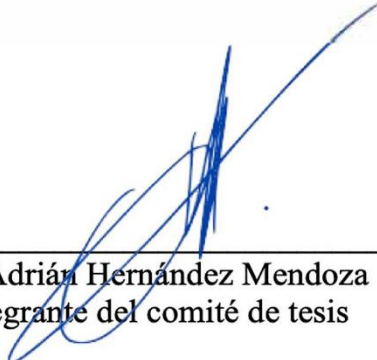
---

Dr. Aarón Fernando González Córdova  
Director de Tesis



---

Dra. Belinda Vallejo Galland  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Adrián Hernández Mendoza  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Lourdes Santiago López  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Leche Fermentada Potencialmente Antiinflamatoria como Coadyuvante en la Regulación de la Permeabilidad Intestinal" 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 de la autora Amelía Alejandra López Pérez, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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 autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD), por abrirme las puertas de sus instalaciones con el fin de ampliar mis conocimientos.

Al proyecto financiado por CONAHCYT “Dilucidando los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas” (CB2017-2018, A1-S-53161).

Agradecimiento especial a mi director de tesis el Dr. Aarón Fernando Gonzáles Córdova por la posibilidad que me ha brindado de adentrarme un poco más en la investigación. Por la confianza depositada en mí, su apoyo, sus enseñanzas, orientaciones y contribuciones en la tesis.

Agradezco a mi comité de tesis, la Dra. Belinda Vallejo Galland, Dr. Adrián Hernández Mendoza y Dra. Lourdes Santiago López por asesorar este proyecto desde el inicio, por sus contribuciones al mismo y por formar parte del Comité de Revisión, por su apoyo y consejos durante el trabajo realizado.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Lácteos, gracias al Dr. Joel García Romo por todo el apoyo durante este trabajo de tesis, así como consejos brindados durante la fase experimental de la utilización de línea celulares. A la M.C. María del Carmen Estrada Montoya por el asesoramiento y apoyo técnico brindado a lo largo de la fase experimental. Al M.C. Ricardo Reyes Díaz, La Dra. María de Jesús Torres y a la Dra. Lilia Beltrán por el apoyo técnico durante toda la estancia de la Maestría.

A la Dra. Ana María Calderón, Dr. Humberto Astiazarán, Dra. Verónica Mata y el Dr. Marcel Martínez por brindarme el acceso a utilizar los equipos de sus laboratorios durante el desarrollo de

este trabajo de tesis.

Muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio de Lácteos por el agradable ambiente de trabajo, a Miguel Rendon, Jesús Ayala, Ramsés, Miriam zambrano, Oscar Espejel, Teresita Castillo, Miguel Pérez, Juan Durazo y Fernanda. A mis amigas Cinthya Kumiko, Arantxa Almada, Maritza Salomón y Diana Hernández, por su amistad, apoyo y gran compañía a lo largo de estos dos años.

## **DEDICATORIA**

*A mi familia*

*Mis papas*

***Dora Amelia Pérez Vanegas***

***Gabriel López Álvarez***

*Mis hermanos*

***Doris Karime López Pérez***

***Gabriel López Pérez***

*Por enseñarme a ser una persona resiliente ante la adversidad,  
Por el apoyo y sabiduría brindada a lo largo de estos años de vida,  
los amo a la distancia, este y los logros que sigan son para ustedes.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>ANTECEDENTES</b> .....	16
2.1. Enfermedades Inflammatorias Intestinales.....	16
2.1.2. Enfermedad de Crohn.....	17
2.1.3. Colitis Ulcerativa.....	17
2.2. Componentes de la Barrera Intestinal.....	18
2.2.1. Funciones de la Barrera Intestinal.....	19
2.2.2. Claudinas.....	19
2.2.3. Moléculas de Adhesión.....	21
2.3. Rutas de Transporte en el Epitelio Intestinal.....	22
2.3.1. Implicaciones de la Barrera Intestinal en las Enfermedades Inflammatorias Intestinales.....	22
2.3.2. Ruta Transcelular.....	23
2.3.3. Ruta Paracelular.....	23
2.4. Permeabilidad Intestinal en las Enfermedades Inflammatorias Intestinales.....	24
2.4.1. Proteínas de Unión y la Permeabilidad Intestinal.....	24
2.4.2. Alteraciones en las Células de Unión en la Permeabilidad Intestinal.....	24
2.5. Evaluación de la Regulación de la Permeabilidad Intestinal.....	25
2.5.1. Métodos de Evaluación de la Regulación Intestinal.....	25
2.5.2. Línea Celular Caco-2.....	26
2.5.3. Marcadores Utilizados en la Regulación de la Permeabilidad Intestinal.....	27
2.6. Alimentos Funcionales como Coadyuvantes de Tratamiento contra EII.....	29
2.6.1. Beneficios del Consumo de Alimentos Funcionales.....	29
2.6.2. Los Alimentos Funcionales como Coadyuvantes de Tratamiento contra EII.....	29
2.7. Leches Fermentadas y Permeabilidad Intestinal.....	31
2.7.1. Leches Fermentadas como Alimento Funcional.....	31
2.7.2. Compuestos Bioactivos de las Leches Fermentadas.....	33
2.7.3. Efectos Antiinflammatorios de las Leches Fermentadas.....	33
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	35

## CONTENIDO (continuación)

4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos.....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1. Microorganismos Empleados.....	37
5.2. Elaboración de Leche Fermentada.....	38
5.2.1. Monitoreo del pH, Acidez, Actividad Proteolítica.....	38
5.2.2. Obtención de Fracciones Peptídicas.....	39
5.3. Ensayos de Viabilidad Celular.....	39
5.3.1. Obtención de Células Polimorfonucleares.....	39
5.3.2. Viabilidad de Células Polimorfonucleares.....	40
5.3.3. Cultivo de la Línea Celular Caco-2.....	41
5.3.4. Evaluación del Efecto Citotóxico de Fracciones Peptídicas en Células Caco-2.....	39
5.3.5. Evaluación de la Permeabilidad Intestinal.....	40
5.3.6. Medición de Resistencia Eléctrica Transepitelial.....	41
5.4. Diseño Estadístico.....	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
6.1. Determinación de Potencial de Hidrógeno.....	43
6.2. Determinación de Acidez.....	44
6.3. Concentración Celular de las Bacterias Ácido Lácticas en Leche Fermentada.....	45
6.4. Proteólisis en Leche Fermentada.....	46
6.5. Ajuste de Proteína por el Método de Lowry.....	47
6.6. Proliferación en Células Polimorfonucleares.....	48
6.6.1. Viabilidad en Células Polimorfonucleares con Fracciones <3 kDa Fermentadas.....	48
6.7. Mantenimiento de la Línea Celular Caco-2.....	50
6.7.1. Cinética de Crecimiento.....	50
6.7.2. Resultados de Ensayos de Citotoxicidad.....	52
6.8. Evaluación de la Permeabilidad Intestinal.....	55
7. CONCLUSIÓN.....	58
8. RECOMENDACIONES.....	59
9. REFERENCIAS.....	60
10. ANEXOS.....	68
10.1. Curva de Crecimiento de <i>Lactobacillus spp.</i> ....	68
10.2. Oficio Aprobación de Comité de Ética.....	73



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proteínas de Unión.....	6
2. Formación de Cristales de Formazán.....	30
3. Valores de pH en leches fermentadas con cepas de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	35
4. Concentración de ácido láctico (g/L) en las leches fermentadas con cepas de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	36
5. Concentración celular en las leche fermentadas por cepas de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	38
6. Resultados de la capacidad proteolítica en leche fermentada por cepas de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	39
7. Porcentaje de viabilidad de las células polimorfonucleares tratadas con las fracciones <3 kDa a diferentes concentraciones de proteína (100, 50 y 30 ug/mL).....	40
8. Curva de crecimiento celular de la línea Caco-2 evaluada durante 16 días (10,000 células/mL, concentración inicial).....	42
9. Imágenes representativas de la línea celular Caco-2. A) células Caco-2 después de 24 h de cultivo.....	44
10. Porcentaje de viabilidad de células Caco-2 tratadas con las fracciones <3 kDa a diferentes concentraciones de proteína (100, 50 y 30 ug/mL) y tiempos de incubación...	45
11. Valores de la resistencia transepitelial durante el manteniemiendo de la línea celular Caco-2.....	48
12. Valores de TEER en células Caco-2 tratadas con LPS y la fracción <3 kDa de la leche fermentada con <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J27.....	50

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
1. Marcadores utilizados para la regulación de la permeabilidad intestinal.....	17
2. Tratamientos utilizados para la regulación de las enfermedades inflamatorias intestinales.....	19
3. Productos lácteos fermentados con potenciales efectos antiinflamatorios.....	21
4. Antecedentes de efectos antiinflamatorios de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas.....	24
5. Cepas ácido lácticas spp. Utilizadas para el cultivo de trabajo.....	26
6. Cuantificación de proteína .....	47

## RESUMEN

La permeabilidad intestinal juega un papel importante en mantener la homeostasis entre agentes internos o externos. Sin embargo, un desequilibrio de la homeostasis conlleva a una respuesta inflamatoria y por tanto se pueden producir diferentes moléculas inflamatorias. En este sentido, se han buscado alternativas para coadyuvar a regular la permeabilidad intestinal. En particular, leches fermentadas han demostrado potencial efecto en estudios *in vivo* para regular marcadores inflamatorios a nivel sistémico y localizado. Es por ello que el propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto de fracciones acuosas derivadas de leches fermentadas con cepas específicas de *Limosilactobacillus* spp., y *Lactiplantibacillus* spp., en la viabilidad y regulación de la permeabilidad intestinal en células periféricas de sangre y Caco-2. Leches fueron fermentadas con cepas de *Limosilactobacillus fermentum* J27, *Lactiplantibacillus pentosus* J24 y J27, y *Lactiplantibacillus plantarum* J25. Se evaluaron sus propiedades tecnológicas como cambio de pH, acidez (g de ácido láctico), proteólisis (grupos amino libres) y concentración celular (UFC/mL). Posteriormente, se obtuvieron fracciones <3 kDa para evaluar el efecto citotóxico en células polimorfonucleares y Caco-2, así como su efecto en el mantenimiento de la integridad de la monocapa de células Caco2 (resistencia transepitelial) como marcador de permeabilidad intestinal. En las propiedades tecnológicas, el pH descendió de 6.80 a 4.96, la acidez incrementó a 4.9 y 5.6 g de ácido láctico, un incremento en la concentración celular de hasta 2 ciclos logarítmicos, y un aumento en la concentración de amino libre (L-leucina) de 2.8 (leche testigo) a 3.5 mg/mL, destacando la leche fermentada con *L. fermentum* J23. La concentración de 30 ug/mL de proteína mostró el porcentaje más alto de viabilidad, superior al 89%, para los dos tipos de células evaluadas. En esta determinación, la leche fermentada con la cepa J27 mostró los mejores porcentajes de viabilidad celular en células periféricas y Caco-2. La resistencia transepitelial de la monocapa de las células Caco-2 tratadas con LPS y la fracción de la leche fermentada mantuvo la integridad de la monocapa con un valor de TEER de 305  $\Omega$  /cm<sup>2</sup> a las 48 h comparado con el testigo. Con los hallazgos obtenidos, se podría sugerir que la fracción derivada de la leche fermentada con la cepa J27 podría estar involucrada en promover la regulación de la permeabilidad intestinal *in vitro*.

**Palabras clave:** Permeabilidad, células, péptidos, resistencia transepitelial.

## ABSTRACT

Intestinal permeability plays an important role in maintaining the homeostasis between internal or external agents. However, an imbalance of homeostasis leads to an inflammatory response and promotes the production of different inflammatory molecules. Therefore, different alternatives that may help regulate intestinal permeability have been studied. In particular, *in vivo* studies have shown that fermented milks may regulate inflammatory markers at systemic and localized levels. Hence, the aim of the present work was to evaluate the effect of aqueous fractions derived from fermented milks with specific strains of *Limosilactobacillus* spp. and *Lactiplantibacillus* spp. on the viability and regulation of intestinal permeability in peripheral blood cells and Caco-2 cells. Milks were fermented with the strains of *Limosilactobacillus fermentum* J27, *Lactiplantibacillus pentosus* J24 and J27, and *Lactiplantibacillus plantarum* J25. Then, the technological properties such as pH, acidity (g lactic acid), proteolysis (free amino groups) and cell concentration (CFU/mL) were evaluated. Subsequently, fractions <3 kDa were obtained to determine the cytotoxic effect on polymorphonuclear and Caco-2 cells, as well as their effect on maintaining the integrity of the Caco-2 cell monolayer (transepithelial resistance) as a marker on intestinal permeability. Results showed that for the technological properties, pH decreased from 6.80 to 4.96, acidity increased between 4.9 and 5.6 g lactic acid and an increase of 2 logarithmic cycles in cell concentration were observed. Also, an increase in free amino acid (L-leucine) concentration from 2.8 (control milk) to 3.5 mg/mL was shown; specifically, fermented milk with *L. fermentum* J23 showed the highest proteolysis. Moreover, 30 µg/mL of protein from fermented milks showed the highest viability (>89%) in both cell lines. Particularly, fermented milk with J27 showed the highest cell viability in peripheral and Caco-2 cells. Additionally, the transepithelial resistance of Caco-2 cells monolayer treated with LPS and the fermented milk fractions (30 µg/mL) maintained the integrity of the monolayer with a TEER value of  $305 \Omega / \text{cm}^2$  at 48 h compared to the control. In conclusion, the fraction (30 µg/mL) from fermented milk with J27 may be involved in the regulation of intestinal permeability *in vitro*.

**Keywords:** Inflammation, fermented milk, polymorphonuclear cells, Caco-2, permeability.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) es una patología de etiología multifactorial, de la cual se deriva la colitis ulcerativa (CU) y enfermedad de Crohn (EC). La incidencia de las EII reportado por Medina (2013), en el Reino Unido la incidencia es de 5.2 /100.000 habitantes de EII (3.1 EC; 1.9 CU), en Norteamérica es de 7.1/100.000 (4.5 EC) y en Francia, 5.2 y 0.8/100.000 para la EC y CU, respectivamente. Por otro lado, datos reportados por Ng y col. (2017), indicaron que 15 de 18 estudios fueron diagnosticados con mayor incidencia para CU.

Las EII se caracterizan por generar una respuesta inflamatoria en el sistema gastrointestinal además de involucrarse factores genéticos, ambientales y cambios en la microbiota, lo que conlleva a una destrucción de la barrera intestinal y que puede influenciar la permeabilidad intestinal (Lacerda *et al.*, 2021; Rojas *et al.*, 2020).

La barrera intestinal está constituida de células epiteliales que se enlazan por la unión de proteínas estrechas o “Tight-Junction” (TJ, por sus siglas en inglés), las cuales tienen un papel importante para regular la permeabilidad intestinal al conferir selectividad al flujo de iones, pequeñas moléculas y solutos (Galipeau, & Verdu, 2016; Lacerda *et al.*, 2021). Sin embargo, en el desarrollo de las EII se tiene una ruptura de la barrera de la mucosa, o se tiene lo que se conoce como "intestino permeable" (Ahmad *et al.*, 2017), lo cual promueve la exposición del contenido luminal y promueve una respuesta inmunológica en el intestino (Michielan, & D’Inca, 2015). Por ejemplo, se ha observado que pacientes que sufren de EII presentan alteraciones en la barrera de mucosa desde la composición de la capa de la mucosa hasta las moléculas de adhesión que regulan la permeabilidad paracelular. Estas alteraciones pueden representar una disfunción primaria en la EC, pero también puede promover la inflamación crónica de la mucosa en la CU (Salvo-Romero *et al.*, 2015), y un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (Por ej., TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-8) (Silva *et al.*, 2019).

Así mismo, la expresión y redistribución de las proteínas de unión (occludinas, claudinas, moléculas

de adhesión) se ven disminuidas en pacientes con EII. Por ejemplo, en algunos estudios con pacientes que desarrollaron esta enfermedad, mostraron una reducción de las proteínas claudina-3, -5 y -8 y de ocludina, así como una redistribución de la claudina- 5 y -8 (Bischoff *et al.*, 2014). Así mismo, en estudios con animales por ejemplo, se ha observado que en un proceso de inflamación colónica se tiene la supresión de claudina-7 (Michielan, & D'Inca, 2015; Tanaka *et al.*, 2015).

