



Universidad
Nacional
de Loja

**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA LACTASA DEL
INTESTINO DELGADO EN CUYES DESDE EL
NACIMIENTO HASTA LAS 7 SEMANAS DE EDAD**

Trabajo de tesis previo a la obtención del título de
MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNISTA

AUTOR

Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

DIRECTOR

Dr. Rodrigo Abad Guamán, Ph.D.

**LOJA - ECUADOR
2019**

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS


Dr. Rodrigo Abad Guamán, Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA

Que he revisado la presente tesis titulada "CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA LACTASA DEL INTESTINO DELGADO EN CUYES DESDE EL NACIMIENTO HASTA LAS 7 SEMANAS DE EDAD" realizada por la Srta. Egresada GABRIELA STEFFANIA PARRA RIVADENEIRA, la misma que CULMINÓ DENTRO DEL CRONOGRAMA APROBADO, cumpliendo con todos los lineamientos impuestos por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, AUTORIZO QUE SE CONTINÚE CON EL TRÁMITE DE GRADUACIÓN.

Loja, 28 de Febrero del 2019

Atentamente



Dr. Rodrigo Abad Guamán, Ph.D.
Director de Tesis

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA LACTASA DEL INTESTINO
DELGADO EN CUYES DESDE EL NACIMIENTO HASTA LAS 7
SEMANAS DE EDAD

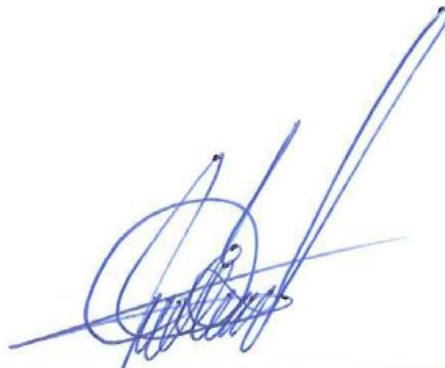
POR

Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

Tesis presentada al tribunal de grado como requisito previo a la obtención
del título de: MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

HA SIDO APROBADO

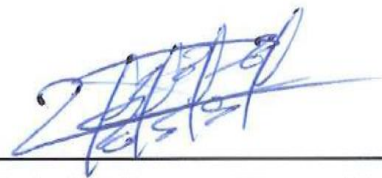
Enero 2020



Dr. Galo Escudero Sánchez, Mg.Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Junior Villa Quezada, Mg.Sc.
VOCAL



MVZ. Edwin Mizhquero Rivera, Mg.Sc.
VOCAL

AUTORÍA

Yo, **Gabriela Steffania Parra Rivadeneira**, declaro ser autora del presente trabajo de tesis que ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones, y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación, son de absoluta responsabilidad de su autor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

AUTOR: Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

FIRMA:



CÉDULA: 1150129680

FECHA: Enero 2020

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR
PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y
PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Yo **Gabriela Steffania Parra Rivadeneira**, declaro ser el autora de la tesis titulada "CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA LACTASA DEL INTESTINO DEL- GADO EN CUYES DESDE EL NACIMIENTO HASTA LAS 7 SEMANAS DE EDAD", como requisito para optar al grado de Médica Veterinaria Zootecnista, auto- rizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera, en el Repositorio Digital Institucional (RDI): Las Personas puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de Información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad. La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero, con fines académicos. Para constancia de esta autorización, firmo en la ciudad de Loja, a los 29 días del mes de ENERO del 2020.

FIRMA:



Autor: Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

Cédula de identidad: 1150129680

Dirección: Loja, Belizario Moreno y Malacatos, La Banda

Correo electrónico: gabsteffa0509@gmail.com

Teléfono: 0982800551

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis:

Dr. Rodrigo Abad Guamán, Ph.D.

Tribunal de Grado:

Dr. Galo Escudero Sánchez, Mg.Sc. (Presidente)

Ing. Junior Villa Quezada, Mg.Sc (Vocal)

MVZ. Edwin Mizhquero Rivera, Mg.Sc (Vocal)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios y a la Virgencita del Cisne por bendecirme a lo largo de toda mi vida, dándome la fortaleza y perseverancia de seguir adelante cuando pensé rendirme.

A mis abuelitos maternos por haberme apoyado durante toda mi carrera y a mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y por el gran apoyo moral que recibí toda mi vida estudiantil.

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Laja por haberme abierto sus puertas y darme la oportunidad de formarme para ser una profesional.

Agradezco infinitamente al Dr. Rodrigo Abad, director de mi trabajo de tesis quien supo orientarme con sus valiosos conocimientos a realizar esta investigación. De la misma manera mi sincero agradecimiento al Ing. Israel Villa por haber colaborado en el desarrollo de este trabajo y finalmente al Dr. Roberto Bustillos por brindar sus conocimientos y experiencias que han sido de gran ayuda para mi formación académica.

Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado primeramente a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y derrotas que me han enseñado a ser mejor cada día.

Dedico esta tesis con cariño y amor especialmente a mi querida familia que me han brindado su apoyo incondicional y a mi pequeña princesa Ana Paula González Parra que a pesar de su corta edad ha sabido comprender el esfuerzo que día a día realicé por alcanzar este sueño hecho realidad.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito, en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

En memoria de mi padre William Humberto Parra Garrido, quien estuviera orgulloso de verme cumplir esta meta.

Gabriela Steffania Parra Rivadeneira

2 ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	II
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	III
AUTORÍA	IV
AGRADECIMIENTOS	VI
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DELITERATURA.....	3
2.1 MORFOLOGÍA DIGESTIVA DEL CUY	3
2.1.1. Boca	3
2.1.2. Esófago	4
2.1.3. Estómago.....	4
2.1.4. Intestino Delgado.....	4
2.1.5. Intestino Grueso.....	4
2.1.6. Ciego	5
2.1.7. Páncreas	5
2.1.8. Hígado.....	5
2.2 FISIOLOGÍA DIGESTIVA.....	6
2.2.1. Digestibilidad de los Alimentos.....	6
2.2.2. Papel de la Flora Intestinal en la Digestión y Absorción de Nutrientes	6
2.3 ENZIMAS.....	7
2.3.1. Naturaleza de las Enzimas	7

2.3.2.	Clasificación de las Enzimas	7
2.3.3.	Mecanismo de Acción de las Enzimas.....	8
2.3.4.	Especificidad de las Enzimas	9
2.3.5.	Factores que Afectan la Actividad de las Enzimas	9
2.3.6.	Principales Enzimas	10
2.4	LACTASA	10
2.4.1.	Función.....	11
2.4.2.	Modo de Acción	11
2.4.3.	Actividad Enzimática	13
2.5	PROTEÍNA SOLUBLE.....	13
2.5.1.	Solubilidad de las Proteínas.....	14
2.5.2.	Métodos para Determinación de Proteínas	14
2.6	TRABAJOS RELACIONADOS.....	15
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
3.1	UBICACIÓN	18
3.2	MUESTREO.....	18
3.3	DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO	19
3.4	ANÁLISIS QUÍMICO	20
3.4.1.	Extracción de Proteína por el Método de Lisis y Precipitación en Frío..	20
3.4.2.	Método Biuret.....	20
3.4.3.	Concentración de Proteína Soluble	21
3.4.4.	Actividad Enzimática	22
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN EL INTESTINO DELGADO	24

4.2	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS LACTASAS DEL INTESTINO DELGADO.....	26
5	DISCUSIÓN.....	28
5.1	CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN EL INTESTINO DELGADO	28
5.2	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS LACTASAS DEL INTESTINO DELGADO.....	28
6	CONCLUSIONES	30
7	RECOMENDACIONES	31
8	BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de proteína soluble de las muestras de intestino delgado en cuyes de 0 a 42 días de edad.....	24
Tabla 2. Actividad enzimática y específica de las muestras de intestino delgado en cuyes de 0 a 42 días de edad.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema digestivo del cuy.....	3
Figura 2. Ubicación topográfica de la Quinta Experimental Punzara.....	18
Figura 3. Curva estándar de proteína.....	21
Figura 4. Concentración de proteína soluble β -Galactosidasa.....	25
Figura 5. Actividad enzimática específica de β -Galactosidasa.....	27
Figura 6. Actividad enzimática de β -Galactosidasa.....	27
Figura 6. Limpieza y desinfección de las instalaciones.....	36
Figura 8. Ubicación de las jaulas e identificación de las crías.....	36
Figura 9. Corte y preparación de la muestra.....	37
Figura 10. Desarrollo del método extracción de proteínas.....	37
Figura 11. Aplicación del Método Biuret.....	37
Figura 12. Aplicación del Kit Enzimático B-galactosidasa.....	38
Figura 13. Elaboración de Resultados.....	38
Figura 14. Análisis estadísticos de actividad enzimática.....	40
Figura 15. Análisis estadísticos de concentración de proteína soluble.....	42

**"CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA LACTASA DEL
INTESTINO DELGADO EN CUYES DESDE EL
NACIMIENTO HASTA LAS 7 SEMANAS DE EDAD"**