En este sentido, se han buscado estrategias que ayuden a regular el proceso de inflamación intestinal y disminuir el daño a la barrera intestinal. Una de estas estrategias es a través del consumo de alimentos fermentados funcionales (Limketkai *et al.*, 2018). El consumo de estos alimentos y/o los metabolitos (Por ej., polifenoles, aminoácidos, minerales, y vitaminas) que se producen durante la fermentación han demostrado ejercer efecto y regular la expresión de claudina-4, zonulina-2, ocludina y claudina-1 (Liu *et al.*, 2017; Miyoshi *et al.*, 2018).

En particular, las leches fermentadas con bacterias ácido lácticas (BAL) específicas han demostrado efectos antiinflamatorios en un modelo *in vivo* al disminuir citocinas como TNF, IFN, e IL-17 (Santiago-López *et al.*, 2018; 2019). En particular, los componentes derivados de la fermentación láctea (péptidos, exopolisacáridos, vitaminas, ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos) podrían estar involucrados en la función de la barrera intestinal (Sígala-Robles *et al.*, 2022). Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar el papel que juega la administración de leche fermentada potencialmente antiinflamatoria como un coadyuvante en la regulación de la permeabilidad intestinal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Enfermedades Inflammatorias Intestinales

Las EII se definen como una condición de inflamación crónica dentro del tubo digestivo (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017). Estas enfermedades afectan de manera importante la calidad de vida de quienes la padecen requiriendo tratamientos prolongados o permanentes dependiendo de la severidad (Figueroa, 2019). Sin embargo, a pesar de que en los últimos años ha aumentado su estudio, aún se desconoce la causa principal, ya que al ser de etiología multifactorial, ésta puede ser ocasionada por factores ambientales, genéticos y por cambios en la microbiota. Entre sus posibles causas se encuentra la influencia de la dieta, el rol en el microambiente intestinal como la influencia en funciones de inmunidad, barrera intestinal y de la composición de la microbiota intestinal (Escaffi *et al.*, 2021).

La determinación de las EII requiere de un primer diagnóstico el cual es detectado con la detección de problemas gastrointestinales del paciente. Entre los síntomas que se presentan son diarrea por más de 4 semanas y heces con pus y sangre. Una vez que se tienen los indicios de una posible EII se realiza una endoscopía y biopsia (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2017). La importancia del estudio de estas enfermedades radica en su incidencia mundial, ya que se encuentran reportadas en distintos países. Por ejemplo, en Europa (Reino Unido y Francia se presenta una incidencia de 5.2% y 5.9% de EII por cada 100.000 habitantes, en Corea del Sur 2.6% y en Norte américa 7.1% por cada 100.000 y desde 1990, aumentó su incidencia en los países de África y Asia (Ng *et al.*, 2017; Figueroa, 2019).

El estudio realizado por Yamammoto-Furusho y colaboradores (2020) mostraron datos que reflejan una tendencia a aumentar el desarrollo de las EII a nivel mundial; siendo América Latina una de las regiones con mayor expansión. Sin embargo, en el caso específico de México no se tiene información sobre el índice de prevalencia de estas enfermedades.

### **2.1.1. Enfermedad de Crohn**

La EC es una enfermedad crónica que se encuentra asociada a una respuesta inmunológica alterada, su forma de presentación varía en función de la localización, extensión, y patrón de la enfermedad. La zona donde se presenta dicha afección es la zona final del intestino delgado (íleon) e inicios del ciego (López, 2005). En esta enfermedad se suelen presentar síntomas como fiebre, anorexia, pérdida de peso, y en niños afecta su crecimiento y maduración puberal (Ferré *et al.*, 2018). Los tratamientos que se administran para contrarrestar los efectos inflamatorios son sulfasalazina mesalamina y olsalazina, corticoides, inmunosupresores, así como la administración de algunos antibióticos (metronidazol y ciprofloxacina). Sin embargo, se recomienda que el paciente lleve una nutrición adecuada (Leiva, 2014), por lo que el estudio de la nutrición en esta enfermedad es un campo de investigación de interés como coadyuvante en su tratamiento.

### **2.1.2. Colitis Ulcerativa**

La CU es la enfermedad inflamatoria intestinal más frecuente que afecta principalmente al colon con inicio en el recto y extensión continua hasta el ciego. Esta enfermedad se puede presentar en 3 grados dependiendo de su severidad: proctitis, proctosigmoiditis y colitis izquierda (Meyer y Treton, 2018). Los síntomas que presentan son: hemorragias, dolor abdominal, fiebre y manifestaciones extraintestinales. Datos estadísticos reportados por Loftus y Sandborn (2002), indican que la prevalencia de la CU es más alta en hombres y se tiene reportado dos picos de incidencia por edad (15-30 y 50-70 años). Por consiguiente, su tratamiento puede ser quirúrgico y farmacológico. En este último se recomienda el uso de antiinflamatorios (corticoides y aminosalicilatos) e inmunomoduladores (ciclosporina y azatioprina) (Meyer y Treton, 2018). Sin embargo, algunos de estos fármacos presentan efectos secundarios tales como insuficiencia renal e hipertensión arterial (Maroto & Hinojosa, 2005). Es por ello que se buscan alternativas menos abrasivas para minimizar la sintomatología de CU.



Por otro lado, ya que esta enfermedad se caracteriza por el daño a la mucosa, se utilizan marcadores sobre la secreción de moco producido para cubrir el epitelio intestinal, y comúnmente utilizan la cantidad de células calciformes para evaluarlo (Michielan & D'Inca, 2015). Los marcadores fecales que se han utilizado para el diagnóstico son principalmente la calprotectina y lactoferrina, ya que permiten identificar actividades inflamatorias en el tracto gastrointestinal (Bermejo *et al.*, 2012). En general, pacientes con CU muestran una reducción en las células calciformes, por lo tanto, un menor recubrimiento de la capa de moco, por lo que se sigue en la búsqueda de tratamientos más efectivos con una menor invasión en la mucosa intestinal (Michielan & D'Inca, 2015). Es por ello que es importante tener en consideración cómo es que se compone la barrera intestinal que promueve este tipo de alteraciones en la mucosa e inducen la aparición de EII.

## 2.2. Componentes de la Barrera Intestinal

La barrera intestinal es la división física entre la mucosa y la luz luminal, la cual está compuesta por componentes celulares y extracelulares (Salvo-Romero *et al.*, 2015). La primera línea perteneciente a los compuestos extracelulares se encuentra en el lumen intestinal, donde se encuentran las enzimas digestivas. Además, cuenta con una capa de moco que recubre el epitelio intestinal constituidas por células calciformes, la cual, previene la adhesión de bacterias. Los componentes celulares se encuentran células calciformes y enteroendocrinas, donde la primera promueve la secreción de moco y la segunda promueve la secreción de hormonas gastrointestinales, además que entre sus principales funciones son el transporte de los alimentos hasta llegar a su absorción (Farré *et al.*, 2020; Salvo-Romero *et al.*, 2015).

### 2.2.1 Funciones de la Barrera Intestinal

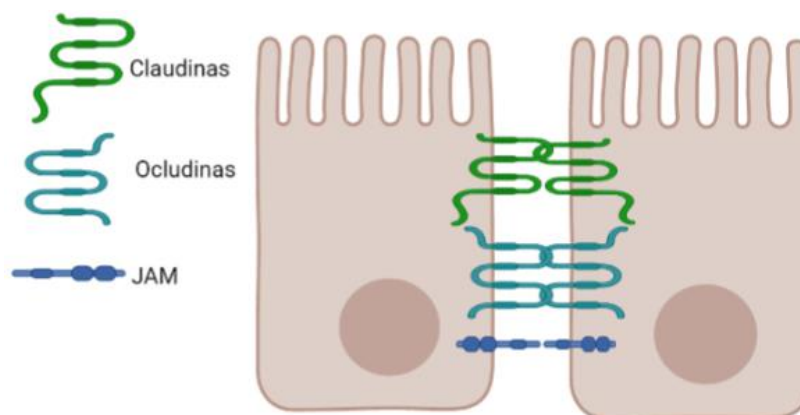
La barrera intestinal se encuentra en contacto constante con ambientes externos e internos, actuando de manera selectiva y realizando constantes movimientos que controlan la absorción de

solutos y restringen el acceso de patógenos (Garcia-Hernandez *et al.*, 2017). Este sistema complejo se ve regulado por uniones estrechas, adherente y desmosomas, las cuales desempeñan un papel importante en la ruta de absorción paracelular. Las uniones adherentes estabilizan los contactos intercelulares y están conectadas al citoesqueleto de actina. Por otro lado, los desmosomas son importantes para la unión de células y de sitios de anclaje. Mientras que las uniones estrechas se encargan de regular el paso del agua y ciertas moléculas (Inczefi *et al.*, 2022).

Estas funciones son reguladas principalmente por las “proteínas de unión estrecha”, entre las que podemos encontrar a las proteínas transmembrana como son claudinas, ocludinas, moléculas de adhesión y la zonulina (proteínas citoplasmáticas) que coordina la interacción con el citoesqueleto (Garcia-Hernandez *et al.*, 2017; Inczefi *et al.*, 2022). Aunado a lo anterior, el epitelio intestinal se encuentra disperso de manera empaquetada en las denominadas criptas y a medida que éstas se renuevan se ven perjudicadas las funciones de barrera (Koch y Nusrat, 2012). En este sentido, las proteínas de unión juegan un papel importante para regular la absorción de nutrientes, y evitar la translocación de agentes externos hacia el lumen intestinal.

### **2.2.2. Claudinas**

Las claudinas son una familia de proteínas de membrana con un peso molecular de 21-28 kDa que tienen la función de sellar poros donde para evitar la pérdida de electrolitos y agua. Actualmente se encuentran reportadas 27 claudinas y estructuralmente se han identificado la clau-15, clau-4 y clau-19. Las claudinas -1,-3, -4,-5,-6 y -8 tienen la capacidad de formar poros paracelulares debido a su composición de aminoácidos; mientras que, en un segundo bucle se regulan las interacciones entre claudinas y entre células (Garcia-Hernandez *et al.*, 2017). Como se muestra en la figura 1, estas proteínas forman parte de la vía paracelular por lo que su estudio es de importancia para evaluar la regulación del paso de las macromoléculas y agentes patógenos.



**Figura 1.** Proteínas de unión estrecha. JAM: moléculas de adhesión.

Aunado a lo anterior, la alteración del tamaño del poro paracelular provoca que se desequilibre la homeostasis intestinal provocando una alteración en la permeabilidad intestinal. El estudio reportado Lynn y colaboradores (2020), reportaron que la sobreexpresión, eliminación y mutación de estas proteínas causan cambios en la vía paracelular. Asimismo, Zeissing y colaboradores (2007), demostraron que la reducción de expresión de claudinas (-3, -5 y -8) se asocia con el desarrollo de EC y para CU se ha asociado con la expresión de claudinas -1 y -4 (Bischoff *et al.*, 2014). Adicionalmente, las claudinas participan en el desarrollo de la morfología de las uniones estrechas, ya que al afectar su interacción con el citoesqueleto conlleva a la formación de la estructura de volantes de unión estrecha y puntas de unión estrecha, y su formación no lineal influyen en la fuga de la barrera paracelular, lo que a su vez indica una alteración de ensamblaje de las proteínas de unión (Lynn *et al.*, 2020).

### 2.2.2. Ocludinas

Las ocludinas son las primeras proteínas de unión identificadas. Esta proteína codifica para 504 aminoácidos polipeptídicos, cuenta con 4 sitios hidrofóbicos y dos bucles extracelulares e intracelulares y con 5 dominios (Feldman *et al.*, 2005). Uno de sus dominios es el C-terminal, el cual, tiene la capacidad de interactuar con proteínas intracelulares de las TJ, como las Zonula Occludens, que se utilizan para la unión con el citoesqueleto de actina (Lynn *et al.*, 2020). Por otro

lado, la ausencia del dominio N-terminal afecta la unión de las proteínas de unión entre las células intestinales (Feldman *et al.*, 2005).

Además, se ha reportado que la reducción de la ocludina aumenta el paso de las macromoléculas por la vía paracelular, lo que indica su papel en el ensamblaje y mantenimiento de TJ (Lee, 2015). El estudio realizado por Kim & Kim (2017), demostraron que la baja expresión de esta proteína afecta el flujo de las macromoléculas, por lo que necesita su regulación para mantener las funciones de la barrera intestinal.

### **2.2.3. Moléculas de Adhesión**

Las moléculas de adhesión (JAMs) son proteínas de la superficie celular que median la interacción entre las células o la matriz extracelular. En este grupo podemos encontrar cuatro familias que son inmunoglobulinas, integrinas, caderinas y selectinas (Aliahmat *et al.*, 2012). Además, son receptores transmembrana perteneciente a las inmunoglobulinas localizadas de manera adyacente a las TJ, con la función de formar interacciones heterofílicas y homofílicas. Sin embargo, a diferencia de otras proteínas no induce la formación de hebras para TJ, sino que están involucradas con la polaridad celular (Garrido-Urbani *et al.*, 2014). La proteína JAM-A ayuda en la regulación de la barrera epitelial de TJ al influir en la expresión de claudinas y la dinámica existente entre la actina y miosina, influyendo en las propiedades de formación de poros de TJ y la vía paracelular (García-Hernández *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que estas proteínas son las primeras en entrar en contacto con la unión entre células epiteliales, estabilizándose al interactuar con la zonulina y de esta manera contribuir a la formación del citoesqueleto de actina y finalizar la unión con las claudinas y ocludinas (Tsukita *et al.*, 2001). Además, otra forma de interacción con esta vía es al momento de ser reubicadas tras estímulos inflamatorios con IFN- $\gamma$ , OxLDL y TNF- $\alpha$ , aumentando la permeabilidad de la barrera (Garrido-Urbani *et al.*, 2014).

## 2.3. Rutas de Transporte en el Epitelio Intestinal

### 2.3.1. Implicaciones de la Disfunción de la Barrera Intestinal en las Enfermedades Inflamatorias Intestinales

Entre las funciones del epitelio intestinal se encuentra el digerir los alimentos y la absorción de nutrientes de pequeñas moléculas (<0.4 nm). De esta manera, el epitelio permite crear una barrera física y bioquímica, reteniendo los patógenos, alérgenos y toxinas en la luz luminal (Smecuol, 2005). Es por ello que cuando existe un desbalance de la homeostasis de la barrera intestinal se genera una respuesta inflamatoria, lo que conlleva a un aumento de la permeabilidad intestinal (Gómez-Cortés *et al.*, 2015; Bischoff *et al.*, 2014). Este daño trae consigo un aumento de mediadores inflamatorios a nivel sistémico, como es la producción de citocinas (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) y endotoxinas como el LPS (Li *et al.*, 2008). El mecanismo de defensa intestinal depende de interacciones de los compuestos de barrera mencionados anteriormente (capa de moco, péptidos antibacterianos, inmunoglobulina A y uniones estrechas) (Suzuki, 2020). Por lo que mantener regulada la permeabilidad intestinal es un factor clave para evitar alteraciones que conlleven al desarrollo de enfermedades. Este transporte selectivo se lleva a cabo a partir de dos vías principales, la paracelular y la transcelular.

### 2.3.3. Ruta Transcelular

La ruta transcelular permite el paso de moléculas a través de la membrana de las células epiteliales desde la región luminal hasta la basolateral, realizando la difusión de moléculas a través de espacios intercelulares (en esta última no depende de un gasto energético (Por ejemplo, transportes activos que dependen de la hidrólisis de ATP). En esta ruta existen diferentes mecanismos por ejemplo compuestos lipofílicos e hidrofílicos pasan por la ruta transcelular (Farré *et al.*, 2020; Gómez-Cortés *et al.*, 2015). Además, la permeabilidad se ve mediada por transporte activo (aminoácidos,

azúcares y vitaminas), endocitosis (moléculas grandes y bacterias en vesículas) y exocitosis. Por otro lado, en el intestino, la claudina-2 forma canales selectivos de cationes, los cuales disminuyen la permeabilidad transepitelial (Wells *et al.*, 2017).

### **2.3.2. Ruta Paracelular**

La comprensión del movimiento bidireccional de líquido dentro y fuera del intestino abarca la generación de iones y solutos que dependen del ATP desde el epitelio, el cual impulsa el flujo osmótico a través de ambas vías (Buddington *et al.*, 2021). La ruta paracelular es la vía regulada por las uniones estrechas epiteliales mencionadas con anterioridad (Lee, 2015). Entre los compuestos que pasan por esta ruta se encuentran iones, agua y compuestos hidrofílicos de entre 400 Da y 10-20 kDa con una permeabilidad de moléculas grandes (>0.5-0.6 nm) (Smecuol, 2005). Además, se ha reportado recientemente que la regulación de la permeabilidad paracelular tiene dos tipos de poros que son regulados por las uniones estrechas. El primer poro es más selectivo con una carga alta y permeable para moléculas pequeñas sin carga y el segundo tiene un mayor tamaño con capacidad permeable para moléculas más grandes sin importar la carga de estas (Farré *et al.*, 2020). Es por ello la importancia de su regulación, ya que si se encuentra una alteración puede permitir el paso a patógenos o moléculas de gran tamaño que puede llevar consigo a una alteración en sistema inmune y con ello a una respuesta inflamatoria.

## **2.4. Permeabilidad Intestinal en las Enfermedades Inflamatorias Intestinales**

### **2.4.1. Proteínas de Unión y la Permeabilidad Intestinal**

La alteración de la barrera de las uniones estrechas en el epitelio resulta en una inflamación sistémica y tiene un rol importante sobre la patogénesis de varios trastornos de enfermedades

inflamatorias debido a su aumento en la permeabilidad (Suzuki, 2020). Estudios clínicos han demostrado la relación que tiene la disminución y reacomodo de las proteínas de unión JAM-A, claudina (-5, -3 y -8) y ocludinas, en pacientes con EC y CU (Lee, 2015). Sin embargo, las proteínas de unión más reportadas que intervienen en el aumento de la permeabilidad son las claudinas. En biopsias humanas de pacientes con alguna de las EII reportaron cambios en el contenido celular y expresión alterada de claudinas (Ahmad *et al.*, 2017). Por lo que, el mantenimiento y protección de las uniones estrechas utilizando factores dietéticos-nutricionales podría ser efectivo para prevenir enfermedades.

#### **2.4.2. Alteraciones en las Proteínas de Unión en la Permeabilidad Intestinal**

La mucosa del intestino tiene dos funciones, permitir la existencia entre microorganismos benéficos y el hospedador sin provocar una inflamación y actuar de manera defensiva ante patógenos provocando una respuesta inflamatoria (Bischoff *et al.*, 2014). Ha sido reportado que las EII se ven relacionadas con la disminución de la expresión de los constituyentes de las uniones estrechas (occludinas, claudinas y moléculas de adhesión). Con relación a lo anterior, en un modelo murino se observó la inflamación del colon al eliminar la claudina-7 indicando un aumento en la permeabilidad y una inflamación en la mucosa (Ahmad *et al.*, 2017). Los mediadores que promueven la inflamación a nivel luminal incitan a cambios en la organización de las proteínas de las uniones estrechas. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) aumenta la permeabilidad intestinal, provocando erosiones en la mucosa, las cuales, se atribuyen a la alteración de las uniones estrechas (Gómez-Cortés *et al.*, 2015).

En el caso de las EII, la permeabilidad se encuentra alterada y esta aumenta la translocación de estímulos proinflamatorios hacia la lámina propia lo que promueve cambios inflamatorios mediados por citocinas, lo que resulta en un cambio en la permeabilidad (Wells *et al.*, 2017). Esto se sustenta en que la interrupción de las uniones y el aumento de la permeabilidad paracelular, seguidos de la penetración de moléculas proinflamatorias lumbinales, pueden inducir la activación del sistema inmunitario de la mucosa, lo que da como resultado una inflamación sostenida y daño

tisular (Lee, 2015). En modelos murinos se ha demostrado que TNF- $\alpha$  tiende a tener una expresión elevada en el intestino de pacientes con EC, y al inhibirse se logra una reversión de colitis. Siendo de importancia en el desarrollo de EII, porque cuando se utilizan tratamientos de anti-TNF se modula la respuesta inflamatoria lo que trae consigo una permeabilidad intestinal regulada (Silva *et al.*, 2019; Lee, 2015).

Además, la respuesta producida por el aumento en la permeabilidad intestinal induce una respuesta hepática adaptativa que altera la homeostasis, activando cascadas de señalización lo que promueve respuestas proinflamatorias reflejándose en la producción de citocinas como las interleucinas y TNF- $\alpha$  (Silva *et al.*, 2019). En la actualidad se cuenta con diversas técnicas para la evaluación de la regulación intestinal (Bischoff *et al.*, 2014), lo que permite el estudio de manera no invasiva para la detección del grado de permeabilidad en EII.

## 2.5. Evaluación de la Regulación de la Permeabilidad Intestinal

### 2.5.1. Métodos de Evaluación de la Regulación Intestinal

Existen distintos tipos de métodos de evaluación de la regulación intestinal, uno de ellos es el *ex vivo*, en el cual, desde 1950 se han utilizado modelos de tejido animal para la exploración del mecanismo de absorción de nutrientes. Por ejemplo, la técnica del intestino invertido, el cual es un modelo utilizado para evaluar la absorción de drogas por vía pasiva y activa. Sin embargo, este modelo cuenta con desventajas como la falta de suministro de sangre que conlleva a la pérdida de viabilidad (Praveen *et al.*, 2000). Otro de los modelos utilizados es el *in vitro*, en el cual, se ha utilizado para evaluar el transporte de diversos nutrientes a través del epitelio intestinal, utilizando líneas celulares como la de cáncer de colon humano (Caco-2).

Por otro lado, otro de los modelos reportados es el modelo *in vivo*, en el cual, de igual manera se ha evaluado la integridad de la barrera y la permeabilidad intestinal utilizando distintos



biomarcadores. Entre los cuales, los más reportados para evaluar el daño de células epiteliales se encuentran, la citrulina, proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) y claudina, los cuales se han evaluado en plasma y en orina. Adicionalmente, a estas determinaciones, se han realizado estudios en sangre periférica en pacientes con sepsis, indicando que un aumento en esta podría deberse a una translocación bacteriana dando como resultado una falla de la función de la barrera intestinal. Otro indicador de daño en la función barrera es la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), por ejemplo, el butirato, el cual ha demostrado su capacidad de disminuir la translocación bacteriana y favorece la expresión de las proteínas de unión (Bischoff *et al.*, 2014). Sin embargo, para probar nuevos métodos de regulación de permeabilidad intestinal se recomienda comenzar con modelos *in vitro* y una vez evaluados en ese modelo se puede seguir con el *in vivo*, siendo una de las más reportadas las Caco-2.

### **2.5.2. Línea Celular Caco-2**

La línea celular epitelial humana Caco-2 fue obtenida en 1970 a partir de un carcinoma de colon, desde entonces se ha utilizado como un modelo para evaluar procedimientos de la barrera intestinal. Debido a que una de las características distintivas que tiene es su capacidad de diferenciarse en una monocapa de células con funciones de enterocitos desde los 14-21 días aproximadamente. Lo cual sucede cuando comienza a formarse una confluencia de 80% aproximadamente, después, se comienzan a polarizar adquiriendo una característica de microvellosidades, se forman uniones estrechas de la monocapa y comienzan a demostrar actividades enzimáticas típicas de los enterocitos. Sin embargo, se cuentan con desventajas ya que carece de producción de moco, propiedad de importancia en la mucosa intestinal, indicando que se debe tomar en cuenta para que sea una aproximación más cercana a la realidad de la barrera intestinal (Lea, 2015; Le Ferrec *et al.*, 2001).

Según la literatura, se reporta que Caco-2 es una representación de manera *in vitro* para evaluar la absorción de medicamentos y compuestos, ya que, al ser cultivadas en filtros permeables, es posible evaluar la monocapa para estudios de transporte de fármacos. Lo que ha llevado al descubrimiento

de rutas de transporte de las drogas entre las que destacan el transportador de dipéptidos y glicoproteína (Artursson *et al.*, 2001). Estos ensayos son una buena correlación de los de coeficientes de permeabilidad evaluados en humanos, con respecto a ensayos donde evalúan la capacidad de regulación de la barrera intestinal con compuestos bioactivos como péptidos que son transportados por la vía pasiva paracelular (Sun *et al.*, 2008).

### 2.5.3. Marcadores Utilizados en la Regulación de la Permeabilidad Intestinal

La regulación de la función de barrera intestinal ha sido un objetivo relevante para promover nuevos tratamientos preventivos contra enfermedades inflamatorias intestinales. La cual, primero fue estudiada por electrofisiólogos que evaluaban la permeabilidad epitelial con cámaras de Ussing, después, dichos experimentos se extrapolaron a ensayos *in vivo* (plasma), desarrollando pruebas con marcadores específicos. Estas pruebas funcionan haciendo pasar analitos por el epitelio intestinal hasta llegar a la zona de la submucosa (Bischoff *et al.*, 2014). En la actualidad, se han utilizado diversos biomarcadores para medir la permeabilidad y pérdida de integridad de la barrera epitelial del intestino (Cuadro 1). Por ejemplo, de manera *in vitro* se ha demostrado que a concentraciones bajas de butirato, aumenta la resistencia transepitelial. Por otro lado, en el caso células Caco-2, se utilizó FITC-dextrano de 3 kDa y se dio seguimiento a un ácido graso de cadena corta, resultando en un mejoramiento de la permeabilidad (Wells *et al.*, 2017). Por lo que el estudio de los compuestos de interés utilizando distintos marcadores ya establecidos puede ser clave importante para la evaluación de la funcionalidad de las proteínas de unión estrecha.

**Cuadro 1.** Marcadores utilizados para la regulación de la permeabilidad intestinal.

<b>Modelo de estudio</b>	<b>Método</b>	<b>Marcador</b>	<b>Referencia</b>
<i>In vitro</i> (Caco-2BBE)	Resistencia eléctrica transepitelial (TEER)	Tratamiento de TNF	(Li <i>et al.</i> , 2018)
<i>In vivo</i> (ratones)	(FITC)-dextrano en muestras de suero	FITC-dextrano	(Devraj <i>et al.</i> , 2018)

<i>In vivo</i> (ratones)	ELISA	I-FABP	(Adriaanse <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ex vivo</i> (intestino)	Medida de corriente de circuito Ussing Chambers	Iones de transporte	(Thomson <i>et al.</i> , 2019)
<i>In vivo</i> (ratones)	Cuantificación de azúcares	Lactulosa/manitol	(Meddings <i>et al.</i> , 2003)
<i>In vivo</i> (ratones)	ELISA	Calprotectina	(Costa <i>et al.</i> , 2003)
<i>Ex vivo</i> (Biopsia de tejido)	Inmunoquímica	Permeabilidad de perlas fluorescentes a través del moco	(Erdmund <i>et al.</i> , 2013)
<i>In vivo</i> (ratones)		Zonulina	(Seethaler <i>et al.</i> , 2021)

I-FABP: Proteína de unión a ácidos grasos.

## 2.6. Alimentos Funcionales como Coadyuvantes de Tratamientos Antiinflamatorios

### 2.6.1. Beneficios del Consumo de Alimentos Funcionales

Como alimentos funcionales se refieren a aquellos alimentos naturales o procesados que contienen compuestos bioactivos, pueden ser de origen vegetal y animal, en particular los alimentos de origen animal cuentan con un gran contenido de aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y péptidos bioactivos. Estos se pueden encontrar de manera natural o producirse mediante la manipulación del alimento (Camou *et al.*, 2014; Bischoff *et al.*, 2014). En este sentido, se tiene evidencia sobre el papel de los alimentos funcionales contra diversas enfermedades, los cuales promueven beneficios en la salud y reducen el riesgo controlando los síntomas de enfermedades ya sean virales o crónicas (Martirosyan *et al.*, 2021). Los efectos en la salud que se han asociado a los alimentos funcionales son antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, anticolesterolémicos y antiobesogénicos (Serafini & Peluso, 2016).

La digestión es la vía por la que los péptidos pueden alcanzar una aplicación al llegar al tejido donde ejercerán su acción si se llega a la concentración necesaria para tener un efecto. Por lo que, para llegar a su objetivo, se requiere que se llegue hasta el lugar de acción, sobreviviendo a la digestión y absorción intestinal hasta llegar al torrente sanguíneo. Entre los factores que afectan la absorción de los péptidos se encuentran la bioquímica del tracto, su actividad enzimática, la incapacidad permeable de los péptidos al cruzar la membrana intestinal y su composición química (Segura-Campos *et al.*, 2010).

### 2.6.2. Los Alimentos Funcionales como Coadyuvantes en el Tratamiento Contra EII

Diversos estudios han identificado que los nutrientes de los alimentos tienen un papel importante en la modulación de las funciones del epitelio intestinal (Cuadro 2) (Farré *et al.*, 2020). La estructura de las uniones estrechas es muy dinámica, por lo que la permeabilidad intestinal sufre cambios causados por factores internos (biológicos, compuestos de la mucosa) y factores externos (nutrientes dietarios). Diversos estudios *in vitro* han demostrado el efecto de los compuestos presentes en los alimentos como la quercetina, triptófano, vitamina D, zinc, glutamina y prebióticos (beta-glucanos) en la regulación de la permeabilidad intestinal (Lacerda *et al.*, 2021). Un ejemplo de esto son los fructanos de inulina que se utilizan para la fermentación bacteriana en el colon y producen AGCC (Tawfick *et al.*, 2022). Además, se comprobó de manera *in vitro* que el aumento de fibra dietética estimula la producción de moco y la expresión de las proteínas TJ lo que conlleva a una reducción en la permeabilidad intestinal (Lacerda *et al.*, 2021).

**Cuadro 2.** Estudios relacionados con propiedades antiinflamatorias.

<b>Muestra</b>	<b>Modelo de estudio</b>	<b>Hallazgos</b>	<b>Referencia</b>
Hidrolizado de Glucamano de Knojac	Se administró durante 14 días en pacientes con EII	Mejó el movimiento intestinal, la consistencia fecal y redujo el dolor abdominal.	(Al Mijan & Lim, 2018).
Cannabinoides	La función de barrera	Ejerció un papel	(Bischoff <i>et</i>

	intestinal se regula <i>in vivo</i> a través de la activación del receptor intestinal de <i>cannabinoides</i> tipo 1 (CB1R), pero no CB2R.	importante como protector en la permeabilidad del colon y como coadyuvante en EII.	( <i>al.</i> , 2014)
1 g <i>Bifidobacterium</i> y 5.5 g galato-oligosacárido	En 41 pacientes con CU se realizaron tratamientos simbióticos por 1 año	Mejoría clínica, colonoscópica y disminución de niveles de mieloperoxidasa	(Coriat <i>et al.</i> , 2017)
Polifenoles	51 pacientes fueron tratados con una dieta rica en polifenoles 1391 mg/día por 8 semanas	Redujo los niveles de zonulina sérica, un marcador indirecto de IP.	(Del Bo <i>et al.</i> , 2021)
Fitoquímicos	Modelo de rata con colitis tratada con ácido acético.	Redujo la actividad de la MPO, aumentó el contenido de glutatión y redujo el deterioro del colon	(Dodda <i>et al.</i> , 2014)

## 2.7. Leches Fermentadas y Permeabilidad Intestinal

### 2.7.1. Leches Fermentadas como Alimento Funcional

Los productos lácteos son una parte fundamental en la nutrición humana, ya que su conformación de proteínas, ácidos grasos esenciales, aminoácidos, calcio, vitaminas y compuestos bioactivos cumplen con diversas funciones fisiológicas y bioquímicas (Khan *et al.*, 2019). Desde la antigüedad, las leches fermentadas se consideran como productos con efectos benéficos para la salud, principalmente atribuidos por los microorganismos que son parte de la fermentación y a los productos liberados durante este proceso (metabolitos y otras moléculas) (González-Olivares *et al.*, 2011). Además, las BAL tienen la función de fraccionar las proteínas a péptidos y aminoácidos, de las cuales, algunas cuentan con actividades biológicas: inmunomoduladora, anticancerígena, hipocolesterolémica, antimicrobiana, reguladora de actividad intestinal, antiinflamatoria y

antioxidante (González-Olivares *et al.*, 2011). Por todo lo anterior estas son reconocidas como alimentos funcionales.

Además, la leche ha demostrado tener un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes por su riqueza de compuestos como las fracciones de proteína de la leche se encuentra la albúmina sérica,  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, fosfoglicoproteínas, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina y caseínas (Torres-Llenez *et al.*, 2005). Lo que trae consigo la prevención de enfermedades como cáncer, obesidad, enfermedades cardiovasculares y cerebrales como Alzheimer y Parkinson (Stobiecka *et al.*, 2022). En estudios *in vivo* e *in vitro*, han indicado el papel de los péptidos biológicamente activos de las leches fermentadas en la prevención del cáncer, tratamiento de diabetes II y el manejo arterial. Sustentando que algunas bacterias probióticas pueden estar en contacto con las células epiteliales intestinales, lo que induce a cambios en dichas células liberando sustancias que funcionan para la comunicación entre células promoviendo la respuesta inmune (Maldonado *et al.*, 2020).