RESUMEN

En la presente investigación se realizó el estudio de los cambios en la actividad de la lactasa del intestino delgado en cuyes (*Cavia porcellus*) desde el nacimiento hasta las 7 semanas de edad, para ello se utilizó la caseta adjunta al programa avícola de la Quinta Experimental Punzara de la Universidad Nacional de Loja ubicada a 2,160 msnm. Se realizó un estudio observacional como muestreo no probabilístico por conveniencia. Las unidades experimentales fueron representadas con un total de 21 animales, mismos que se seleccionaron al azar, los cuales se sacrificaron cada semana a los 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días de edad. El sacrificio se realizó por dislocación cervical y se procedió a desangrar, se extrajo las muestras de intestino delgado y se las colocó en frascos estériles debidamente identificadas para ser conservadas en congelación a -3°C . Para obtener el extracto de proteína se aplicó el método de lisis y precipitación en frío, mientras que para el análisis de concentración de proteína soluble se empleó el método Biuret y además se construyó la curva estándar mediante el uso de la proteína estándar conocida como Albumina Sérica Bovina. La actividad enzimática fue determinada mediante un kit comercial llamado (Sensolyte ONPG β -Galactosidase Assay Kit Colorimetric). La concentración de proteína soluble no presenta variaciones significativas en el intestino delgado de acuerdo a la edad del cuy (0 a 42 días). La actividad específica de β -Galactosidasa presenta valores significativos los primeros días de edad (12,06 mU/mg y 8,035 mU/mg), debido al consumo de leche, misma que contiene valores considerables de lactosa. Las lactasas poseen un aumento considerable de actividad los primeros días, y una disminución mientras el animal alcanza su madurez. Los cambios se deben principalmente al efecto del estrés dado por el destete y tipo de alimentación al que está sometido el animal, mientras se adapta a las nuevas dietas.

Palabras claves: actividad enzimática, proteína soluble, cuyes, lactasa, intestino delgado.

ABSTRACT

In the present investigation, the study of the changes in the activity of lactase of the small intestine in guinea pigs (*Cavia porcellus*) from birth to 7 weeks of age, was carried out, in the house attached to the poultry program of the Fifth Experimental Punzara of the Nacional University of Loja, located at 2,160 meters above sea level. An observational study was conducted as non-probabilistic sampling for convenience. The experimental units were represented with a total of 21 animals, the same ones that were randomly selected, which were sacrificed every week at 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days of age. The sacrifice was performed by cervical dislocation and proceeded to bleed, small intestine samples were removed and placed in sterile jars duly identified to be preserved in freezing at minus 3°C. To obtain the protein extract, the lysis and cold precipitation method was applied, while the Biuret method was used for the soluble protein concentration analysis and the standard curve was also constructed by using the standard protein known as Bovine Serum Albumine. Enzymatic activity was determined by a commercial kit called (Sensolyte ONPG β -Galactosidase Assay Kit Colorimetric). The soluble protein concentration does not show significant variations in the small intestine according to the age of the guinea pig (0 to 42 days). The specific activity of β -Galactosidase has significant values the first days of age (12.06 mU / mg and 8.035 mU / mg), due to milk consumption, which contains considerable values of lactose. Lactases have a considerable increase in activity the first days, and a decrease while the animal reaches maturity. The changes are mainly due to the effect of stress given by weaning and type of feeding to which the animal is subjected, while adapting to new diets.

Key words: enzymatic activity, soluble protein, guinea pigs, lactase, small intestine.

1. INTRODUCCIÓN

Según Jaramillo (2017) el cuy (*Cavia porcellus*) posee un estómago glandular simple, el cual sirve como reservorio de los alimentos, para controlar el paso al intestino delgado, y para iniciar la digestión enzimática principalmente de las proteínas, aunque el paso del alimento por este órgano es muy rápido. Considerando al cuy como un animal postgástrico, una característica biológica en el ciego contribuye a que los componentes no digeridos sean sometidos a un proceso de fermentación por parte de los microorganismos que se encuentran colonizando esta región.

Actualmente se ha comprobado que la mayor asimilación de nutrientes en el intestino delgado difiere por los niveles de enzimas encontrados en un determinado estadio del animal, lo que puede cambiar la composición del sustrato que llega al intestino grueso afectando el perfil de la microbiota que crece en este segmento (Hargaden y Singer, 2012).

Hargaden y Singer (2012) mencionan que el origen de las enzimas presentes en el intestino de estos animales sería bacteriano y epitelial. El intestino delgado de todo animal mamífero neonato, posee la capacidad de ser permeable a las proteínas del calostro. El estudio de la evolución de la funcionalidad de la mucosa intestinal es importante para comprender la capacidad de los animales (principalmente al destete) para digerir sustratos distintos de la leche. Durante el período de lactancia, las glándulas de la mucosa son capaces de producir enzimas para digerir los principales componentes de la leche (Carlos, 2014).

El estudio sobre actividad enzimática es muy difundido en aves y cerdos, posee menor desarrollo en rumiantes y existe poca información actualizada en conejos y cuyes (De Blas *et al.*, 2002). Por ello los resultados de este trabajo sirven para posteriores investigaciones, la importancia radica en conocer la funcionalidad de la mucosa intestinal para minimizar problemas digestivos y mejorar las estrategias de elaboración de dietas, de manera que sean adecuadas a cada etapa de crecimiento del cuy, garantizando así la producción y rentabilidad. Estas investigaciones son muy limitadas en dicha especie. Es por ello que en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Determinar los cambios en la concentración de proteínas solubles en el intestino delgado por gramo de intestino, en cuyes de 0 a 7 semanas de edad.

Analizar los cambios de la actividad específica de las lactasas del intestino delgado en cuyes de 0 a 7 semanas de edad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MORFOLOGÍA DIGESTIVA DEL CUY

Los autores Hargaden y Singer (2012) manifiestan que el cuy se clasifica como un fermentador postgástrico. Todo sistema digestivo (Figura 1) inicia con la cavidad oral y finaliza en el ano. Presenta un estómago donde se realiza la digestión enzimática y un ciego donde se efectúa la fermentación bacteriana. Contiene otros órganos que ayudan en la digestión que incluyen los dientes, glándulas salivales, páncreas, hígado y vesícula biliar. El tránsito intestinal post ingesta es rápido, no demora más de dos horas en llegar la mayor parte al ciego; sin embargo, el paso por este órgano es más lento pudiendo permanecer aproximadamente por 48 horas.

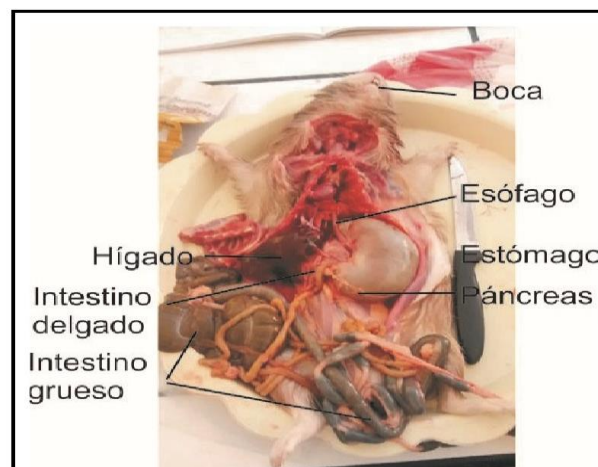


Figura 1. Sistema digestivo del cuy (Jorge, 2015).

2.1.1. Boca

Hargaden y Singer (2012) afirman que la boca limita lateralmente por las mejillas y las almohadillas bucales, que separan los incisivos de los dientes molares. Existen 4 pares de glándulas salivales que son la parótida, mandibular, sublingual y molar. Además, Quesenberry *et al.* (2012) indica que una característica particular de los roedores es que poseen dientes incisivos superiores de crecimiento continuo, piezas dentarias afiladas en bisel y muy resistentes. Las funciones son cortar y triturar la materia vegetal, esta masticación reduce el tamaño de las partículas, y al mezclarse con la saliva facilita la

acción de las enzimas digestivas sobre el contenido celular del bolo alimenticio, el cual pasa al estómago a través del esófago (Sakaguchi, 2003).

2.1.2. Esófago

Es un conducto que impulsa el alimento desde la faringe al estómago a través de las contracciones rítmicas que realizan las paredes musculares del esófago llamándolo a este proceso peristaltismo. Se ubica de forma oblicua en la región cardíaca en la menor curvatura del estómago (Harkness *et al.*, 2002).

2.1.3. Estómago

Los cobayos son monogástricos con estómagos completamente glandulares. Harkness *et al.* (2002) afirma que el estómago realiza la digestión de los alimentos, tanto de manera mecánica como enzimática en la porción aglandular y glandular respectivamente. Por lo tanto Carlos (2014) señala que el estómago glandular tiene una estructura histológica típica de un órgano membranoso. En el estómago el alimento es parcialmente procesado por la acción del ácido clorhídrico y las enzimas gástricas.

2.1.4. Intestino Delgado

Hargaden y Singer (2012) brevemente como ocurre la mayor parte de la digestión y absorción en esta sección. Como característica principal se absorbe la mayor parte de agua, vitaminas y otros micro-elementos. Entre sus funciones más principales tenemos que; recibe el jugo pancreático y secreta el jugo intestinal que poseen enzimas. Absorbe el alimento digerido y realiza una función peristáltica que fuerza al material no digerido a pasar hacia el ciego (Chauca, 2007).