Aunado a lo anterior la FDA ha reportado que la lactoferrina proveniente del bovino (bLF) está aprobado para uso práctico como suplemento para fórmula infantil, y se encuentra en la categoría de generalmente reconocida como segura (GRAS) (Rosa *et al.*, 2017). Con respecto a la permeabilidad intestinal, Gao y col (2021) demostraron que bLF podría tener un efecto potencial en la expresión de las proteínas de unión, en células de criptas epiteliales intestinales humanas y Caco- 2. Además, en el estudio realizado por Hering *et al.*, (2017) indico que el suministro de lactoferrina disminuye el aumento de la permeabilidad que es inducida por TNF $\alpha$ . Por lo que, el estudio de los productos lácteos principalmente la leche es de interés para la utilización como un potencial tratamiento de las EII, como se muestra en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Productos lácteos fermentados con potencial efecto antiinflamatorio.

<b>Producto</b>	<b>Función biológica</b>	<b>Referencia</b>
Kéfir	Reducción de géneros microbianos involucrados en la cascada de respuestas proinflamatorias y enfermedades intestinales.	Toscano <i>et al.</i> , 2016
Leche fermentada	Efecto potencial en la disminución de la respuesta inflamatoria del sistema inmune con Th1/Th17 por los metabolitos contenidos.	Santiago <i>et al.</i> , 2018

Quesos	Mozzarella	Regulación de la vía NF- $\kappa$ B y de la permeabilidad intestinal.	Campmans-Kuijpers & Dijkstra, 2021
	Emmenthaler	Reducción de la secreción de IgA en el intestino delgado y regulación de genes implicados en la inducción de citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IG $\gamma$ e IL-17.	
Yogur		Regulación de la permeabilidad intestinal aumentando la expresión de las proteínas de unión (zonulinas y claudinas).	Putt <i>et al.</i> , 2017

### 2.7.2. Compuestos Bioactivos de las Leches Fermentadas

Leches fermentadas con BAL específicas ayudan a la producción de metabolitos como aminoácidos libres y péptidos que pueden ser potencialmente benéficos para la prevención de algunas enfermedades (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017). En el caso específico de los péptidos, se puede tener desde aquellos que presentan una sola bioactividad o incluso ser multifuncionales desencadenando o inhibiendo diferentes rutas de señalización y de esta manera poder regular los efectos ocasionados por las enfermedades, un ejemplo de estos péptidos es la lactoferrina derivada de la caseína de la leche (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017). Por otro lado, otros péptidos reportados provienen de las proteínas de suero (Ile-Pro-Ala), identificados con una actividad antioxidante y con un potencial tratamiento para las enfermedades de obesidad y diabetes tipo 2 (Stobiecka *et al.*, 2022).

### 2.7.3. Efectos Antiinflamatorios de las Leches Fermentadas

El uso de las leches fermentadas con BAL ha demostrado ser coadyuvante en diversas enfermedades. Los metabolitos que se producen en la leche durante la fermentación, en específico, péptidos, AGCC, exopolisacáridos y la liberación de proteínas como p40 y p75, pueden ayudar a modular la reparación de la mucosa intestinal, la microbiota intestinal, modificar el pH de la luz luminal, y reducir la respuesta inflamatoria (Sigala-Robles *et al.*, 2022; Yoda *et al.*, 2014). Esto

también ha sido demostrado con la administración de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium breve* Bb12, las cuales modularon el proceso inflamatorio a través de las vías Th17 y Th2 en células mononucleares de sangre periférica humana. Además, los componentes activos de estos probióticos, disminuyen las citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-10 en el intestino y aumentan las células T (Zheng *et al.*, 2014). En el estudio realizado por Santiago-López *et al.* (2018), demostraron que la administración de leche fermentadas con *Lactobacillus fermentum* disminuye la respuesta inflamatoria atribuyéndole a los compuestos presentes en la leche fermentada.

Además, se han reportado los efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores en otras leches fermentadas con BAL específicas evaluadas en modelos *in vivo* (cuadro 4). Sin embargo, no se ha estudiado si el efecto de estas leches potencialmente antiinflamatorias es debido a la regulación de la permeabilidad intestinal. Planteándonos la pregunta de interés sobre ¿Qué efecto tendría la administración de leches fermentadas potencialmente antiinflamatorias en la modulación de la permeabilidad intestinal en un modelo *in vitro*?

**Cuadro 4.** Efecto antiinflamatorio en modelos *in vivo* de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas.

Cepa	Efecto	Referencia
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23 y J28 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J25	Inmunomodulador. Efecto en la concentración de citocinas IL-10 and IL-6 y niveles de IgA.	Santiago-López y colaboradores (2018)
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23 y J28	Inmunomodulador Reducción de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y aumento de citocinas antiinflamatorias (IL-10).	Reyes-Díaz y colaboradores (2018)
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J28	Antiinflamatorio. Citocinas en suero (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23 y TNF- $\alpha$ ) y en mucosa intestinal (IL-17 e IFN- $\gamma$ ).	Santiago-López y colaboradores (2019)



### 3. HIPÓTESIS

Fracciones acuosas derivadas de leches fermentadas con cepas de *Limosilactobacillus* y *Lactiplantibacillus* spp., potencialmente antiinflamatorias promueven la modulación de la permeabilidad intestinal *in vitro*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de fracciones acuosas derivadas de leches fermentadas con cepas *Limosilactobacillus* y *Lactiplantibacillus* spp., en la regulación de la permeabilidad intestinal en un modelo *in vitro*.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad tecnofuncional de las leches fermentadas con cepas de *Limosilactobacillus* y *Lactiplantibacillus* spp.
- Evaluar el efecto de fracciones acuosas derivadas de leches fermentadas sobre la viabilidad de células polimorfonucleares aisladas de sangre periférica.
- Evaluar el efecto citotóxico de fracciones acuosas derivadas de leches fermentadas en células Caco-2.
- Evaluar el efecto de la(s) fracción(es) acuosas en la resistencia transepitelial de la monocapa de células Caco-2, como indicador de permeabilidad intestinal.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos Empleados

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aisladas de queso Cocido artesanal (Heredia *et al.*, 2015), y pertenecen a la colección de cultivos del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) en Hermosillo, Sonora, México (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Cepas de estudio.

<b>Bacteria</b>	<b>Código</b>
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	J23
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	J24
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	J25
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	J27

Las cepas de estudio se cultivaron en caldo MRS estéril (de Man, Rogose and Sharpe, Difco, Detroit, MI, USA.) al 1% (v/v), y se dejaron incubar por 20 h, 14 h a 37 °C. Se realizó un último subcultivo de 6 h para el caso de J23 y J24, y de 7 h para J25 y J27. Del último subcultivo, las cepas se centrifugaron a 4500 x g, durante 10 min, a 10 °C (Sorvall™ ST 16R, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Alemania), se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; pH 7.4, 0.2 M) y se ajustó la densidad óptica  $(OD)_{600nm}=0.8$  (c.a  $10^8$  UFC/mL) para los siguientes ensayos.

### 5.2. Elaboración de Leche Fermentada

Leche descremada en polvo se reconstituyó en agua estéril al 10% (p/v) y se sometió a un

tratamiento térmico (80 °C, 30 min). Posteriormente, del cultivo ajustado de cada una de las bacterias, se inoculó individualmente al 3% (v/v) en leche, y se dejó incubar durante 18 h con el objetivo de hacer una primera adaptación a una matriz láctea. Posteriormente, se inoculó en leche (3% v/v) y ésta se dejó fermentar durante 48 h a 37 °C. Al final de la fermentación, la leche se trató térmicamente durante 15 min a 75 °C y se enfrió a 4 °C en un baño de agua con hielo (Santiago-López *et al.*, 2018). Para monitorear la fermentación, se midió pH, acidez (expresado como g de ácido láctico), concentración celular y proteólisis.

### **5.2.1. Monitoreo de pH, Acidez y Proteólisis**

Se realizó el monitoreo del pH de las leches fermentadas en tres tiempos 0, 24 y 48 h. A la par, se evaluó la acidez (g de equivalentes de ácido láctico), utilizando alícuotas de 10 mL de leche y adicionando 3 gotas de fenolftaleína como indicador (Negri, 2005).

La proteólisis se determinó cuantificando grupos amino libre siguiendo la metodología propuesta por Donkor *et al.* (2007). Para ello, se tomaron 500 uL de leche fermentada y se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético (0.75 N). La muestra se centrifugó (4696 x g) y se recuperó el sobrenadante para la determinación de la proteólisis. Para la reacción, se tomaron 20 uL de cada muestra diluida (5 veces) y 200 uL del reactivo de OPA, y se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió a dos longitudes de onda 340 nm de excitación y 460 nm de emisión. Se determinaron los grupo amino libres y la concentración se calculó en función de una curva estándar de L-leucina (mg/mL).

### **5.2.2 Obtención de Fracciones Peptídicas**

Cada una de las leches obtenidas se centrifugaron (Sorvall ST16 R) a 4500 x g por 30 min, posteriormente se ultrafiltró utilizando membranas de celulosa <3 kDa (0.22 Ultracel Amicon Ultrafiltration Discs: Milipore, Billerica, MA). Los ultrafiltrados se almacenaron a -20 °C para su

posterior análisis (Hogan *et al.*, 2009; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010). A las fracciones obtenidas se determinó y ajustó la concentración de proteína por el método de Lowry con kit de ensayo de proteína (Bio-Rad, California, USA).

### 5.3. Ensayos de Viabilidad Celular

#### 5.3.1. Obtención de Células Polimorfonucleares

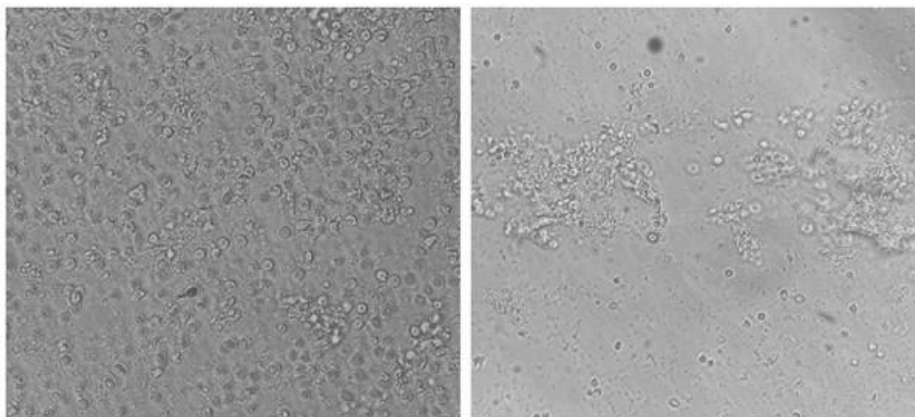
Para la obtención de las células polimorfonucleares se siguió el procedimiento reportado por Landa-Solis y colaboradores (2020), con algunas modificaciones. Para ello, se contaron con 7 personas sanas (6 mujeres y 1 hombre), rango de edad de 24-30 años, que previamente firmaron un consentimiento informado. Este protocolo experimental fue avalado por el comité de ética en investigación de CIAD (CE/022/2019) (ANEXO 1).

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica utilizando una jeringa estéril, y se colocaron en tubos Vacutainer (BD Vacutainer de 4 mL, K2E/K2 EDTA, NJ, USA) para evitar la coagulación de la muestra. Posteriormente, la muestra fue diluida dos veces con PBS (1X: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, pH 7.4). En paralelo, en tubos falcon se colocó Ficoll-Paque Premium (Bio-sciences, Uppsala, Suecia) en una proporción de 30:50 (ficoll:muestra) en tubos falcon estériles de 50 mL y se añadió la muestra de sangre diluida evitando romper la tensión superficial. Las muestras se centrifugaron a 760 xg, 20 min, 20 °C (Sorvall™ ST 16) y se recuperaron las células polimorfonucleares (PMN). Las PMN obtenidas se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) suplementado con una mezcla de antibióticos (penicilina:estreptomicina, 100X, Sigma-Aldrich) y se evaluó la viabilidad celular utilizando azul de tripán en relación 80:20. La viabilidad celular se observó por microscopía (ZEISS Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Jena, Alemania) y la concentración se ajustó utilizando una cámara de Neubauer (0.1 mm Deep BRIGHTLINE, Hausser Scientific, USA). Las células se mantuvieron en frío hasta su uso.

### 5.3.2 Viabilidad de Células Polimorfonucleares

Para evaluar la viabilidad de las células se utilizó el ensayo de MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EU). Para ello, el reactivo se preparó en PBS a una concentración de 5 mg/mL y se esterilizó utilizando filtros para jeringa (0.22  $\mu\text{m}$ ) (Tai *et al.*, 2023).

Para realizar el ensayo, las células se ajustaron a  $2 \times 10^5$  células/mL. Posteriormente, las células se colocaron (150  $\mu\text{L}$ ) en una microplaca de 96 pocillos (96 well culture cluster, Costar, Whashington, EU), y se añadieron individualmente 20 uL de las fracciones <3kDa, y se dejaron incubar por 24 y 48 h a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> (VWR Scientific MODEL 2200 CO<sub>2</sub> incubator, EU). Finalizado el tiempo de 24 y 48 h, se agregaron 20 uL de MTT y se dejó incubar durante 4 h en las mismas condiciones de CO<sub>2</sub> y temperatura. A las 4 h, la placa se centrifugó a 200 xg por 5 min (Sorvall™ ST 16R ), se retiró el medio y se añadió 130 uL de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) para disolver los cristales de formazán. Se midió la absorbancia a 550 nm (SpectraMax M3) (Oez *et al.*, 1990). En la figura 2 se muestra cómo se forman los cristales de formazán al oxidarse el MTT.



**Figura 2.** Formación de cristales de formazán.

La viabilidad celular fue determinada con la siguiente fórmula

$$\% \text{ de viabilidad: } \frac{\text{Células testigo-blanco}}{\text{Células tratadas}} \times 100$$

### 5.3.3 Cultivo de la Línea Celular Caco-2

Las células de adenocarcinoma Caco-2 ATCC HTB-37 fueron descongeladas y se cultivaron en matraces de cultivo celular T (25 cm<sup>2</sup> de área, Cellstar®, Avantar, PE, EU) con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con una mezcla de antibióticos de penicilina:estreptomicina y 20% v/v de suero bovino fetal (Gibco). Las células se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia de 70% a 80%. Las células se recuperaron al adicionar una solución estéril de tripsina (0.25% p/v, Sigma-Aldrich) y 0.05% de ácido etilendiaminotetraacético (0.53 mM) prepara en medio DMEM. Para el ensayo, las células se ajustaron a 10<sup>4</sup> células/mL con medio DMEM suplementado. Se realizó una curva de crecimiento poblacional y se midió la absorbancia a (550 y 620 nm) cada 24 h por 15 días y se determinaron las fases de crecimiento (fase de adaptación, exponencial) y diferenciación celular (Konsula & Barile, 2005).

$$1) n: \frac{Abs\ final\ x\ población\ inicial}{Abs\ inicial}$$

La diferenciación celular fue observada con el objetivo 40x (ZEISS Axio Vert A1, ZEISS Industrial Metrology, Alemania) cada 24 h.

### 5.3.4 Evaluación del Efecto Citotóxico de Fracciones Peptídicas en Células Caco-2

Para el ensayo de citotoxicidad, se colocaron 200  $\mu$ L de células (1.0 x 10<sup>4</sup> células/mL) en cada pocillo de una microplaca de 96, seguido de la adición de 20  $\mu$ L de cada una de las fracciones peptídicas ajustadas a diferentes concentraciones de proteína (30, 50 y 100  $\mu$ g/mL). Las microplacas se dejaron incubar por 24 y 48 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> (VWR Scientific MODEL 2200). Pasado el tiempo de incubación, se adicionaron 20  $\mu$ L del reactivo de MTT (5 mg/mL) y

se dejó incubar por 4 h en las condiciones antes mencionadas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 130 uL de DMSO para disolver los cristales de formazán, y se registró la absorbancia a 550 nm (Sorvall™ ST 16R). La viabilidad de las células se expresó como porcentaje respecto al grupo testigo (células con PBS). Se utilizó el medio de cultivo DMEM como blanco (Konsula & Barile, 2005).

En paralelo, se realizó un ensayo pero agregando LPS (20 uL) como inductor de inflamación, previamente preparado en PBS a una concentración de 1 µg/mL, y se dejó incubar por 24 y 48 h bajo las mismas condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub>. Se agregó MTT (20 uL; 5 mg/mL) y se dejó incubar por 4 h, se retiró el medio de cultivo y se adicionó DMSO (130 uL). Finalmente, se midió la absorbancia a 550 nm y se calculó el porcentaje de viabilidad con la fórmula antes citada.

### **5.3.5 Evaluación de la Permeabilidad Intestinal**

Para los ensayos de permeabilidad, las células Caco-2 se sembraron a una concentración de  $2.0 \times 10^5$  en una microplaca Transwell de policarbonato (tamaño de poro de 8 µm, 6.5 mm diámetro de los insertos, Corning Incorporated, ME, USA). Las células se cultivaron por 14 días en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C (VWR Scientific MODEL 2200 CO<sub>2</sub> incubator, USA) hasta obtener la formación de la monocapa. Posteriormente, a cada pozo se le agregó 20 uL de la fracción < 3kDa con la concentración de proteína que mostró el mejor porcentaje de viabilidad en los ensayos anteriores. Las células se dejaron incubar por 24 h, posteriormente se agregaron 20 µL por pozo de LPS (1 µg/mL) y se dejó incubar por otras 24 h y 48 h en condiciones de CO<sub>2</sub> y temperatura previamente mencionadas (Tenore *et al.*, 2019). Los tratamientos que se plantearon para este ensayo fueron: a) células (testigo negativo), b) células + fracción <3 kDa, c) células + LPS, d) células + fracción + LPS.



### 5.3.6 Medición de Resistencia Eléctrica Transepitelial

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) se evaluó durante los 14 días de incubación (Srinivasan *et al.*, 2015). La medición de TEER se realizó utilizando dos electrodos que contienen plata/cloruro (EMD Millipore Corporation, MERSSTX03, Alemania) conectados a un multímetro (FLUKE 83 III, México). Uno de los electrodos fue colocado dentro del inserto y otro en el compartimento basolateral. La resistencia óhmica se determinó utilizando la ley de Ohm en relación voltaje y corriente. La resistencia incluyendo la medición de la resistencia del medio sin células y la medición de la resistencia de la monocapa ( $R_{total}$ ) se utilizaron como testigos y cálculo de la resistencia de la monocapa. La resistencia fue calculada con la siguiente fórmula:

$$2) R_{TISSUE} (\Omega) = R_{TOTAL} - R_{BLANCO}$$

Donde:

Resistencia: área afectiva de la membrana semipermeable (Área M) la cual se reporta en unidades  $cm^2$ .

$$3) R_{tissue} (\Omega) \frac{1}{M \text{ Area } (cm^2)}$$

### 5.4 Diseño Estadístico

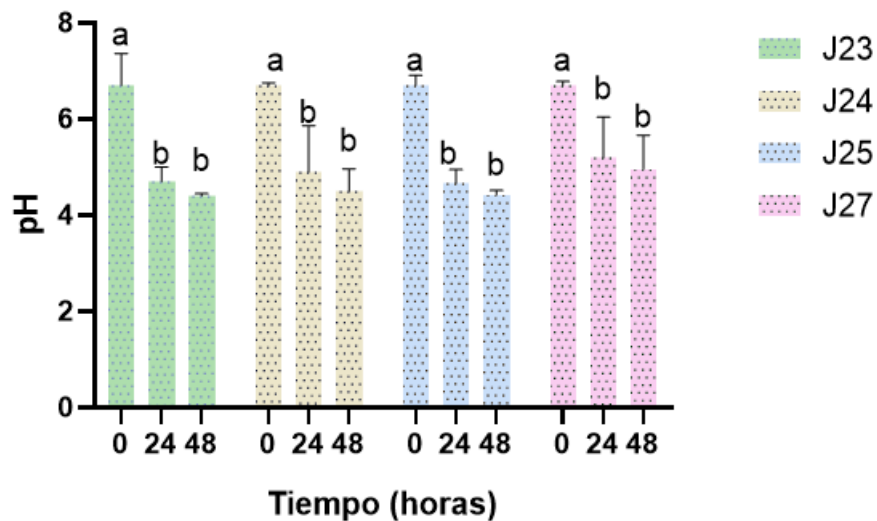
Los datos obtenidos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los factores fueron los tipos de leche y las variables respuesta fueron los parámetros tecnológicos, viabilidad celular y resistencia. Para todos los análisis se consideró una ( $p < 0.05$ ). La comparación

de medias se realizó por el método de Duncan. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico NCSS 2021 (v.21.0.7).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Determinación de Potencial de Hidrógeno

Los resultados de pH en las cuatro leches fermentadas se muestran en la figura 3. En la figura se puede observar un descenso de pH de 7.0 hasta 4.39 después de 48 h de fermentación. En general, no se mostró diferencia ( $p > 0.05$ ) entre 24 y 48 h de fermentación para cada una de las leches, pero si con respecto al tiempo 0 h ( $p < 0.05$ ). La leche fermentada con la cepa J25 fue quien mostró el valor más bajo de pH a las 24 h con  $4.67 \pm 0.28$ . Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Donkor *et al.* (2007), donde reportaron valores entre 6.0-4.5 para leches fermentadas con cepas específicas de *Lactobacillus*. Así mismo, en el estudio realizado por Calixto *et al.* (2020) mencionó que leches fermentadas con bacterias ácido lácticas reportan valores de entre 5.6-4.31, siendo similares a lo obtenido por nuestro estudio.



**Figura 3.** Valores de pH en leches fermentadas con cepas de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Los valores representan la media  $\pm$  DE ( $n=2$ ). Literales diferentes indican diferencia ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de fermentación para cada tipo de leche.

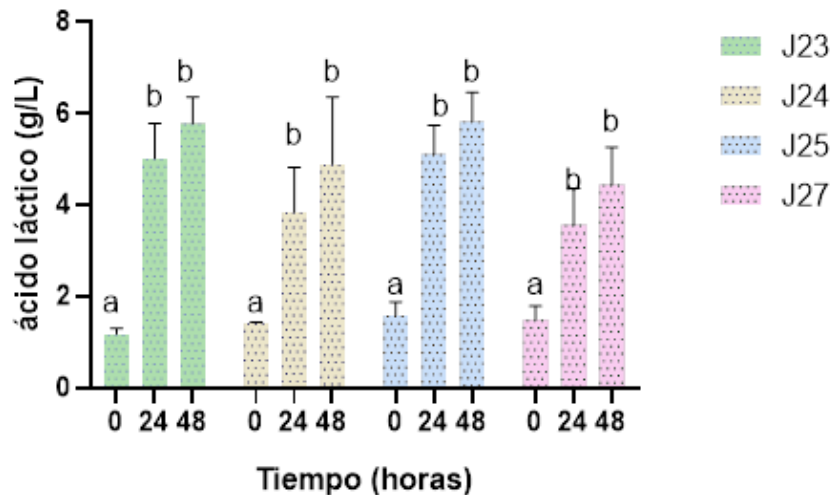
Este descenso de pH se puede relacionar con un aumento en la concentración de ácido láctico, ya

que el pH influye en la conformación de las proteínas, y la disociación de ácidos por lo que su estudio es de importancia en la caracterización de productos lácteos (De la Cruz, 2011; Sánchez & Tromps, 2014).

## 6.2 Determinación de Acidez

La acidez (expresada como g de ácido láctico/L) en las leches fermentadas se muestran en la figura 4. La concentración de ácido láctico en la leche previo a la fermentación fue de aproximadamente 1.40 g/L, pero a las 24 de fermentación se incrementó hasta  $5.02 \pm 0.76$  para la leche fermentada con J23,  $3.84 \pm 2.17$  para J24,  $5.11 \pm 0.28$  para J25 y de  $3.50 \pm 0.29$  para J27. Después de 48 de fermentación, la concentración de ácido incrementó desde 0.7 a 1 g/L, no mostrando diferencia ( $p < 0.05$ ) entre 24 y 48 h de fermentación.

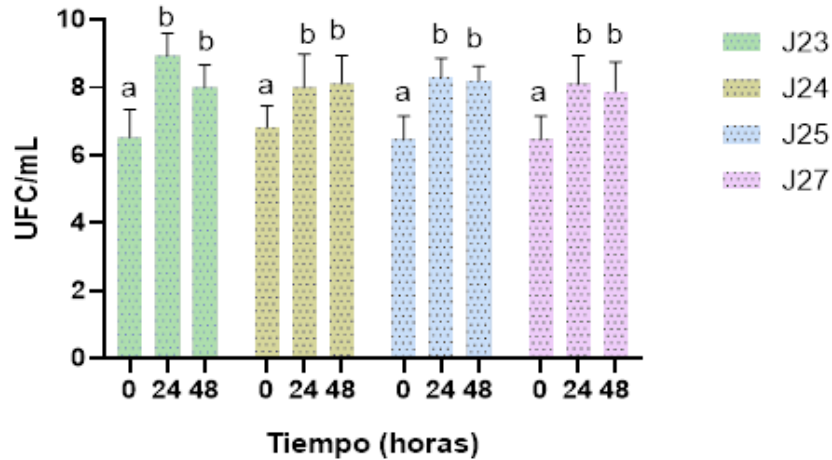
En relación a lo anterior, los valores obtenidos son similares a lo reportado por González-Córdova y colaboradores (2011), donde evaluaron diferentes leches fermentadas con bacterias ácido lácticas y se reportaron valores entre 5.6 y 4.9 g de ácido láctico/L a partir de las 24 h de fermentación. Es importante mencionar que se requiere no solo que las cepas acidifiquen la leche en un periodo corto de tiempo, si no que se mantenga un pH estable al final de la fermentación, datos que se pueden corroborar con respecto a los resultados de pH anteriormente mencionados (Tamime *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Concentración de ácido láctico (g/L) en las leches fermentadas con cepas de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Los valores representan la media  $\pm$  DE (n=2). Literales diferentes indican diferencia ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de fermentación para cada leche fermentada.

### 6.3. Concentración Celular de las Bacterias Ácido Lácticas en Leche Fermentada

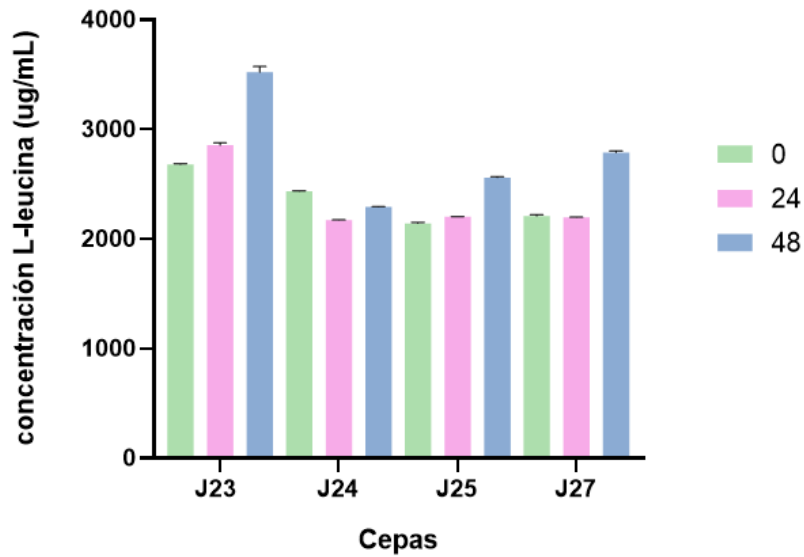
Los resultados de cuenta viable en las leches fermentadas se muestran en la Figura 5. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la concentración de hasta dos ciclos logarítmicos a las 24 h de fermentación, sin mostrar cambios a las 48 h ( $p > 0.05$ ). Los resultados obtenidos concuerdan con lo que ha sido reportado previamente por Almada-Corral *et al.* (2022), en la que también se reportó el crecimiento de 1.4-1.7 UFC/mL en leche fermentada por cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*. Estos resultados son similares a lo reportado en otras leches fermentadas, donde se reportan concentraciones de hasta  $10^9$  UFC/mL (Murthi, 2021).



**Figura 5.** Concentración celular en las leche fermentadas por cepas de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Los valores representan la media  $\pm$  DE (n=2). Literales diferentes indican diferencia ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de fermentación para cada leche fermentada.

#### 6.4. Proteólisis en las Leches Fermentadas

Los resultados de actividad proteolítica en las leches fermentadas de 24 y 48 h se muestran en la figura 6. Los resultados que se obtuvieron evidenciaron mayor proteólisis en la leche fermentada con la cepa de *Limosilactobacillus fermentum* J23 (3.5 mg/mL). La actividad proteolítica incrementó 126  $\mu$ g/mL de L-leucina a las 48 h de fermentación con respecto al tiempo cero (2678  $\mu$ g/mL de L-leucina). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente en donde se utilizaron las mismas cepas para fermentar leche (Reyes-Díaz *et al.*, 2018). Lo cual puede ser fundamentado debido a que la actividad enzimática que poseen las bacterias tienen la capacidad para hidrolizar las proteínas contenidas en la leche (Donkor *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Resultados de la capacidad proteolítica en leche fermentada por cepas de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Los valores representan la media  $\pm$  DE (n=2).

#### 6.5. Ajuste de Proteína por el Método de Lowry

La concentración de proteína en las fracciones <3 kDa se muestra el cuadro 6. La muestra que presentó el mayor contenido de proteína fue la fracción derivada de la leche fermentada con la cepa J23 y menor para la fracción obtenida de J24. Las fracciones fueron ajustadas a una concentración de 100 ug/mL para realizar los ensayos de citotoxicidad y considerando un estudio previo (Tenore *et al.*, 2015).

**Cuadro 6.** Concentración de proteína en las fracciones < 3kDa de leches fermentadas de 48 h por cepas específicas de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*.

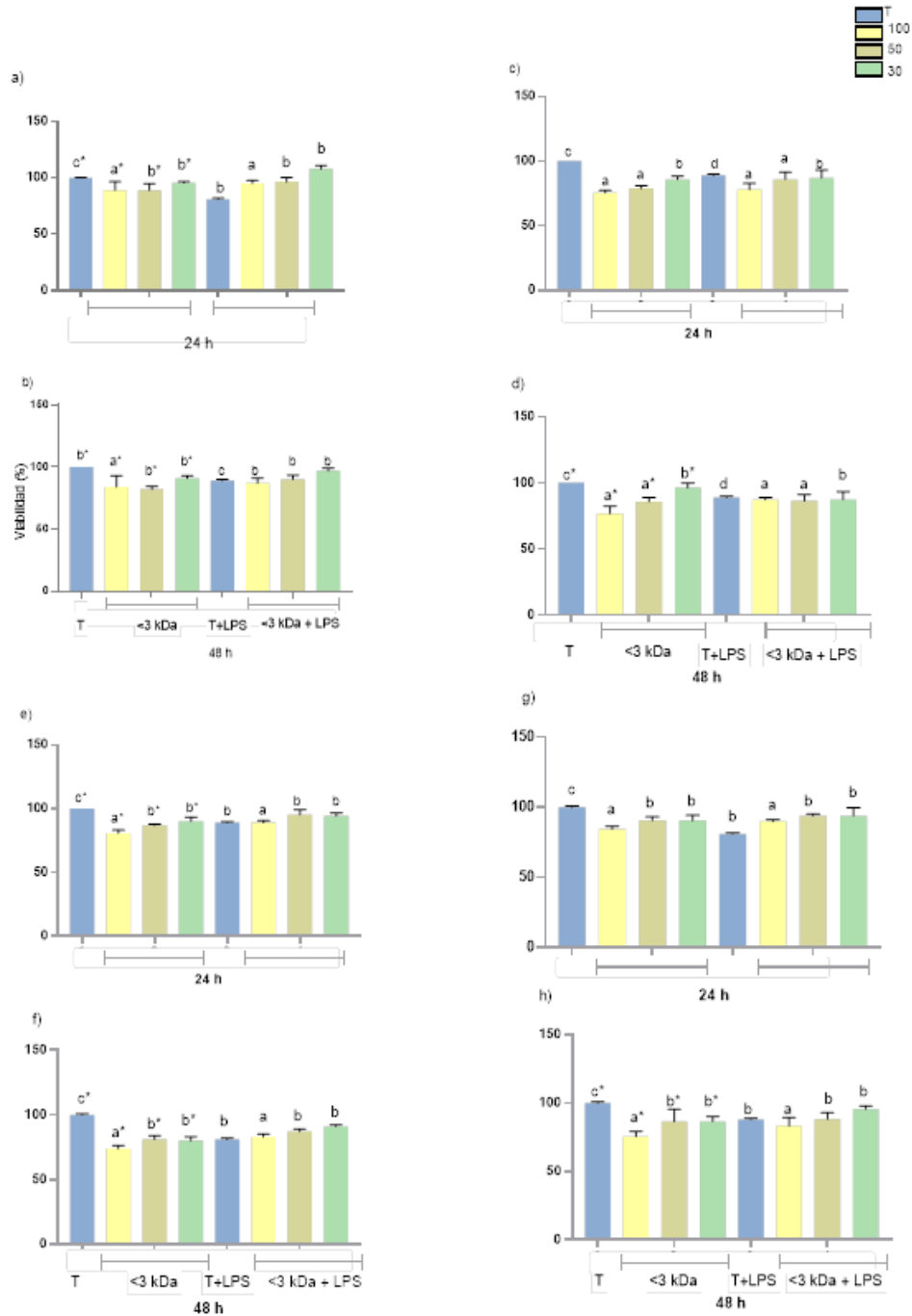
Cepa	Concentración de proteína (mg/mL)
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23	0.900
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J24	0.106
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J25	0.590
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J27	0.316

## 6.6. Proliferación en Células Polimorfonucleares

### 6.6.1 Viabilidad en Células Polimorfonucleares con Fracciones <3 kDa Fermentadas

El efecto de cada una de las fracciones <3 kDa en la viabilidad de células polimorfonucleares con y sin LPS a las 24 h y 48 h de incubación se muestran en la figura 7. Las células tratadas con la fracción <3 kDa y concentración de 30 ug/mL de la leche fermentada a las 24 h representan un porcentaje de viabilidad de un 90 hasta 95%, siendo los valores más altos para la fracción derivada de la leche fermentada con la cepa J23 y J27. Sin embargo, a las 48 de incubación fracción: célula, el porcentaje de viabilidad se redujo hasta en un 74%. Por el contrario, las células tratadas primero con la fracción y luego por el LPS muestran un menor porcentaje de viabilidad a las 24 h. Por ejemplo, la leche fermentada con la cepa 89 hasta 107% y desde 78 hasta 95% a las 48 h. Siendo las cepas de J23 y J27 las que no demostraron efectos adversos en la viabilidad de las PMN a concentraciones de 30, 50 y 100 ug/mL.