2.1.5. Intestino Grueso

En esta sección pasan los alimentos no digeridos, el agua no absorbida y las secreciones de la parte final del intestino delgado, aquí no hay digestión enzimática y

por lo tanto es responsable de que se sinteticen grandes cantidades de vitaminas por parte de los microorganismos (Hargaden y Singer, 2012).

2.1.6. Ciego

Es el órgano más importante que constituye cerca del 15% del peso total (Chauca, 2007). Es aquí donde ocurren mayormente los procesos fermentativos del alimento y se clasifican las heces para la cecotrofia. Estructuralmente consta de tres partes: cuerpo, apéndice y saco redondo o válvula íleo-cecal. El alimento que ingresa en el ciego procedente del intestino delgado, es un sustrato nutritivo rico en celulosa, proteínas y otros elementos (Hargaden y Singer, 2012).

2.1.7. Páncreas

Harkness *et al.* (2002) manifiestan que el páncreas es una glándula mixta, con un peso aproximado de 15 gramos. Tiene dos funciones: la exócrina que se encarga de producir enzimas digestivas, agua y electrolitos; la endócrina que produce insulina, y juntas forman el jugo pancreático que une al conducto hepático para desembocar en el duodeno (Escallón, 2012).

2.1.8. Hígado

Está ubicado en la cavidad abdominal su color es rojo oscuro con un peso de 24 gramos, posee cinco lóbulos y presenta la vesícula biliar localizada en la cara posterior del hígado (Harkness *et al.*, 2002). Como función el hígado segrega bilis que alcanza el duodeno a través del conducto biliar, esta se acumula en la vesícula biliar hasta el momento en que es necesaria. Las sales biliares activan la lipasa pancreática y emulsionan las grasas (Hargaden y Singer, 2012).

2.2. FISIOLÓGÍA DIGESTIVA

La fisiología digestiva estudia los mecanismos que se encargan de transportar nutrientes orgánicos e inorgánicos del medio ambiente al medio interno, para luego ser dirigidos por el sistema circulatorio a cada una de las células del organismo (Budras *et al.*, 2007).

El cuy es un roedor herbívoro y monogástrico, además tiene dos tipos de digestión: una enzimática a nivel del estómago y otra microbiana a nivel de ciego. Por consiguiente, es clasificado por su anatomía gastrointestinal, como un animal de fermentación postgástrica, debido a los microorganismos que posee a nivel de ciego (De Blas *et al.*, 2002).

2.2.1. Digestibilidad de los Alimentos

Casado *et al.* (2005) puntualiza la digestibilidad como el porcentaje de un nutriente dado, que se digiere a su paso por el tubo gastrointestinal. Las pruebas de digestibilidad permiten calcular por diferencia el grado de desaparición de los nutrientes debido a la absorción, además de conocer el contenido de Nutrientes Digestibles Totales (NDT) (Rico y Rivas, 2003).

Franz *et al.* (2011) señala que la digestibilidad de un alimento está afectada por factores tales como la composición química y preparación de los alimentos, composición de la ración, factor animal y nivel de alimentación. La digestión de los alimentos refiere a su aprovechamiento para que sean incorporados al organismo para el mantenimiento, crecimiento, producción y buena salud.

2.2.2. Papel de la Flora Intestinal en la Digestión y Absorción de Nutrientes

Se conoce que la celulosa en la dieta retarda los movimientos del contenido intestinal permitiendo una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes, siendo en el ciego e intestino grueso donde se realiza la absorción de los ácidos grasos de cadenas cortas (Franz *et al.*, 2011). La absorción de los otros nutrientes se realiza en

el estómago e intestino delgado incluyendo los ácidos grasos de cadenas largas (De Blas *et al.*, 2002).

2.3. ENZIMAS

Las enzimas son biocatalizadores o proteínas capaces de acelerar reacciones bioquímicas específicas con un gasto mínimo de energía, puesto que velocidad y aceleración es físicamente distinto. Su concentración varía mucho con la especie y, dentro de la misma con el período de lactación (García, 2012).

2.3.1. Naturaleza de las Enzimas

García (2012) manifiesta que la mayor parte de las enzimas están formadas por proteínas complejas de alto peso molecular y otras por ARN. Ciertas proteínas requieren de cofactores para cumplir la función de catalizadoras.

2.3.2. Clasificación de las Enzimas

Según McDonald (2011) las enzimas se clasifican en 6 grupos de acuerdo a su mecanismo de acción. Se describen a continuación:

2.3.2.1. Clase 1: Oxidoreductasas

Catalizan reacciones redox, en las cuales cambia el estado de oxidación de uno o más átomos en la molécula. En este grupo se encuentran las siguientes enzimas: deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, catalasas, oxigenasas e hidroxilasas.

2.3.2.2. Clase 2: Transferasas

Constituyen un gran grupo de enzimas que catalizan la transferencia de grupos como acetilo, amino y fosfato, de unas moléculas a otras. En este grupo se incluyen las transaldolasas, glucocil, quinasas, fosfomutasas y lipasas.

2.3.2.3. Clase 3: Hidrolasas

Catalizan las escisiones hidrolíticas. Este grupo incluye esterasas, glicosidasas, amilasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas, ribonucleasas y lactasas.

2.3.2.4. Clase 4: Liasas

Catalizan degradaciones no hidrolíticas, que suponen la retirada de ciertos grupos como las reacciones de descarboxilación y desaminaciones. En este grupo se incluyen aldosas, hidratasas, deshidratasas, sintasas, liasas.

2.3.2.5. Clase 5: Isomerasas

Catalizan los cambios en la distribución intramolecular en los isómeros ópticos y de posición. Este grupo incluye las racemasas, isomerasas, mutasas.

2.3.2.6. Clase 6: Ligasas

Catalizan reacciones que se unen dos moléculas con la degradación de enlaces fosfato de alta energía como el ATP. Entre estas enzimas se encuentra la acetil-coenzima A sintetasa.

2.3.3. Mecanismo de Acción de las Enzimas

Las reacciones químicas aparecen mediante un estado de transición de alta energía, la cual es una etapa intermedia de la reacción en que las moléculas se distorsionan, estiran o poseen una capacidad electrónica desfavorable (McDonald, 2011).

2.3.4. Especificidad de las Enzimas

Esta característica tiende a ser absoluta cuando solo catalizan la reacción de un sustrato, y relativa cuando catalizan más de un grupo de sustratos. La especificidad de las enzimas se debe a la necesidad de uniones espaciales de los grupos activos del sustrato con los centros activos de la enzima. La interacción determina la distorsión de la enzima y el sustrato y como resultado se producen estructuras que permiten la conjugación completa de los dos y la formación del complejo (McDonald, 2011).

2.3.5. Factores que Afectan la Actividad de las Enzimas

McDonald (2011) describe los factores de la siguiente manera:

- Cantidad de sustrato: un aumento del mismo determina el incremento en la velocidad de la reacción. Se refiere a la óptima utilización de los centros activos enzimáticos disponibles.
- Cantidad de enzimas: un incremento de las mismas determina una elevación lineal en la velocidad de la reacción debido a la mayor existencia de centros activos para la formación de los complejos enzima-sustrato.
- Inhibidores: son de dos tipos, los reversibles interfieren en la existencia de enlaces no covalentes entre el inhibidor y la enzima. Y los irreversibles suponen la unión covalente en el centro activo siendo irreversible por un exceso del sustrato o por diálisis.
- Efectos alostéricos: las moléculas se unen a las enzimas pero no actúan del mismo modo que sus inhibidores enzimáticos competitivos o no competitivos.
- Factores ambientales: algunos que influyen son la temperatura (10°C, 50°C), acidez (pH 6 - 7), concentración salina. Los aumentos de estas características determinan la desnaturalización y pérdida de la actividad.

2.3.6. Principales Enzimas

Santín (2011) señala que las enzimas se caracterizan porque permiten que el organismo aproveche eficazmente los nutrientes de los alimentos que conforman la dieta. Estas enzimas son secretadas a lo largo del tubo digestivo.

2.3.6.1. Amilasa

Las amilasas tienen como sitio de acción los enlaces glicosídicos (α 1-4) y (α 1-6) del almidón. Durante la degradación del almidón, actúan diferentes enzimas como la (α -amilasa) que hidroliza los enlaces (α 1-4) de amilosa. La amilasa es una pequeña enzima secretada en su forma activa, actúa sobre los carbohidratos, específicamente hidroliza los enlaces glucosídicos de las cadenas de los polisacáridos de las sustancias amiláceas, produciendo oligosacáridos que luego serán hidrolizados por enzimas intestinales (maltosa, sacarosa y lactosa) (Pocock y Richards, 2005).

2.3.6.2. Lipasa

Escallón (2012) considera que las lipasas degradan las grasas de los alimentos de manera que puedan ser absorbidos. Catalizan la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos libres. Son de gran utilidad en la industria actual usadas en la fabricación de detergente, la industria de la leche y los quesos, panaderías para mejoramiento de sabores, industria de bebidas, producción de productos químicos de interés por medio de enlaces éster, polimerización e incluso se hacen investigaciones para la producción de biodiésel.

2.4. LACTASA

Montes *et al.* (2018) describe la lactasa como un tipo de (β -galactosidasa), producida por un grupo de levaduras y es generada en el intestino delgado que se sintetiza durante la infancia de todos los mamíferos. La lactasa se produce específicamente en el borde de cepillo de las células que recubren las vellosidades intestinales. En los mamíferos, con la edad se produce un descenso fisiológico de la

secreción de lactasa (Carabaño *et al.*, 2010). La lactasa (EC.3.2.1.108), rompe el enlace (β 1-4) de la lactosa, liberando δ -galatopiranososa y δ -glucopiranososa, por lo que, se le puede considerar como β - δ -galatohidrolasa.

2.4.1. Función

Rico y Rivas (2003) señala que su acción es imprescindible en el proceso de conversión de la lactosa, azúcar doble (disacárido), en sus componentes glucosa y galactosa. Estas enzimas están encargadas de digerir los carbohidratos dietarios (oligo- y disacáridos) y generar glucosa a partir de ello.

2.4.2. Modo de Acción

Montes *et al.* (2018) señala que el mecanismo de acción es de naturaleza transgalactosídica, se produce de la siguiente forma: primero se produce la hidrólisis en la molécula de lactosa, dando glucosa libre y complejo β -galactosidasa-galactosa. La enzima transfiere galactosil para un receptor, el cual contiene un grupo hidroxilo. Siendo el agua este receptor, la hidrólisis de una molécula de lactosa producirá una de glucosa libre y una de galactosa libre. Siendo otra molécula de lactosa la receptora, se formará un trisacárido, el cual actuará como otro receptor, formando tetrasacáridos. García (2012) afirma que la formación de oligosacáridos es más acentuada en mayores concentraciones de lactosa, y la capacidad de actuación de la lactasa dependerá de la conexión formada. La hidrólisis de la lactosa provoca modificaciones en las características físicas y químicas:

- Poder edulcorante: la mezcla de glucosa y galactosa es de 2 a 3 veces más dulce que la lactosa.
- Digestibilidad: la mayoría de los individuos no consigue digerir la lactosa. En cambio, la glucosa y la galactosa se digieren más fácilmente.
- Solubilidad: la lactosa presenta una solubilidad del 18% en agua, a 25°C. En las mismas condiciones, la glucosa presenta una solubilidad del 50% y la galactosa, del 25%.

- Viscosidad: la glucosa y la galactosa presentan una viscosidad baja, lo cual permite una alta concentración de sólidos sin que se produzca cristalización.
- Cuerpo, textura y sabor: se modifican debido a la liberación de galactosa, el sabor suele quedar más acentuado.
- Reacción de Maillard: la glucosa y la galactosa son más reactivas que la lactosa a temperaturas elevadas y pH superiores a 5,0 en relación a las proteínas, de 2,5 a 5,0 más (García, 2012).

2.4.2.1. Cambios en la Morfología y Función del Sistema Digestivo Relacionados con la Edad.

Carabaño *et al.* (2010) manifiesta que en los lactantes la actividad de la lactasa a nivel estomacal es especialmente alta. La capacidad de digerir y asimilar la grasa es muy limitada y puede producir graves trastornos digestivos. Esta situación cambia con el tiempo, a medida que el animal crece y empieza a consumir alimentos sólidos. Sin embargo, Carlos (2014) indica que el desconocimiento del comportamiento de los recién nacidos durante la lactación no permitía encontrar alternativas de solución a las limitantes existentes en esta etapa productiva. Experimentando diferentes alternativas se ha podido lograr resultados que permitieron disminuir la mortalidad.

Hiyagon (2014) señala en un estudio que el cuy nace en un estado avanzado de maduración por lo que se amamanta por un corto tiempo en comparación a otras especies y prácticamente toma alimentos (pasto y concentrado) preparando al ciego para su función digestiva de adulto. Los 3ros días el animal simplemente prueba el alimento y no existe una ingestión real del mismo, en estos días el cuy se alimenta exclusivamente de leche. A partir del 4to día el porcentaje de consumo de materia seca sobre el peso vivo empieza a ser relevante. A medida que el lactante incrementa su consumo, comienza a depender menos de la leche materna y probablemente disminuya su consumo. Desde el 10mo día el animal estabiliza su consumo en relación a su peso vivo. Se estabiliza hasta el final de la lactación (Carlos, 2014).

2.4.3. Actividad Enzimática

Varias enzimas han sido desarrolladas para aumentar la digestibilidad de la dieta, la disponibilidad de energía, proteínas y ácidos grasos. Dichas enzimas son propiamente orientadas a mejorar la eficiencia de la utilización de monogástricos, principalmente cerdos y aves (Santín, 2011). En cerdos y otras especies, el calostro acelera la proliferación de enterocitos, incrementa el transporte de electrolitos y nutrientes y favorece el desarrollo intestinal (Manners y Stevens, 1972). Con ello, se incrementa el nivel de disacaridasas en la superficie de los enterocitos. La lactasa es la enzima mayormente estimulada debido a la presencia de lactosa en calostro y leche. Las disacaridasas presentan una distribución heterogénea a lo largo del intestino delgado. Los mayores niveles enzimáticos se concentraron en duodeno y yeyuno proximal, indicando ser el sitio principal de la digestión de carbohidratos y absorción de glucosa. En tanto que la actividad enzimática de las disacaridasas en las porciones distales del intestino delgado carecen de importancia (Carabaño *et al.*, 2010). Según Debray *et al.* (2003) las actividades enzimáticas se expresan como actividad específica (IU/mg de proteína), actividad total (IU) y actividad relativa (IU/kg de tejido).

2.5. PROTEÍNA SOLUBLE

Partiendo del concepto básico, las proteínas son el grupo cuantitativamente más importante de macromoléculas corporales y a su vez están formadas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El metabolismo de las proteínas abarca dos grandes áreas: a) la producción y la degradación de las proteínas mismas y b) la síntesis y la degradación de sus componentes básicos (Koolman, J., y Rohm, 2012).

Kollman, J., y Rohm (2012) menciona que las proteínas solubles son más complejas que las fibrilares (proteínas estructurales insolubles). La forma de las proteínas solubles es más o menos esférica (globular). Las proteínas globulares tienen en su forma biológicamente activa una estructura espacial definida (la denominada conformación nativa). Si se destruye esta conformación por desnaturalización desaparecerá no sólo el efecto biológico sino también la proteína se tornará insoluble.

2.5.1. Solubilidad de las Proteínas

Teijón *et al.* (2009) manifiesta que la solubilidad de una proteína está influenciada por los siguientes factores:

- Su composición en aminoácidos: una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos.
- Su estructura tridimensional: las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares.
- El entorno de la propia proteína; En este último, podemos decir que los principales factores ambientales que influyen en la solubilidad de una proteína son los siguientes: (1) la temperatura; (2) la constante dieléctrica del medio; (3) el pH del mismo; y (4) la fuerza iónica.

2.5.2. Métodos para Determinación de Proteínas

Los métodos para la determinación de proteínas totales están basados en sus características diferenciales con relación al resto de biomoléculas presentes en las muestras biológicas, hay métodos que tienen su acción en la determinación de la cantidad de nitrógeno presente (método de Kjeldahl), en la presencia del enlace peptídico (métodos del Biuret, de Lowry y de BCA-ácido bicinconínico) y en la formación de complejos con determinados agentes (método de Bradford). En ciertos casos es preciso que las proteínas reaccionen con algún reactivo que les permita adquirir una característica que pueda medirse (como el color), ya que, aunque la presencia de los residuos de tirosina y triptófano provoca que las proteínas absorban luz a una longitud de onda de 280nm, esta absorción es demasiado baja e inespecífica para poder ser utilizada por sí misma en la cuantificación de las proteínas (Roca *et al.*, 2004).

Según Roca *et al.* (2004), los primeros factores a considerar, para seleccionar un método de análisis, son la naturaleza de la muestra y la presencia de sustancias que puedan interferir; por ello, a veces es necesario una etapa previa de purificación para eliminar las sustancias que interfieren, existen varias posibilidades: se pueden precipitar las proteínas solubles, lavarlas y cuantificarlas después por un método

adecuado, si la precipitación se realiza con sales o alcohol, el precipitado proteico puede redisolverse en una base, para después utilizarse un método para la determinación de proteínas totales como el del Biuret. Según Gálvez *et al.* (2012) el índice de la solubilidad de proteínas (PSI) de aislados proteínicos comerciales varían de 25 a 80%.

2.6. TRABAJOS RELACIONADOS

Diseño de piensos para alimentación de gazapos destetados precozmente.

Gutiérrez (2001), diseñó un pienso específico para gazapos jóvenes que permita la práctica de un destete precoz (a 25 días de edad) con suficientes garantías de viabilidad técnica. Se estudió la situación digestiva de animales lactantes y de animales destetados precozmente. La sustitución de almidón por lactosa disminuyó linealmente ($P < \$0,001$). Al destetar a los animales, disminuyó la actividad de la lactasa, en un 72%. Paralelamente se produjo una reducción de la longitud de las vellosidades de un 19%.