**Figura 7.** Porcentaje de viabilidad de las células polimorfonucleares tratadas con las fracciones <3 kDa a diferentes concentraciones de proteína (100, 50 y 30 ug/mL). *Limosilactobacillus fermentum* J23 (a y b), *Lactiplantibacillus pentosus* J24 (c y d), *Lactiplantibacillus plantarum* J25 (e y f) y *Lactiplantibacillus pentosus* J27 (g y h) y LPS en el tiempo de 24 y 48 h de exposición. Los valores indican la media  $\pm$  DE. Literales diferentes indican diferencias ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones y el efecto del uso del inductor LPS (\*).

La barrera intestinal puede ser modificada por agentes externos como el LPS bacteriano. El LPS proviene de bacterias gram-negativas y tienen la capacidad de inducir citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6) (Shao *et al.*, 2021). Aunado a lo anterior, este control de daño a la viabilidad celular en las PMN estimuladas con LPS, puede explicarse porque al inducir inflamación propician la secreción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) al crear un ambiente inflamatorio. Lo que promueve la reducción de la secreción de citocinas antiinflamatorias y reducción de las proinflamatorias al ser captados por PMN (Melbouci *et al.*, 2023).

## 6.7 Mantenimiento de la Línea Celular Caco-2

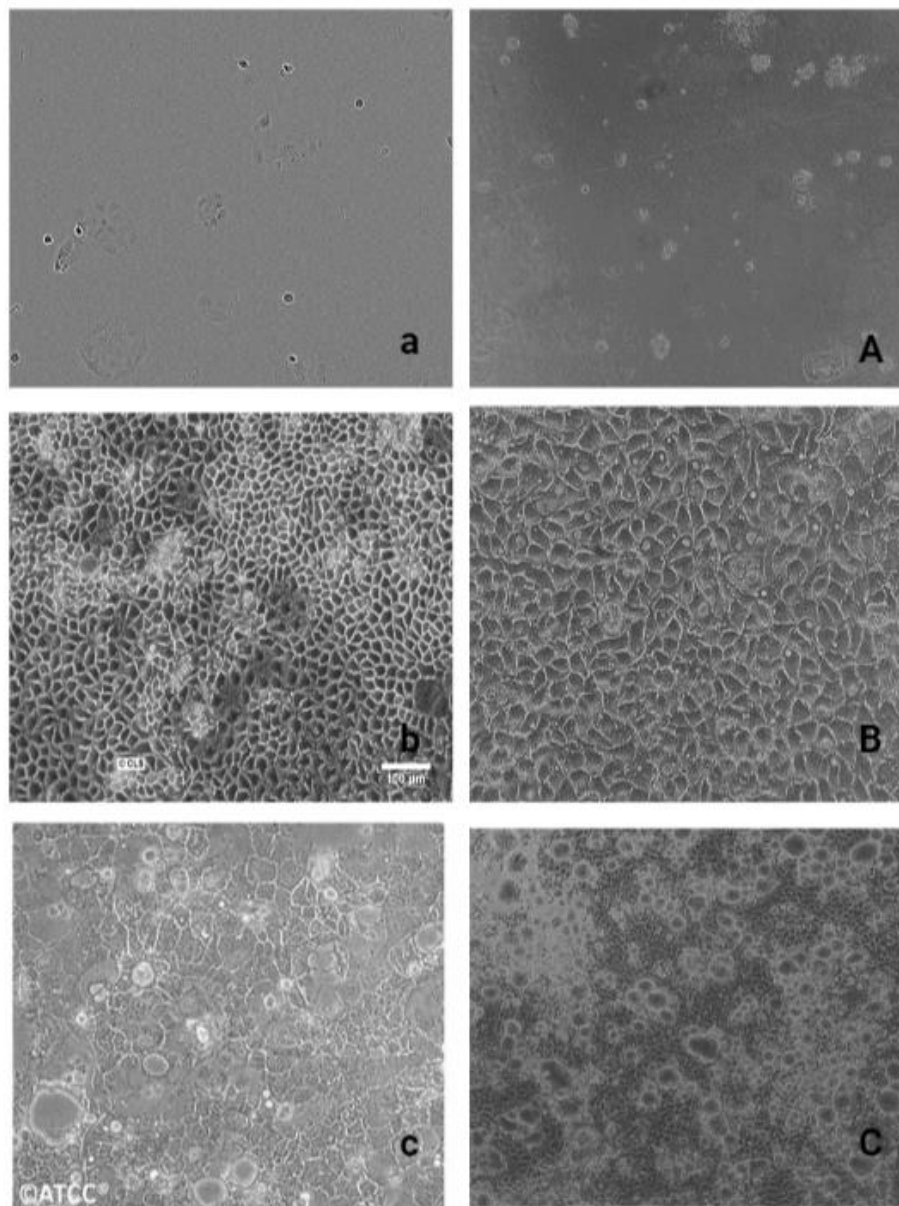
### 6.7.1. Cinética de Crecimiento

En la Figura 8 se muestra la curva de crecimiento de la línea celular Caco-2. En la curva de se puede observar que al día cuatro las células inician su fase exponencial y ésta termina a los 14 días, tiempo en que también se comienza con la formación de la monocapa y diferenciación celular. Estos resultados fueron similares a lo reportado por Castillo *et al.* (2006). Donde a partir del día 4 inicia la formación de la monocapa y aumenta la resistencia transepitelial. Estos ensayos son de importancia para el conocimiento de la línea celular y la evaluación del momento ideal donde las células se encuentren diferenciadas para poder aplicar los ensayos de evaluación de la permeabilidad intestinal.



**Figura 8.** Curva de crecimiento celular de la línea Caco-2 evaluada durante 16 días (10,000 células/mL, concentración inicial) (n=3).

Asimismo, el cambio de fase y formación de la monocapa se pueden observar en la figura 9. Las imágenes representan la morfología de las células al día uno (24 h posteriores a la siembra), día 7 (fase exponencial), día 14 (fase estacionaria). Las imágenes tomadas se compararon con imágenes previamente reportadas por la ATCC y Sigma-Aldrich. En la figura 10c, se puede observar como las células inician su proceso de diferenciación a enterocitos.



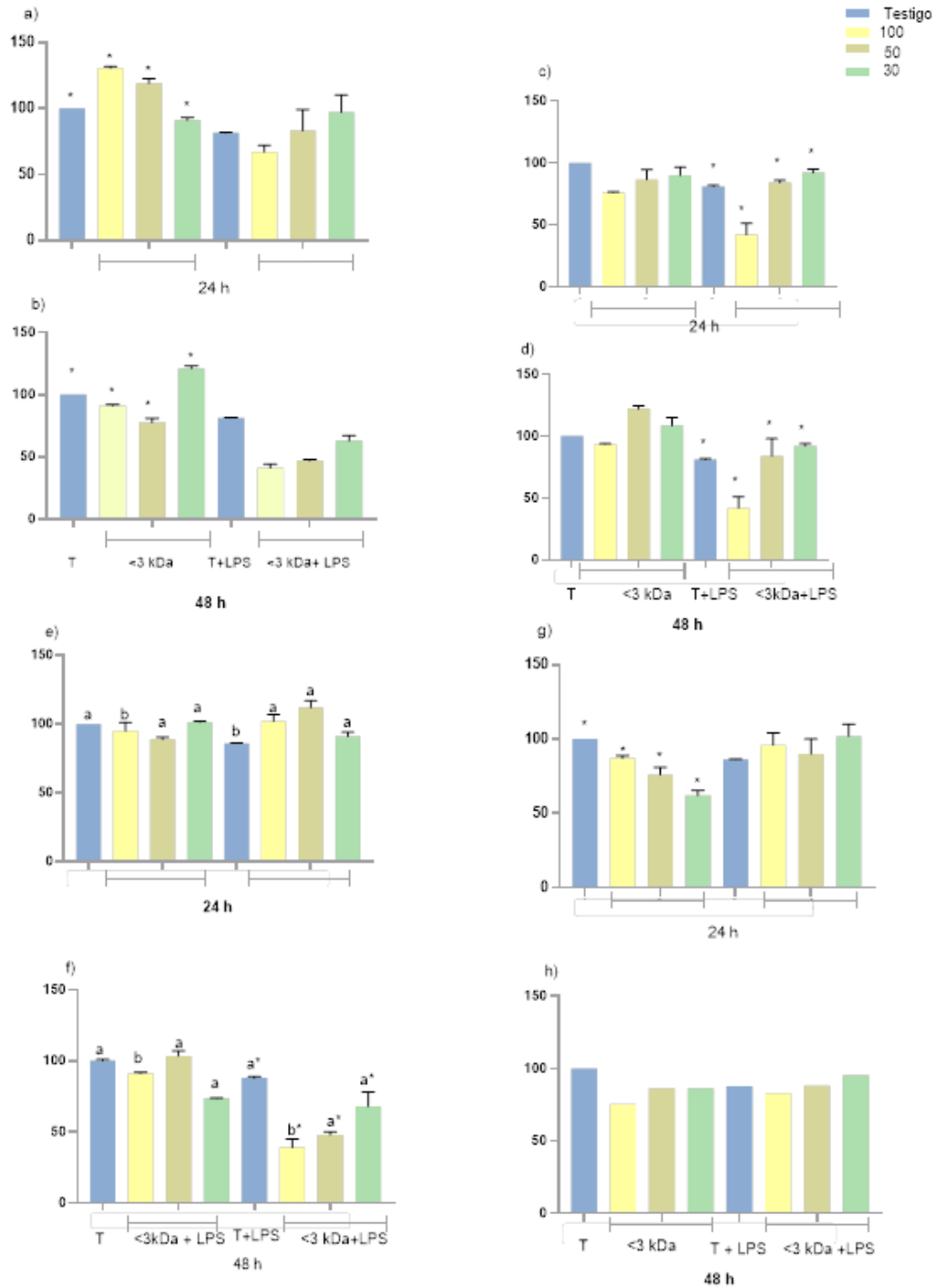
**Figura 9.** Imágenes representativas de la línea celular Caco-2. A) células Caco-2 después de 24 h de cultivo. Imagen reportada por Sigma-Aldrich. A). Células Caco-2 después de 24 h, imagen propia, b) Células Caco-2 en su fase exponencial (Sigma-Aldrich), B) Células Caco-2 en su fase exponencial, imagen propia, c) Células Caco-2 diferenciadas reportada por ATCC, C) Células Caco-2 diferenciadas imagen propia.

### 6.7.2. Resultados de Ensayos de Citotoxicidad

El efecto de las fracciones <3 kDa en la viabilidad de las células Caco-2 a las 24 y 48 h se muestran

en la figura 10. En general, se puede observar que la viabilidad de las células sin y con LPS se encuentra entre un 90% y 70% a las 24 y 48 h, respectivamente. Por el contrario, la fracción <3 kDa de la leche fermentada con J23 (100 y 50 µg/mL de proteína) promueve la proliferación a las 24 h, incrementando hasta en 20% con respecto al 100% de las células testigo (Figura 10a). Sin embargo, cuando las células son tratadas con LPS y la fracción, la viabilidad disminuye hasta un 70% y 30% a las 24 y 48 h, respectivamente (Figura 10a y b). En este caso, solo la concentración de proteína de 30 µg/mL logró mantener la viabilidad superior a un 50% en ambos tiempos de incubación, aunque no se muestra diferencia con respecto a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL. Las fracciones derivadas de las leches fermentadas con J24 y J25 a las 24 y 48 h mantienen la viabilidad de las células por arriba del 70% (Figura 10e a 10h). Sin embargo, al ser tratadas con el LPS y la fracción, la viabilidad se ve afectada significativamente a las 48, disminuyendo el porcentaje hasta en un 30% y solo la concentración de proteína de 30 µg/mL mantiene la viabilidad por arriba del 50%. Por último, la fracción de la leche fermentada con J27 tratada con LPS mantiene la viabilidad de las células entre un 90% y 70% a las 24 y 48 h, respectivamente (Figura 10g y 10h) y para todas las concentraciones evaluadas sin mostrar diferencia entre ellas ( $p>0.05$ ).

En general, los resultados obtenidos muestran que a mayor concentración de proteína, la viabilidad de las células se ve afectada, y es mayor el efecto a las 48 h. En particular, el LPS, mayor componente de la membrana de bacterias Gram-negativas, tiene la capacidad de activar macrófagos, células endoteliales y epiteliales, lo que conlleva a la producción de mediadores inflamatorios (Wei *et al.*, 2022). Además, concentraciones de entre 1-50 µg/mL de LPS conlleva una muerte y apoptosis celular. En particular, las células Caco-2 tienen una similaridad con las células absortivas del intestino delgado, es por ello que se han utilizado como un modelo para evaluar la función barrera del intestino (Calvello *et al.*, 2016).



**Figura 10.** Porcentaje de viabilidad de células Caco-2 tratadas con las fracciones <3 kDa a diferentes concentraciones de proteína (100, 50 y 30 ug/mL) y tiempos de incubación. *Limosilactobacillus fermentum* J23 (a y b), *Lactiplantibacillus pentosus* J24 (c y d), *Lactiplantibacillus plantarum* J25 (e y f) y *Lactiplantibacillus pentosus* J27 (g y h). Los valores indican la media  $\pm$  DE. Literales diferentes a y b indican diferencia ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de proteína para un mismo tiempo de incubación. (\*) indican diferencias entre tratamientos con LPS y sin LPS.