Distribución de la actividad de las enzimas hidrolíticas en el tracto digestivo de conejos.

Marounek *et al.* (1995), en su estudio midió las actividades de doce enzimas hidrolíticas en el tracto digestivo de conejos jóvenes antes del destete (4 semanas) y conejos adultos (3 meses). Las actividades específicas de lactasa son más alta en conejos de 4 semanas que en conejos de 3 meses. El contenido cecal de conejos adultos contenía la mayor parte de la actividad total de lactasa, β -glucosidasa y ureasa presentes en el tracto digestivo.

Cambios desde el nacimiento hasta la madurez en el patrón de distribución de la actividad de lactasa y sacarasa en la mucosa del intestino delgado de los cerdos.

Manners y Stevens (1972), determinó los cambios en la actividad de lactasa y sacarasa en homogenizados de mucosa del intestino delgado, para ello se emplearon 62 cerdos que varían en edad desde recién nacidos hasta la madurez. De cada cerdo, se tomaron muestras a 5, 20, 40, 60, 80 y 95% de la longitud del intestino delgado

medido desde el píloro. La actividad de la lactasa estuvo presente en niveles altos en el cerdo recién nacido, encontrándose el máximo en el sitio del 20%. Entre el nacimiento y las 8 semanas de edad hubo una caída en la cantidad de actividad en la mucosa del intestino delgado. En los cerdos más viejos, los niveles de actividad de la lactasa en la mucosa no fueron muy diferentes de los encontrados en los cerdos de 8 semanas de edad, aunque la distribución a lo largo del intestino delgado tendió a cambiar con la edad avanzada.

Cambios en la actividad de la lactasa intestinal en el intestino delgado de dos razas de cerdos desde el nacimiento hasta las 6 semanas de edad.

Ekstrom *et al.* (1975), estableció las actividades de lactasa totales y específicas en el intestino delgado de Chester White y Hampshire a los 1, 8, 15, 22, 29 y 43 días de edad. En ambas razas, la actividad total de lactasa al 1 día de edad fue menor que la de cualquier otra edad. Después de alcanzar los niveles máximos a los 15 días de edad, la actividad total disminuyó. A los 1 y 8 días de edad, las actividades totales de lactasa para las dos razas fueron similares. El patrón de cambios en la actividad específica con la edad fue similar para ambas razas. La actividad específica media fue más alta a los 1 y 8 días de edad y luego cayó progresivamente a niveles mínimos a los 43 días de edad. En Chester White se tuvo actividades específicas más altas que Hampshire durante las primeras 4 semanas de vida, pero a las 6 semanas de edad hubo poca diferencia entre las razas. La actividad pico de lactasa expresada como actividad total o específica ocurrió en un tercio proximal del intestino delgado de ambas razas, y el tercio distal del intestino tenía actividades relativamente bajas a medida que los animales maduraban.

Estimaciones Cuantitativas de Lactasa en Diferentes Mamíferos.

La lactasa se estimó en el intestino de ratas y cobayas (diferentes edades), cerdos (8 semanas de edad), en perros, conejillos de indias y gatos lactantes. La actividad fue alta en ratas y cerdos lactantes, relativamente baja en conejillos de indias lactantes, y cayó rápidamente después del destete. Perros y gatos dieron resultados similares. Cuando las ratas y las cobayas continuaron teniendo lactosa en su dieta después del tiempo de destete normal, no hubo más lactasa en el intestino que en los controles con almidón (Groot y Hoogendroorn, 1957).

Distribución de enzimas hidrolíticas en intestinos de perros, cobayas, ardillas, ratas albinas e conejos.

En el perro, las concentraciones de enzimas por g de mucosa intestinal fueron claramente iguales en todo el duodeno y el yeyuno superior e inferior para la β -galactosidasa. En la ardilla las actividades enzimáticas por g de mucosa intestinal variaron considerablemente. La β -galactosidasa estaba más alta en el duodeno y menos en el íleon. En el resto de animales no hubo mayor relevancia (Malhotra y Philip, 1965).

Sistema Digestivo en Conejos.

En conejos la actividad de la lactasa es máxima hasta los 25 días de edad. Los principales cambios relacionados con la edad parecen estar asociados con el cambio de la leche a los alimentos sólidos. El efecto de la edad al destete (de 21 a 35 días) tiene poca influencia sobre la morfología y la actividad enzimática en el tracto superior (estómago e intestino delgado). Por otro lado, algunos autores han observado atrofia vellositaria acompañada de una reducción de las enzimas del borde en cepillo en conejos de 35 días destetados a los 25 días comparados con conejos lactantes de la misma edad. Sin embargo, estos problemas parecen depender de la composición de la dieta de destete (Carabaño *et al.*, 2010).

Restricciones a la formulación de piensos para minimizar la patología digestiva en conejos.

Gutiérrez *et al.*, (2002), menciona que conejos destetados a los 35d presentan una disminución significativa de la altura de las vellosidades intestinales y como consecuencia una reducción de las lactasas que se producen en la propia mucosa intestinal con respecto a los animales lactantes de la misma edad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en la Quinta Experimental Punzara (Figura 2) de la Universidad Nacional de Loja, situada al sur – oeste de la Hoya de Loja, en el sector “La Argelia”. Cuenta con las siguientes características meteorológicas:

- Altitud: 2,160 msnm.
- Temperatura: oscila de 12 a 18°C con un promedio de 15,5°C.
- Precipitaciones: 759,7 mm anuales.
- Formación Ecológica: Bosque seco- Montañoso bajo.



Figura 2: Ubicación topográfica de la Quinta Experimental Punzara (Google Maps, 2007.)

3.2. MUESTREO

Se realizó un estudio observacional como muestreo no probabilístico por conveniencia, donde se tomó como tamaño muestral 21 crías del total de las madres gestantes, seleccionadas al azar cada semana, desde el día 0 hasta los 42 días de edad.

3.3. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

La investigación en primera instancia se efectuó en la caseta adjunta al programa avícola de la Quinta Experimental Punzara de la Universidad Nacional de Loja. Se adecuo 2 jaulas provistas de un bebedero y dos comederos, las mismas que fueron construidas de manera que faciliten la limpieza con las siguientes dimensiones:

- Largo: 1,50m.
- Ancho: 1m.
- Altura: 0,60m.

La limpieza y desinfección del lugar se realizó unos 15 días antes de colocar las jaulas y los animales. Se barrió, baldeó y colocó una mezcla de cal con formol en todos los espacios. Los animales se alimentaban con balanceado 100% comercial (proteína bruta 18%, grasa 5%, fibra cruda 6%) y fueron destetados a los 15 días de edad) y agua ad libitum. Para el desarrollo de este trabajo se adquirió 22 hembras gestantes y se las alimentaba hasta el día de su parición. Además, se realizó el destete a los 14 días.

Una vez obtenidos los gazapos, se los procedió a sacrificar específicamente a las 11:30 am de acuerdo a la edad requerida (0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días), mediante dislocación cervical y se los desangró en cumplimiento de las directrices españolas para el cuidado y uso de animales en investigación y la normativa de la OIE vigente (BOE, 2013). Se extrajo 3cm de intestino delgado y se lo coloco en frascos estériles debidamente etiquetados, se guardaron y congelaron las muestras a -3°C para el posterior análisis sobre actividad enzimática de lactasas por medio de un kit comercial (Sensolyte ONPG β -Galactosidase Assay Kit Colorimetric) y la concentración de proteína soluble mediante del método Biuret.

3.4. ANÁLISIS QUÍMICO

3.4.1. Extracción de Proteína por el Método de Lisis y Precipitación en Frío.

Se descongeló y pesó las muestras de intestino delgado y se las colocó sobre el mortero que se encontraba sobre hielo a -4°C . Se agregó $1400\ \mu\text{l}$ de PBS para cada muestra como valor mínimo y máximo $1600\ \mu\text{l}$, esto para homogenizar con el vástago hasta disgregar el tejido totalmente. Con una micropipeta se tomó el extracto líquido evitando aspirar los trozos menos disgregados del tejido y se los colocó en tubos eppendorf previamente rotulados. Luego se procedió a centrifugar durante 30 min y a $13\ 000\ \text{rpm}$. Los sobrenadantes obtenidos se los pasó a un nuevo tubo con el mismo rótulo y se descartó el pellet. Conservar las muestra a -85°C .

3.4.2. Método Biuret

El nombre del método se debe al compuesto biuret, que forma complejos de coloración azul con el Cu^{+} . La reacción es de tipo general y se produce con proteínas que presentan al menos dos enlaces peptídicos o dos grupos amida consecutivos, estos grupos son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^{+} , igual que hacen las moléculas de biuret formando del Cu^{+} un complejo con las proteínas en medio alcalino, que produce una coloración azul con máximos de absorción de radiación electromagnética a $330\ \text{nm}$ y a $545\ \text{nm}$ (Roca *et al.*, 2004).

Para la fórmula del reactivo Biuret se pesó los siguientes reactivos:

- $2,25\ \text{g}$ de Tartrato de sodio y potasio (Mm $282,22$).
- $0,75\ \text{g}$ de Sulfato cúprico $\times 5\text{H}_2\text{O}$ (Mm $249,68$).
- $1,25\ \text{g}$ de Yoduro de potasio (Mm $166,0$).

La preparación se colocó en $100\ \text{ml}$ de $\text{NaOH}\ 0,2\ \text{M}$ y se llevó a un volumen de $250\ \text{ml}$ con agua destilada, se reservó en un lugar oscuro.

3.4.3. Concentración de Proteína Soluble

Se pesó 2,6041 de Suero de albúmina bovina (SBA) y se vertió en un matraz de aforo y se añadió agua destilada hasta completar los 25 ml. La mezcla se diluyó totalmente con ayuda del vortex. Etiquetamos tres tubos ependorf como blancos, 16 estándar y 14 de las muestras de intestino delgado. Para obtener la curva de proteína estándar (Figura 3) se pipeteó en tubos ependorf concentraciones de: 40 mg/ml (800 μ l); 30 mg/ml (600 μ l); 20 mg/ml (400 μ l); 18 mg/ml (360 μ l); 16 mg/ml (320 μ l); 14 mg/ml (280 μ l); 12mg/ml (240 μ l); 10 mg/ml (200 μ l); 8 mg/ml (160 μ l); 6mg/ml (120 μ l); 5 mg/ml (100 μ l); 4 mg/ml (80 μ l); 3 mg/ml (60 μ l); 2 mg/ml (40 μ l); 1 mg/ml (20 μ l) y 0,8 mg/ml (16 μ l).

Luego se añadió agua destilada en cada tubo ependorf hasta completar los 2 ml. Se realizó una relación (9:1) entre el reactivo biuret 900 μ l y la solución estándar 100 μ l para colocar en tubos ependorf y mezclar con ayuda del vortex. Se descongeló todas las muestras y se realizó el mismo procedimiento para los blancos de proteína estándar y las muestras, se mezcló en el vortex y se los paso a nuevos tubos ependorf. Se llevó las muestras previamente identificadas durante 25 min a baño María a 37°C y luego se las trasladó en una placa de 96 pocillos para su posterior lectura en el espectrofotómetro. Se esperó 3 min para que se realice la lectura de absorbancia a 490 nm.

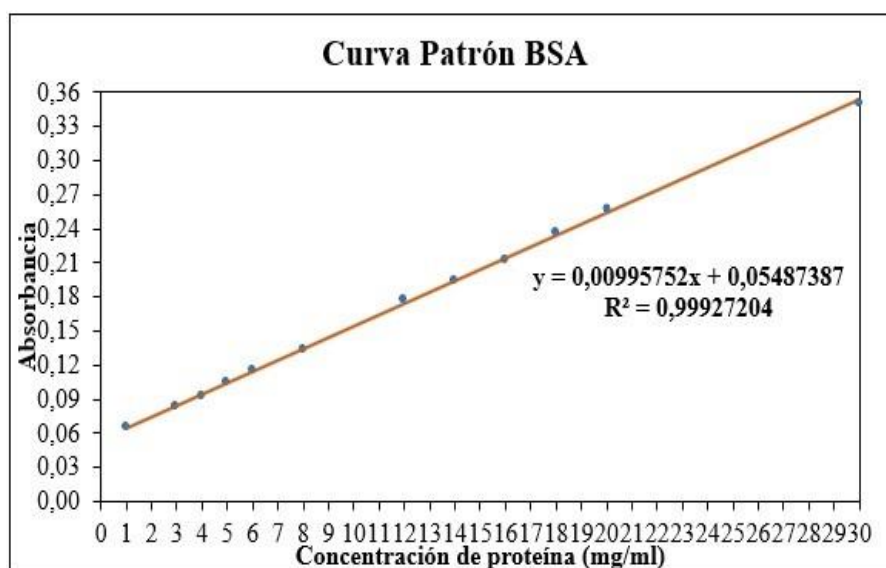


Figura 3: Curva estándar de proteína (Autora, 2019).

3.4.4. Actividad Enzimática

Se descongelaron y pesaron las muestras de intestino delgado, se realizó 3 lavados/muestra con 500 μl de PBS para cada repetición. Luego se aspiró el medio de cultivo de las células y se las colocó en cada pocillo de la microplaca. A la misma se agregó 50 μl de tampón de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la lisis celular.

Se elaboró la solución de sustrato diluyendo 1ml de DTT en 9 ml de solución de sustrato ONPG.

Se diluyo 4 μl de β -Galactosidasa en 396 μl de tampón de lisis para la solución madre. Luego se realizó diluciones en serie para obtener concentraciones de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ng/mg, se incluyó un control en blanco de 200 μl .

Se aspiró 10 μl del extracto celular que contiene β -Galactosidasa y se colocó en otra microplaca, a la misma se añadió 10 μl de cada dilución en serie obteniendo cantidades finales de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156 y 0 ng/pocillo. Sumado a ello se colocó 90 μl de solución sustrato/pocillo. Se agitó suavemente la placa durante 3seg. Se incubo en baño María por 30 min a 37°C, luego se realizó la lectura de absorbancia a 405 nm.

Para el cálculo de la actividad enzimática se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de } \beta - \text{Galactosidasa} = \frac{\text{B} * \text{Factor de dilución}}{(T_1 - T_0) * V}$$

Dónde:

- B= es la cantidad de β -Galactosidasa de la curva estándar (nmol).
- T= es el tiempo entre T_1 y T_0 (min).
- V= es el volumen de muestra pre tratada agregado al pocillo de reacción (en ml).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto para actividad enzimática como concentración de proteína se realizó una tabla descriptiva donde los datos se presentan en medias más/menos el error estándar para cada tiempo. Luego estos datos se modelizaron usando el modelo de regresión lineal simple en donde se grafican los datos obtenidos utilizando un gráfico de dos ejes, en el cual el eje de las “X” se considerara el tiempo y en el eje de las “Y” la actividad enzimática. El programa estadístico utilizado fue el SAS. Se utilizó un modelo de auto-regresión de orden 1 “PROC CORR del SAS”.

4. RESULTADOS

4.1. CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN EL INTESTINO DELGADO

Los cambios de proteínas solubles en el intestino delgado en cuyes desde el nacimiento hasta las 7 semanas de edad se detallan en la (Tabla 1) y en la (Figura 4).

Tabla 1: Concentraciones de proteína soluble de las muestras de intestino delgado en cuyes de 0 a 42 días de edad.

Días de edad	Concentración de proteína soluble (mg de proteína/ml de muestra)
0	21,03
7	13,24
14	12,99
21	10,63
28	9,81
35	11,47
42	11,01
P valor	0,368
EEM	3,48

EEM=error medio estándar

La concentración de proteínas solubles en el intestino delgado no presenta diferencias significativas (P 0,3676) en relación a la edad del animal (0 a 42 días), obteniendo un promedio de 12,88 (mg de proteína/ml de muestra) de concentración de proteína.

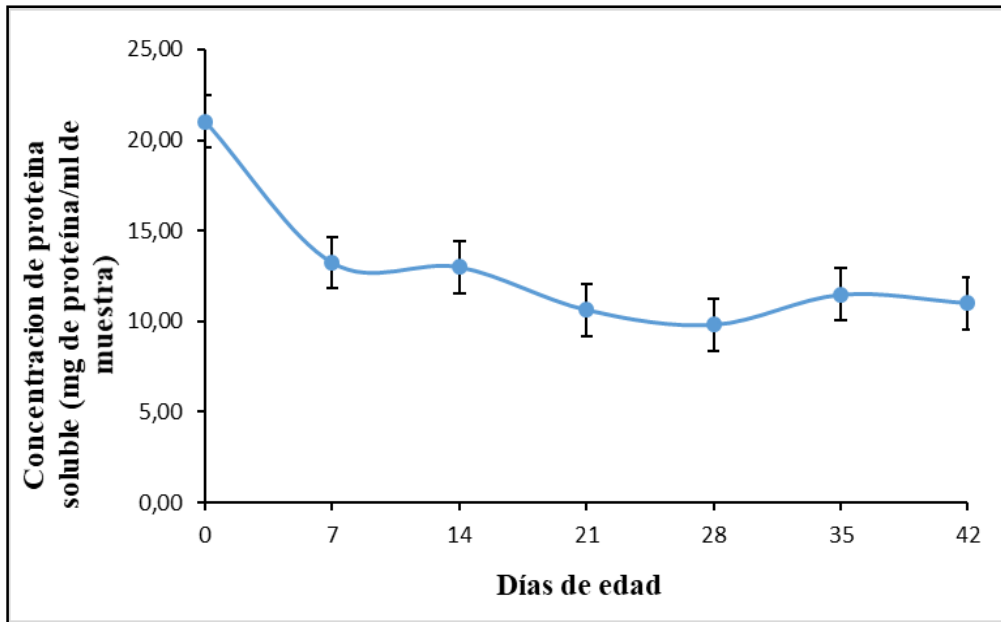


Figura 4: Concentración de proteína soluble de β -Galactosidasa

4.2. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS LACTASAS DEL INTESTINO DELGADO.