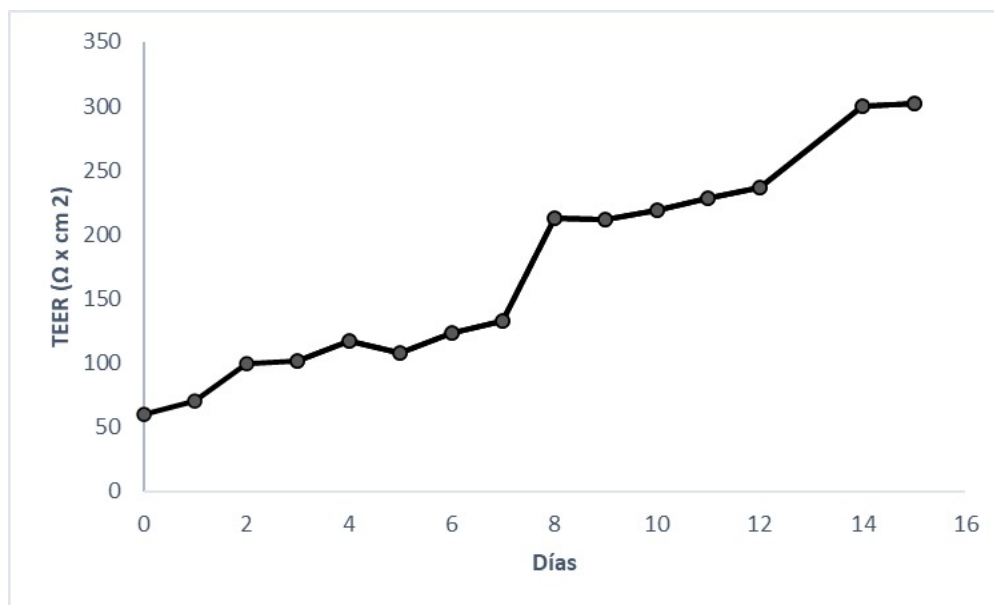
Los resultados obtenidos en nuestro estudio permiten observar que la fracción de la leche fermentada J27 ayuda a disminuir la muerte celular, por tanto puede ser utilizada como potencial para ayudar a mantener la integridad de la barrera intestinal. En este caso, los porcentajes de viabilidad que se obtienen con esta fracción es mayor a lo reportado por otros estudios, donde se logró observar que péptidos derivados de leche bovina mantienen la viabilidad hasta en un 40% (Tonolo *et al.*, 2018).

En un estudio reportado por Chen y colaboradores (2021), evaluaron la capacidad antiinflamatoria de leches fermentadas con *L. paracasei* 01 en células Caco-2. Sus resultados mostraron que estas leches promueven la proliferación hasta en un 120% en comparación con leche sin fermentar y tratadas térmicamente. Adicionalmente, se obtuvo una disminución de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ .

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que las fracciones pueden contener péptidos que pueden ser los responsables de generar un efecto antiinflamatorio y promover la protección de la barrera intestinal.

#### 6.8. Evaluación de la Permeabilidad Intestinal

En la figura 11 se muestran los resultados de la resistencia transepitelial evaluada en las células Caco-2. Considerando los valores obtenidos se puede observar que las células comienzan a formar la monocapa a partir del día 3 de incubación. El valor de TEER a los 3 días fue de  $102 \Omega / \text{cm}^2$  y se incrementó a  $212 \Omega / \text{cm}^2$  al día 8 y a  $300 \Omega / \text{cm}^2$  para el día 15. Estudios previos han documentado que el valor de TEER para la formación de la monocapa celular se encuentra en un rango de  $150-400 \Omega / \text{cm}^2$  (Srinivasan *et al.*, 2015).

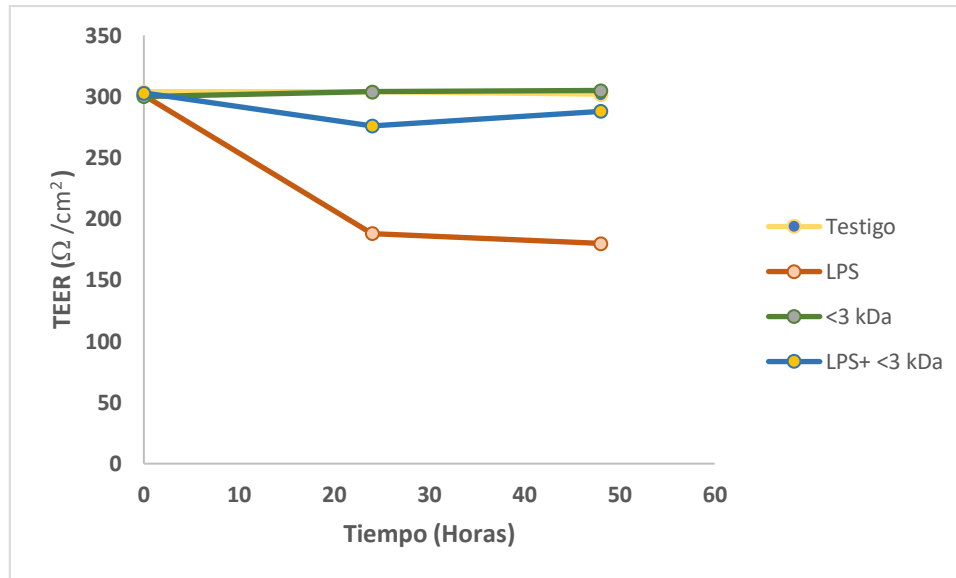


**Figura 11.** Valores de la resistencia transepitelial durante el mantenimiento de la línea celular Caco-2.

Una vez formada la monocapa, las células fueron tratadas con LPS y se agregó la fracción de la leche fermentada con J27 a una concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$  (mejores resultados en porcentajes de viabilidad en células PBMC y Caco-2). Los valores de TEER se muestran en la figura 12. Las células testigo (sin inductor) mantuvieron un valor de TEER de 300  $\Omega/\text{cm}^2$ , hasta las 48 h (tiempo de duración del ensayo). Por el contrario, cuando las células fueron expuestas al LPS, la integridad de la monocapa se vio afectada a las 24 h al disminuir el valor de TEER de 301  $\Omega/\text{cm}^2$  a 188  $\Omega/\text{cm}^2$  y 180  $\Omega/\text{cm}^2$  a las 48 h. Sin embargo, al adicionar la fracción de la leche fermentada se observó una protección de la monocapa ya que el valor de TEER fue igual que las células no tratadas con valores de 305  $\Omega/\text{cm}^2$  a las 48 h.

Los resultados sugieren que la incorporación de la fracción de la leche fermentada con J27 ayuda a mantener la estructura de la monocapa celular, principalmente cuando las células se exponen al LPS como inductor de inflamación.





**Figura 12.** Valores de TEER en células Caco-2 tratadas con LPS y la fracción <3 kDa de la leche fermentada con *Lactiplantibacillus plantarum* J27.

Los valores de TEER es una variable que puede indicar si la monocapa celular se ve afectada ante un antígeno como es el LPS. La integridad de la monocapa evita que agentes extraños ingresen a lámina propia y en consecuencia generen una respuesta inflamatoria (Sánchez-Moya *et al.*, 2023). Se ha demostrado que los productos lácteos fermentados tienen la capacidad de modular la respuesta inmunológica estimulando la producción de citocinas como IL-10 e inhibiendo a citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la cual influye en el mantenimiento de la barrera intestinal (Salvo-Romero *et al.*, 2015; Reyes-Díaz *et al.* 2018; Santiago-López *et al.* 2019).

## 7. CONCLUSIÓN

Los hallazgos obtenidos en la investigación demostraron que las leches fermentadas con *Limosilactobacillus* (*Limosilactobacillus fermentum* J23) y *Lactiplantibacillus* (*Lactiplantibacillus pentosus* J24, *Lactiplantibacillus plantarum* J25, *Lactiplantibacillus pentosus* J27) presentaron un potencial efecto en la estimulación de la actividad metabólica de células PMBC y Caco-2. Además, con la fracción <3 kDa de la leche fermentada con *Lactiplantibacillus pentosus* J27 (30 ug/mL de proteína) se obtuvo el mejor porcentaje de viabilidad tanto para células PBMC como para Caco-2. Esta misma fracción, también ayudó a mantener la integridad de la monocapa celular en Caco-2 al conservarla sin daños aparentes por el inductor LPS. Con base en lo anterior, se podría sugerir que esta fracción podría estar involucrada en promover la regulación de la permeabilidad intestinal.

## 8. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos de la investigación respaldan el potencial de las leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas como coadyuvantes para la regulación de la permeabilidad intestinal. Sin embargo, será necesario complementar los hallazgos obtenidos con estudios que permitan identificar a los péptidos que se encuentran en la fracción para de esta manera, poder establecer posibles mecanismos que promuevan la permeabilidad intestinal. Además, se recomienda realizar estudios con marcadores como lactulosa/manitol, lo que nos dará un indicio de la regulación de las fugas que se pueden presentar ante una inflamación. Por otro lado, también es de importancia evaluar la expresión de las proteínas de unión estrecha como claudinas y zonulinas, las cuales nos brindarán una mejor información para considerar la regulación de la permeabilidad intestinal.

## 8. REFERENCIAS

- Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 27-43.
- Adriaanse MP, Tack GJ, Passos VL, Damoiseaux JG, Schreurs MW, van Wijck K, Riedl RG, Masclee AA, Buurman WA, Mulder CJ, Vreugdenhil AC. 2013. "I-FABP sérica como marcador de daño de enterocitos en la enfermedad celíaca y su relación con la atrofia de las vellosidades y los autoanticuerpos circulantes" . *Aliment Pharmacol Ther* 37 : 482–490. doi: 10.1111/apt.12194.
- Aguilar-Toalá. J.E., Santiago-López L., Peres CM., Peres C., Garcia H.S., Vallejo- Cordoba B. y Hernández-Mendoza A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*. 100(1): 65-75.
- Ahmad R., Sorrell M.F., Batra S.K., Dhawan P. y Singh A.B. 2017. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunology*. 10(2): 307- 317.
- Al Mijan M. y Lim B.O. 2018. Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future trends. *World Journal of Gastroenterology*. 24(25): 2673.
- Almada-Corral A., Santiago-López L., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A. F. y Hernández-Mendoza A. (2022). Development of a Functional Fermented Milk by Using Single or Multistrain Potential Probiotic Cultures. *ACS Food Science & Technology*.
- Aliahmat N.S., Noor M.R., Yusof W.J., Makpol S., Ngah W.Z y Yusof Y.A. 2012. Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by Piper betle, tocotrienol rich fraction and *Chlorella vulgaris* in aging C57BL/6 mice. *Clinics*. 67(12): 1447–1454.
- Al-Sadi R., Khatib K., Guo S., Ye D., Youssef M. y Ma T. 2011. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 300(6): G1054-G1064.
- W.N. & Zahiruddin W.M. 2017. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*. 24(5): 101
- Bermejo F., Guerra I. y López-Sanromán A. 2012. Colitis ulcerosa. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 11(5): 266-274.
- Bischoff S.C., Barbara G., Buurman W., Ockhuizen T., Schulzke J.D., Serino M., Tilg, H., Watson A. y Wells J.M. 2014. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 14(1): 1-25.
- Camou J.P, González Ríos H, Valenzuela Melendres M. Cap. 12. Alimentos Funcionales Cárnicos. En: los alimentos funcionales: un nuevo reto para la industria de alimentos (español). Editorial AGT Editor S.A de C.V. pp.325-357.
- Campmans-Kuijpers M.J y Dijkstra G. (2021). Food and food groups in inflammatory bowel disease (Ibd): The design of the groningen anti-inflammatory diet (graid). *Nutrients*. 13(4):

1067.

- Calvello R, Aresta A, Trapani A, Zambonin C, Cianciulli A, Salvatore R, Clodoveo ML, Corbo, F & Francini, C. (2016) Bovine and soybean milk bioactive compounds: Effects on inflammatory response of human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem* 210:276–285. pmid:27211648
- Coriat J., Azuero AJ., Tamayo SG., Rodríguez MCR., Cardona CC. y Rosselli D. 2017. Uso de probióticos en el síndrome de intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal: una revisión de la literatura. *Revista colombiana de Gastroenterology*. 32(2): 141-149.
- Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S, Maltinti G. 2003. Papel de la calprotectina fecal como marcador no invasivo de inflamación intestinal . *Dig Liver Dis* 35: 642–647.
- Cui C., Schoenfelt K.Q., Becker K.M. y Becker L. (2021). Isolation of polymorphonuclear neutrophils and monocytes from a single sample of human peripheral blood. *STAR protocols*. 2(4), 100845.
- Chen S., Zhang C., He B., He R., Xu L. y Zhang S. 2021. The Role of lncRNAs in Regulating the Intestinal Mucosal Mechanical Barrier. *BioMed Research International*. 2021: 2294942.
- Del Bo C., Bernardo S., querubini A., Porrini M., Gargari G., Hidalgo-Liberona N., Gonzalez R., Zamora R., Perón G., Marino M., Gigliotti L., Winterbone M., Kirkup B., Kron P., Lacueva C.A., Guglielmetti y Riso P. 2021. A polyphenol-rich dietary pattern improves intestinal permeability, evaluated as serum zonulin levels, in older subjects: The MaPLE randomised controlled trial. *Clinical Nutrition*. 40(5): 3006-3018.
- Devraj K., Guérit S., Macas J., & Reiss Y. 2018. An in vivo blood-brain barrier permeability assay in mice using fluorescently labeled tracers. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (132), e5703.
- Dodda D., Chhajed R y Mishra J. 2014. Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: possible morphological and biochemical alterations. *Pharmacological Reports*. 66(1). 169-173.
- Donkor O.N., Henriksson A., Singh T.K., Vasiljevic T. y Shah N.P. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*. 17(11). 1321–1331.
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic, T. y Shah NP. 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*. 87(1): 21-38.
- Ermund A, Schütte A, Johansson ME, Gustafsson JK, Hansson GC. (2013) Estudios de moco en estómago, intestino delgado y colon de ratón. I. Las capas mucosas gastrointestinales tienen diferentes propiedades según la ubicación y también sobre las placas de Peyer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G341–G347.
- Escaffi M.J., Navia C., Quera R. y Simian D. 2021. Nutrición y enfermedad inflamatoria intestinal: Posibles mecanismos en la incidencia y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 32(4): 491-501.
- Falloon J., & Gallin J.I. 1986. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of allergy and clinical immunology*, 77(5), 653-662.

- Farré R., Fiorani M., Abdu Rahiman S. and Matteoli G. 2020. Intestinal permeability, inflammation and the role of nutrients. *Nutrients*. 12(4): 1185.
- Figueroa C. 2019. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 30(4): 257-261.
- Ferré M.P.B., Boscá-Watts M.M. y Pérez M.M. 2018. Enfermedad de Crohn. *Medicina Clínica*. 151(1): 26-33.
- Feldman G.J., Mullin JM. y Ryan, M.P. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(6): 883-917.
- Garcia-Hernandez V., Quiros M. and Nusrat A. 2017. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1397(1): 66-79.
- Galipeau H.J. y Verdu E.F. 2016. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science. *Neurogastroenterology & Motility*. 28(7): 957-965.
- Gao Y.N., Li S.L., Yang X., Wang J.Q. y Zheng N. 2021. The Protective Effects of Lactoferrin on Aflatoxin M1-Induced Compromised Intestinal Integrity. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(1): 289.
- González-Olivares L.G., Jiménez-Guzmán J., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L. y García-Garibay M. 2011. Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2): 179-188.
- González-Córdova A.F., Torres-Llanez M.J., Rodríguez-Figueroa J.C., Espinosa-de-los-Monteros J.J., García H.S. & Vallejo-Cordoba B. 2011. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus* Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in milks fermented by *Lactobacillus* strains. *CyTA-Journal of Food*. 9(2):146-151.
- Gómez-Cortés E., Perez-Cabeza de Vaca R., Martínez-Hernández J.E., Guerrero-Celis N., Mondragón-Terán P., Alcaráz-Estrada S.L., López-Hernández L.B. y Suárez-Cuenca JA. 2015. Permeabilidad intestinal y eje intestino-hígado. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 20(1): 83-89.
- Garrido-Urbani S., Bradfield P.F. y Imhof B.A. 2014. Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell and Tissue Research*. 355(3): 701-715.
- Hall C. H., Campbell E. L., & Colgan S. P. 2017. Neutrophils as components of mucosal homeostasis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 4(3), 329-337.
- Haque, E., Chand, R. y Kapila, S. 2008. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International*, 25(1), 28-43.
- Huadong S., CyChow E., Liu S., Du Y. y Punzada K. 2008. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 4(4):395-411.
- Hering N.A., Luettig J., Krug S.M., Wiegand S., Gross G., van Tol E.A. Schulzke J.D & Rosenthal R. 2017. Lactoferrin protects against intestinal inflammation and bacteria-induced barrier dysfunction in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1405(1): 177-188

- Inczefi O., Bacsur P., Resál T., Keresztes C. y Molnár T. 2022. The influence of nutrition on intestinal permeability and the microbiome in health and disease. *Frontiers in Nutrition*. 9:718710.
- Khan I.T., Nadeem M., Imran M., Ullah R., Ajmal M. y aspal M.H. 2019. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*. 18(1): 1-13.
- Kim S. y Kim, G.H. 2017. Roles of claudin-2, ZO-1 accludindin in leaky HK-2 cells. *PLoS One*. 12(12): e0189221.
- Koch S. y Nusrat A. 2012. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 7: 35-60.
- Lacerda J.F., Lagos A.C., Carolino E., Silva-Herdade A.S., Silva M. and Sousa Guerreiro, C. 2021. Functional food components, intestinal permeability and inflammatory markers in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrients*. 13(2): 642.
- Landa-Solis C., Olivos-Meza A., Umanzour H., Cárdenas-Soria V.H. & Ibarra C. 2020. Aislamiento y Caracterización de Células Troncales Mesenquimales en Sangre Periférica Humana. *Investigación en Discapacidad*, 7(2), 47-
- Lee SH. 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*. 13(1): 11.
- Leiva M.D.M.A. 2014. Enfermedad de Crohn. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. 71(610): 259-260.
- Li N., Lewis P., Samuelson D., Liboni K., & Neu J. (2004). Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(3), G726-G733.
- Li B.R., Wu J., Li H.S., Jiang ZH., Zhou XM., Xu CH., Ding D., Zha J.M. y He W.Q. 2018. In vitro and in vivo approaches to determine intestinal epithelial cell permeability. *Journal of LVisualized Experiments*. (140): e5703
- Lynn K.S., Peterson Rj. y Koval M. 2020. Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(9): 183339.
- Limketkai B.N., Wolf A. y Parian A.M. 2018. Nutritional Interventions in the Patient with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*. 47:155–177.
- Li Q., Zhang Q., Wang M., Zhao S., Ma J., Luo N., Li N., Li Y., Xu G. y Li J. 2008. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clinical Immunology*. 126(1): 67-80.
- Liu W, Mi S., Ruan Z., Li J., Shu X., Yao K., Jiang M., Deng Z.Y. 2017. Dietary Tryptophan Enhanced the Expression of Tight-Junction Protein ZO-1 in Intestine. *Journal of Food Science*. 82: 562–567.
- Le Ferrec E., Chesne C., Artusson P., Brayden D., Fabre G., Gires P., Guillou F., Rousset., Rubas W. y Scarino M.L. 2001. In vitro models of the intestinal barrier – the report and recommendations of ECVAM Workshop 46. *ATLA-Altern Lab Anim*. 29:649–668.