Los cambios de actividad enzimática y específica en el intestino delgado en cuyes desde el nacimiento hasta las 7 semanas de edad se detallan en la (Tabla 2) y en la (Figura 5 y 6).

Tabla 2: Concentraciones de actividad enzimática y específica de las muestras de intestino delgado en cuyes de 0 a 42 días de edad.

Días de edad	Actividad enzimática de β -galactosidasa (mU/ml)	Actividad específica de β -galactosidasa (mU/mg de proteína)
0	270,2 ^a	12,06 ^a
7	142,0 ^a	8,035 ^a
14	39,62 ^b	4,677 ^b
21	-1,492 ^b	0,024 ^b
28	8,898 ^b	0,781 ^b
35	12,43 ^b	0,819 ^b
42	18,33 ^b	1,450 ^b
P valor	0,021	< 0,002
EEM	43,1232	1,2460

*EEM=error medio estándar

Los cambios en la actividad específica demuestran que en el día 0 (12,06 mU/mg) y 7 (8,035 mU/mg) hay un pico alto de actividad comparado con los últimos días en donde disminuye notablemente desde el día 21 (0,024 mU/mg) al 35 (0,819m mU/mg). Al día 42 se estabiliza (1,450 mU/mg).

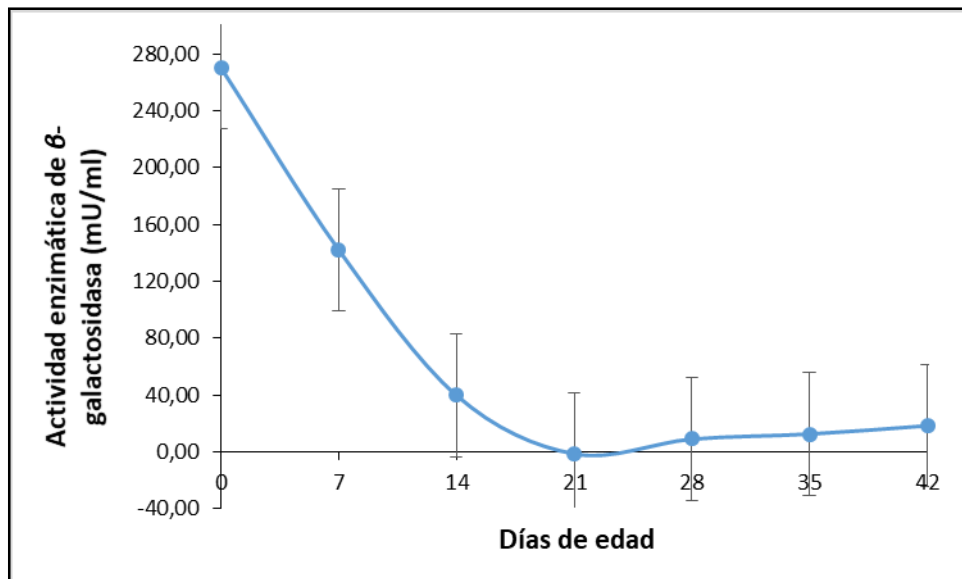


Figura 5: Actividad enzimática de β -Galactosidasa.

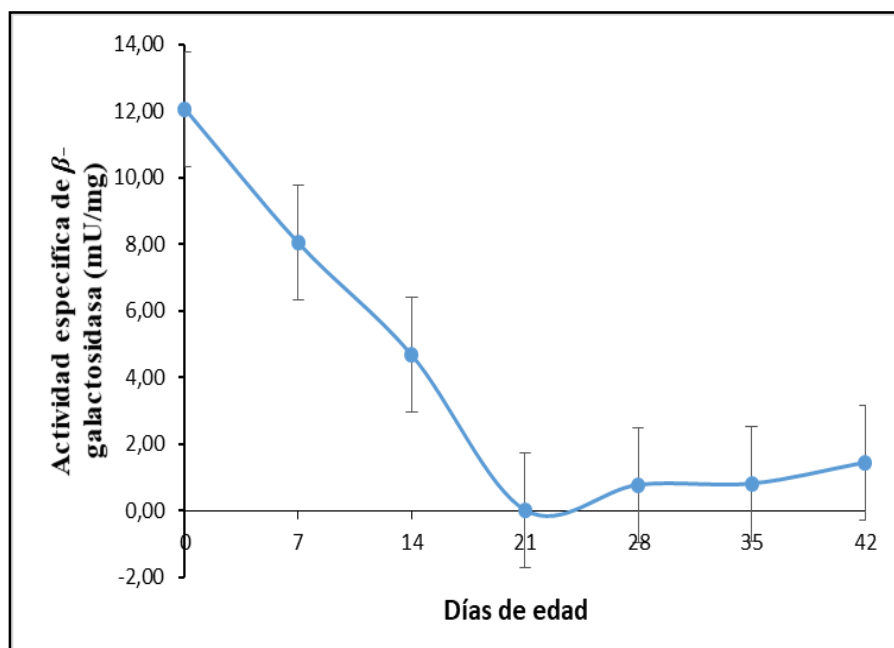


Figura 6: Actividad específica de β -Galactosidasa.

5. DISCUSIÓN

5.1. CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN EL INTESTINO DELGADO

Gutiérrez (2001) evaluó la actividad enzimática al destetar precozmente a los conejos de 35d dando como resultado la disminución de lactasa en un 72%. Lo que concuerda puesto que se obtuvo una ligera disminución de 9,81 (mg de proteína/ml de muestra) al día 28 postdestete.

Los resultados de Manners y Stevens (1972) indican que la actividad de lactasa estuvo presente en la sección del 20% de intestino (duodeno) en cerdos recién nacidos, aunque la distribución a lo largo del intestino delgado tendió a cambiar con la edad avanzada, datos relacionados con los obtenidos en la presente investigación. Lo mismo menciona Groot y Hoogendroorn (1957) en estudios realizados en ratas y cerdos lactantes, perros, gatos y conejillos de india. Los principales cambios relacionados con la edad parecen estar asociados con el cambio de la leche a los alimentos sólidos en la alimentación patrón y el destete. Además existen otras características que les puede atribuir tales como el factor ambiental, nivel de estrés y destrucción de las criptas intestinales (Carabaño *et al.*, 2010).

Malhotra y Philip (1965) demuestran que en el perro las concentraciones de β -galactosidasa por g de mucosa intestinal fueron constantes en el duodeno; mientras que en la ardilla variaron considerablemente. Resultados similares a esta investigación demuestran que las concentraciones no tuvieron variaciones con respecto a la edad, pero se mantienen constantes los últimos días.

5.2. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS LACTASAS DEL INTESTINO DELGADO

En cuyes la actividad de lactasa es máxima hasta los 7 días de edad, resultado que es inferior al descrito por Carabaño (2010) en conejos en donde la actividad de la lactasa es máxima los 25 días de edad.

En un estudio sobre cerdos Ekstrom *et al.* (1975) obtuvo niveles máximos que alcanzaron a los 15 días de edad y a partir de éste último empieza a decaer progresivamente hasta el día 43. Resultados que son compatibles con los obtenidos en la presente investigación ya que se evidenció actividades mayores en los días 0 y 7 de edad. A partir del día 14 disminuye notablemente manteniéndose constante hasta el día 42.

Marounek *et al.* (1995) señaló que las actividades específicas de lactasa eran más altas en conejos de 4 semanas que en conejos de 3 meses. Sin embargo en este trabajo los valores más altos se registraron las 2 primeras semanas.

Gutiérrez *et al.*, (2002), menciona que conejos destetados a los 35d presentan una disminución significativa de la altura de las vellosidades intestinales y como consecuencia una reducción de las lactasas que se producen en la propia mucosa intestinal con respecto a los animales lactantes de la misma edad. Estos resultados concuerdan de manera positiva con lo descrito por Anderson y Chavis (1986), puesto que la lactosa dentro de su composición indica altos niveles el día 1 (5,84%) y concentraciones reducidas totalmente el día 21 (0,50%).

6. CONCLUSIONES

La concentración de proteína soluble no presenta variaciones significativas en el intestino delgado de acuerdo a la edad del cuy (0 a 42 días).

La actividad específica de β -Galactosidasa presenta valores significativos los primeros días de edad (12,06 mU/mg y 8,035 mU/mg), debido al consumo de leche, misma que contiene valores considerables de lactosa.

Las lactasas poseen un aumento considerable de actividad los primeros días, y una disminución mientras el animal alcanza su madurez. Los cambios se deben principalmente al efecto del estrés dado por el destete y tipo de alimentación al que está sometido el animal, mientras se adapta a las nuevas dietas.

7. RECOMENDACIONES

Disminuir el nivel de estrés de los animales en estudio para obtener óptimos resultados mediante la mejora de la técnica de manejo, esto incluye el cambio adecuado de dieta alimentaria y la estadía de los mismos.

Realizar más investigaciones relacionados con el presente tema para afianzar las bases necesarias que permitan aportar datos reales y pertinentes, puesto que en esta especie es limitado el estudio.

Conservar las muestras a una temperatura óptima según el método empleado y elegir un buffer (tampón) adecuado para la solubilidad de las proteínas.