- Lea, T. 2015. Caco-2 cell line. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. 103-111.
- Moreira V.F y López S.R. 2005. Enfermedad de Crohn. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 97(11): 838-838.
- Loftus E.V. y Sandborn W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. 2002. *Gastroenterol Clinics of North America*. 31(1): 1–20.
- Maroto N. y Hinojosa J. 2005. Colitis ulcerosa. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 97(8): 602-602.
- Maldonado M.C., Cazorla S.I., Balcells M.F., Martínez M.J., Lemme J.M. y Perdigon G.D.V. 2020. Consumo de leches fermentadas probióticas y su impacto sobre el sistema inmune. Instituto Danone. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 6 pp.
- Martirosyan D., von Brugger J. and Bialow S. 2021. Functional food science: Differences and similarities with food science. *Functional Foods in Health and Disease*. 11(9): 408-430.
- Medina E. 2013. Enfermedad inflamatoria intestinal (I): clasificación, etiología y clínica. *Anales de Pediatría continuada*. 11(2): 59-67.
- Meddings JB, Gibbons I. 1998. Discriminación de alteraciones específicas del sitio en la permeabilidad gastrointestinal en la rata. *Gastroenterología* 114: 83–92.
- Meyer A. y Treton X. 2018. Colitis ulcerosa. *EMC - Tratado de medicina*. 22(1):1-8.
- Michielan A., and D’Inca, R. 2015. Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut. *Mediators of inflammation*. 628157.
- Miyoshi Y., Tanabe S., Suzuki XT. 2018. Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occludin expression. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal Liver Physiology*. 311: G105–G116.
- Murti T. 2021. Fermentation of Bovine, Non-Bovine and Vegetable Milk. *Fermentation: Processes, Benefits and Risks*, 83.
- Ng S.C., Shi H.Y., Hamidi N., Underwood F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panacción R., Ghosh S., Wu J.C.Y., Chan F.K.L., Cantado J.J.Y y Kaplan G.G. 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21<sup>st</sup> century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. 390(10114): 2769-2778.
- Oporto LA. y Magariños, J.C.D. Optimización del MTT como método de cuantificación de la proliferación celular de esplenocitos murinos (Doctoral dissertation).
- Oez S., Platzer E., & Welte K. 1990. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut*. 60:97-102.
- Poritz LS., Garver KI., Green C., Fitzpatrick L., Ruggiero F. y Koltun WA. 2007. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *Journal of Surgical Research*. 140(1): 12-19.
- Praveen V., Chong S. y Morrison, R. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44(2000) 301-312.



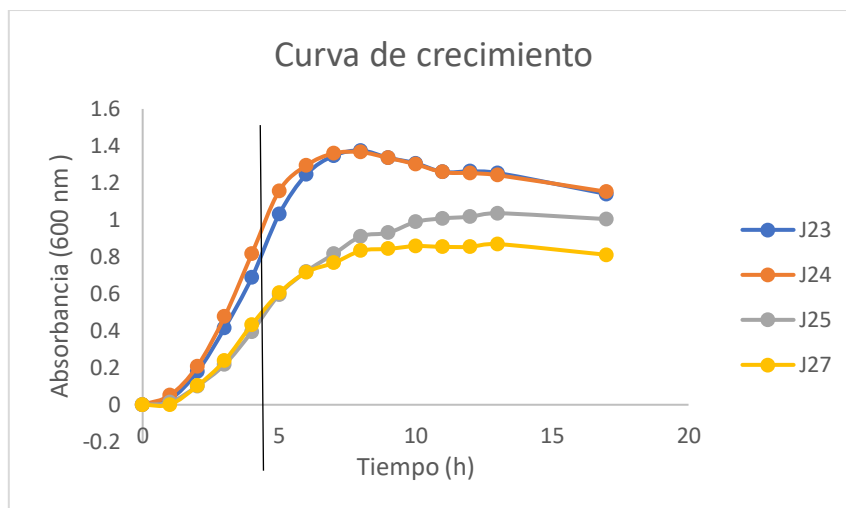
- Putt KK., Pei R., White H.M. y Bolling BW. 2017. Yogurt inhibits intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cells by increasing tight junctions. *Food & function*. 8(1): 406-414.
- Ramírez J.C., Rosas P., Velázquez M.Y., ULLOA J.A., y Arce F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. CONACYT.
- Reyes-Díaz A., Mata-Haro V., Hernández J., González-Córdova A. F., Hernández-Mendoza A., Reyes-Díaz, R., ... & Vallejo-Cordoba B. 2018. Milk fermented by specific lactobacillus strains regulates the serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokines in a LPS-stimulated murine model. *Nutrients*. 10(6): 691.
- Rittirsch D., Flierl M.A., Nadeau B.A., Day D.E., Huber-Lang M.S., Grailer JJ., Zetoune F.S., Andejkovic A.V., Fasano A. y Ward PA. 2013. Zonulin as prehaptoglobin2 regulates lung permeability and activates the complement system. *American journal of physiology-Lung cellular and molecular physiology*. 304(12): L863-L872.
- Rojas CA., Sánchez-Londoño S., Rojas NE., Sepúlveda M., García J., Jiménez D., ... y Tobón A. 2020. Descripción clínico-epidemiológica de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en una clínica de cuarto nivel en Cali. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 35(2): 166-173.
- Rosa L., Cutone A., Lepanto MS., Paesano R. y Valenti P. 2017. Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(9): 1985.
- Salvo-Romero E., Alonso-Cotoner C., Pardo-Camacho C., Casado-Bedmar M. y Vicario, M. 2015. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 107(11), 686-696.
- Sánchez-Moya, Ydjedd, S., Frontela-Saseta C., López-Nicolás R & Ros-Barruezo G. 2023. "Efecto antiinflamatorio del suero de leche de diferentes especies tras una digestión in vitro." *Nutrición Hospitalaria* 40(3), 551-558.
- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*. 36(21), 124-129.
- Santiago-López L., Hernández-Mendoza A., Mata-Haro V., Vallejo-Córdova B., Wall- Medrano A., Astiazarán-García H., Estrada-Montoya M. y González-Córdova AF. 2018. Effect of Milk Fermented with *Lactobacillus fermentum* on the Inflammatory Response in Mice. *Nutrients*. 10(8), 1039.
- Srinivasan B., Kolli AR., Esch MB., Abaci HE., Shuler ML & Hickman JJ. 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*. 20(2), 107-126.
- Segura-Campos M., Chel-Guerrero L., & Betancur-Ancona D. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista chilena de nutrición*. 37(3), 386-391.
- Seethaler B., Basrai M., Neyrinck AM., Nazare JA., Walter J., Delzenne NM. y Bischoff SC. 2021. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 321(1): G11-G17.
- Serafini M. y Peluso I. 2016. Functional foods for health: the interrelated antioxidant and anti-

- inflammatory role of fruits, vegetables, herbs, spices and cocoa in humans. *Current Pharmaceutical Design*, 22(44): 6701-6715.
- Sigala-Robles R., Santiago-López L., Hernández-Mendoza A., Vallejo-Cordoba B., Mata-Haro V., Wall-Medrano A. y González-Córdova AF. 2022. Peptides, Exopolysaccharides, and Short-Chain Fatty Acids from Fermented Milk and Perspectives on Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Diseases and Sciences*. 1-12.
- Silva F., Gatica T. y Pavez, C. 2019. Etiología y fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 30(4), 262-272.
- Srinivasan, B., Kolli, AR., Esch, MB., Abaci, HE., Shuler, ML. y Hickman, JJ. 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, 20(2), 107-126.
- Stobiecka M., Król J. y Brodziak A. 2022. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals*. 12(3): 245.
- Smecuol E.G. 2005. Permeabilidad intestinal. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 35(3), 190-195.
- Tai Y., Tian M., Chen Y., You P., Song X., Xu B., Duan C & Jin D. 2023. Preparation of PLGA microspheres loaded with niclosamide via microfluidic technology and their inhibition of Caco-2 cell activity in vitro. *Frontiers in Chemistry*, 11
- Tanaka H., Takechi M., Kiyonari H., Shioi G., Tamura A. y Tsukita S. 2015. “Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice.”. *Gut*. 64(10), 1529–1538.
- Tawfik M.M., Xie H., Zhao C., Shao P. y Farag MA. 2022. Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*. 208: 948-961.
- Thomson A., Smart K., Somerville MS., Lauder SN., Appanna G., Horwood J., Lawrence, S., Srivastava., Durai D., Scurr M, Keita A., Gallimore A & Godkin A. 2019. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC gastroenterology*, 19(1), 1-14.
- Torres-Llenez M.J., Vallejo-Córdova B. y González-Córdova A.F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Alan*. 55 (2).
- Toscano M., De Grandi R., Miniello VL., Mattina R. y Drago L. 2017. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. *Digestive and Liver Disease*. 49(3): 261-267.
- Tsukita S., Tanak H. y Tamura A. 2019. The claudins: from tight junctions to biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 44(2): 141-152.
- Tsukita S., Furuse M. y Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(4), 285-293.
- Vistica VT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 51(10):2515-20.

- Wells J.M., Brummer R.J., Derrien M., MacDonald T.T., Troost F., Cani PD., Theodorou V., Dekker J., Méheust A., M de Vos W., Mercenier A., Nauta A. y Garcia-Rodenas C.L. 2017. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 312(3): G171-G193.
- Wei, C.X., Wu, J.H., Huang, Y.H., Wang, X.Z., & Li, J.Y. 2022. *Lactobacillus plantarum* improves LPS-induced Caco2 cell line intestinal barrier damage via cyclic AMP-PKA signaling. *Plos one*, 17(5), e0267831.
- Wu C.J., Mannan P., Lu M. y Udey M.C. 2013. Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) Regulates Claudin Dynamics and Tight Junctions. *Journal of Biological Chemistry*. 288(17): 12253-12268.
- Yamamoto-Furusho J.K., Bosques-Padilla F.J., Charúa-Guindic L., Cortés-Espinosa T., Miranda-Cordero R.M., Saez A. y Ledesma-Orsorio Y. 2020. Epidemiología, carga de la enfermedad y tendencias de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en México. *Revista de Gastroenterología de México*. 85(3), 246-256.
- Yamamoto-Furusho J.K., Bosques-Padilla F., De-Paula J., Galiano MT., Ibañez P., Juliao F., Rocha J.L., Steinwurz F., Veitía G. y Zaltman C. 2017. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation. *Revista de Gastroenterología de México*. 82(1): 46-84.
- Yoda K., Miyazawa K., Hosoda M., Hiramatsu M. y Yan F. 2014. *Lactobacillus* GG-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal epithelial homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor. *European Journal of Nutrition*. 53(1):105–115
- Yu T.X., Chung H.K., Xiao L., Piao J.J., Lan S., Jaladanki S.K., Turner D.J., Raufman J.P., Gorospe M. y Wang J.Y. 2020. Long noncoding RNA H19 impairs the intestinal barrier by suppressing autophagy and lowering paneth and goblet cell function. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 9(4): 611-625.
- Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., ... and Schulzke JD. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 56(1): 61-72
- Zhen B., van Bergenhenegouwen J., Overbeek S., van de Kant H.J., Garsen J., Folkerts G., Vos P., Morgan M.E. y Kraneveld A.D. 2014. *Bifidobacterium breve* attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PloS one*. 9(5): e95441.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Curva de Crecimiento de *Lactobacillus spp.*



Curvas de crecimiento de las bacterias ácido lácticas de estudio.

## 10.2. Oficio Aprobación de Comité de Ética



CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.

CIAD

SEP-CONACYT-UNAM-IPN-GOBIERNO DE SONORA-GOBIERNO DE SINALOA-GOBIERNO DE GUERRERO-GOBIERNO DE CHIHUAHUA-GOBIERNO DE COAHUILA-GOBIERNO DE DURANGO-GOBIERNO DE NAYARIT-GOBIERNO DE OAXACA-GOBIERNO DE QUERÉTARO-GOBIERNO DE SAN LUIS POTOSÍ-GOBIERNO DE TABASCO-GOBIERNO DE TAMAULIPÁN-GOBIERNO DE VERACRUZ-GOBIERNO DEL ESTADO DE MÉXICO-GOBIERNO FEDERAL  
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

CE/022/2019

Hermosillo, Sonora. Diciembre 16, 2019

**Dr. Aarón F. González Córdova**  
Investigador Titular  
Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal  
CIAD  
Presente

Estimado Dr. González:

Me permito comunicarle que el Comité de Ética de nuestro centro ha revisado cuidadosamente la propuesta de investigación "Dilucidando los componentes y/o metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de las leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas", del cual usted es el responsable técnico.

El Comité de Ética realizó las siguientes recomendaciones:

1. Es necesario mencionar que se usará protección durante el bioensayo que son considerados como primera barrera de precaución (bata, guantes, cubre boca y cofia). Es necesario considerar la Norma Oficial Mexicana, para asegurar la conducción apropiada del estudio, aunque los *Lactobacillus* spp. no sean patógenos para el hombre.
2. Se recomienda tener un botiquín de primeros auxilios para tratar heridas por mordeduras y rasguños por exposición al manejo de animales.
3. La persona que manejará los animales debe recibir entrenamiento y capacitación antes de iniciar el bioensayo, particularmente cuando se aplican fluidos vía peritoneo, intramuscular, dérmica, o por cánula.
4. Debe considerarse el control de los ciclos luz-oscuridad, temperatura, humedad para el bienestar del animal en el experimento.
5. Se considera que el número de ratones que serán usados durante este estudio es muy alto. Se recomienda reducir de 10 a 5 ratones por tratamiento (7 como máximo) para obedecer el criterio de las tres R establecido por Russel y Burch.
6. Por otro lado, en el caso de los participantes humanos donadores de sangre (n=6), se observa que en la Carta de Consentimiento Informado existe una declaratoria antes de la firma del participante. Recomendamos remover el último párrafo de la misma ("También otorgo.....en el futuro"). Además, debe incluirse la firma de dos testigos.

Por lo anterior y a reserva de la atención que reciban las recomendaciones anteriores, el CEI de CIAD ha aprobado la realización del estudio en los términos planteados, para lo cual le desea el mejor de los éxitos.

Atentamente

**Dr. Luis Quihui Cota**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación de CIAD

C.c.p. Archivo