La actividad de lactasas es máxima los primeros días, porque los gazapos toman leche directa de la madre y al realizar el destete a los 14 días de edad la actividad decrece por el efecto de cambio de alimentación.

No es conveniente usar sustitos de leche en dietas para cobayos en crecimiento, puesto que la capacidad para digerir la lactosa es nula.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, R. R., & Chavis, D. D. (1986). Changes in macroingredients of guinea pig milk through lactation. *Journal of dairy science*, 69(9), 2268-2277.
- BOE. (2013). Legislación consolidada-Ley Orgánica para la mejora de la calidad educativa. *Organización, Instituto*, 1–64.
- Budras, K., McCarthy, P., y Horowitz, A. (2007). Pelvic diaphragm, ischioanal fossa; associated arteries, veins and nerves in: Budras kd, editor. *anatomy of the dog*. hannover. Germany: Schlutersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG.
- Carabaño, R., Piquer, J., Menoyo, D., Badiola, I., y cols. (2010). The digestive system of the rabbit. *Nutrition of the Rabbit*, 1–18.
- Carlos, J. (2014). “Estudio morfométrico del cobayo lactante.pdf. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Casado, C., Biglia, S., Moya, V., y Cervera, C. (2005). Efecto del tipo y nivel de oxidación de la grasa empleada en el pienso sobre su digestibilidad en conejos de cebo. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia., 115–121.
- Chauca, L. F. (2007). Realidad Y Perspectiva De La Crianza De Cuyes En Los Países Andinos. Instituto Nacional de Investigación Agraria–InIA, 15, 15.
- De Blas, C., García, J., Gómez-Conde, J., y Carabaño, R. (2002). Restricciones a la formulación de piensos para minimizar la patología digestiva en conejos. *Fedna* (2000), 73–93.
- Debray, L., Le Huerou-Luron, I., Gidenne, T., y Fortun-Lamothe, L. (2003). Digestive tract development in rabbit according to the dietary energetic source: correlation between whole tract digestion, pancreatic and intestinal enzymatic activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(3), 443-455.

- Ekstrom, E., K., Benevenga, J., N., y Grummer, R. H. (1975). Changes in the Intestinal Lactase Activity in the Small Intestine of Two Breeds of Swine from Birth to 6 Weeks of Age. *The Journal of Nutrition*, 105(8), 1032–1038.
- Escallón, A. (2012). Insuficiencia pancreática exocrina en caninos domésticos de Bogotá.
- Franz, R., Kreuzer, Michael, H., Hatt, J., Jean-Michel, Clauss, y Marcus. (2011). Intake, selection, digesta retention, digestion and gut fill of two coprophageous species, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*), on a hay-only diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(5), 564– 570. doi: 10.1111/j.1439-0396.2010.01084.x
- Gálvez, A., Flores, I., y Farrés, A. (2012). Capítulo 3: Concentración de Proteínas. En *Química de los alimentos* (5ta ed., p. 743). México: booksmedicos.org.
- García, V. (2012). Caracterización de la actividad de las enzimas hidrolíticas localizadas en la región cecal de cuyes (*Cavia porcellus*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2–72.
- Groot, A. P., y Hoogendoorn, P. (1957). The harmful effects of lactose. 2. Quantitative estimation of lactase in different mammals. *Voeding*, 18, 2-14.
- Gutiérrez, I. (2001). Diseño de piensos para alimentación de gazapos destetados precozmente (Tesis Doctoral no publicada). Agrónomos.
- Gutiérrez, I., Espinosa, A., García, J., Carabaño, R. Y De Blas, J.C. (2002a) *J. Anim. Sci.* 80: 1029-1037.
- Hargaden, M., y Singer, L. (2012). *Anatomy, Physiology, and Behavior.* , 575–602. doi: 10.1016/B978-01-2-380920-9.00020-1
- Harkness, J. E., Murray, K. A., y Wagner, J. E. (2002). Biology and diseases of guinea pigs. En *Laboratory animal medicine* (pp. 203–246). Elsevier.
- Hiyagon, S. (2014). “Estudio morfométrico del estómago del cobayo lactante. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 73.

- Jaramillo, R. (2017). Determinación de características morfofisiológicas del tracto digestivo del cuy (*cavia porcellus*) (B.S. thesis). Loja.
- Koolman, J., y Rohm, K.-H. (2012). *Bioquímica Humana: Texto y Atlas*. (4ta ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Malhotra, P. O., y Philip, G. (1965). Hydrolytic enzymes of mammalian intestines. 2. distribution of hydrolytic enzymes in dog, guinea-pig, squirrel, albino rat and rabbit intestines. *Indian Journal of Medical Research*, 53, 410-416.
- Manners, J. M., y Stevens, J. A. (1972). Changes from birth to maturity in the pattern of distribution of lactase and sucrase activity in the mucosa of the small intestine of pigs. Department of Animal Husbandry, School of Veterinary Science, University of Bristol, 113–127.
- Marounek, M., Vovk, S., y Skrivanová, V. (1995). Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition*, 73(3), 463–469.
- McDonald, P. (2011). *Nutrición animal capítulo de enzimas*. (7ma. ed.). Editorial Hélice.
- Montes, F. M., Vázquez, J. P. P., y Rosas, H. R. (2018). *Bioquímica de laguna y piña*. Manual Moderno.
- Pocock, G., y Richards, C. D. (2005). *Fisiología humana: la base de la medicina*. Elsevier España.
- Quesenberry, K. E., Avian, D. A., Donnelly, T. M., Aclam, D., y Mans, C. (2012). *Guinea Pigs and Chinchillas Clinical Techniques of Guinea Pigs and Chinchillas (Third Edition)*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-1-4160-6621-7.00022-1
- Rico, E., y Rivas, C. (2003). *Manual sobre el manejo de cuyes*. Utah, US. Proyecto MEJOCUY. Benson Agriculture and Food Institute Provo, 31.
- Roca, P., Oliver, J., y Rodríguez, A. M. (2004). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Editorial Hélice.
- Sabat, P., y Veloso, C. (2003). Ontogenic development of intestinal disaccharidases in

the precocial rodent octodon degus (octodontidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 134(2), 393 - 397. doi: [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00296-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00296-9)

Sakaguchi, E. (2003). Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal*, 74(5), 327–337.

Santín, A. (2011). Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatearen Argitalpen Zerbitzua., 2, 41–137.

Tejón, J., Garrido, A., y Blanco, G. (2009). *Bioquímica estructural: conceptos y tests*. Editorial Tebar: España.

Anexo A: Fotografías del Trabajo de Campo



Figura 7: Limpieza y desinfección de las instalaciones.



Figura 8: Ubicación de las jaulas e identificación de las crías.

Anexo B: Fotografías del Análisis Químico



Figura 9: Corte y preparación de la muestra.



Figura 10: Desarrollo del método extracción de proteínas.

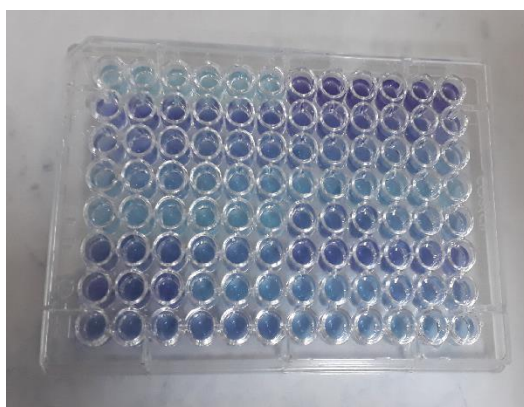


Figura 11: Aplicación del Método Biuret.

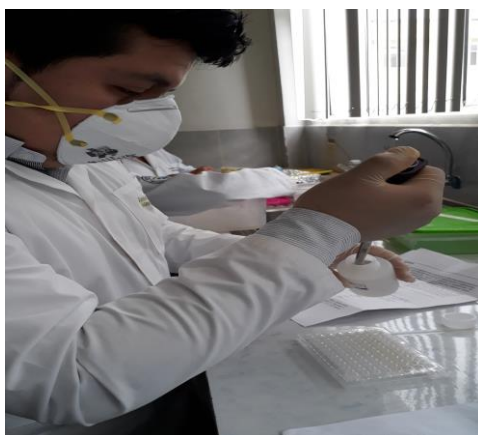


Figura 12: Aplicación del Kit Enzimático *B*-galactosidasa.



Figura 13: Elaboración de Resultados.

Anexo C: Fotografías del Análisis Estadístico

Información del modelo	
Conjunto de datos	WORK.IMPORT
Variable dependiente	Actividad_especifica
Estructura de covarianza	Simetría compuestas
Efecto de sujeto	Animal(Edad)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Between-Within

Test de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	DF Num	Den DF	Valor F	Pr > F
Edad	6	7	13.36	0.0016

Medias de mínimos cuadrados						
Efecto	Edad	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t
Edad	0	12.0562	1.2460	7	9.68	<.0001
Edad	7	8.0348	1.2460	7	6.45	0.0004
Edad	14	4.6755	1.2460	7	3.75	0.0071
Edad	21	0.02440	1.2460	7	0.02	0.9849
Edad	29	0.7805	1.2460	7	0.63	0.5509
Edad	33	0.8195	1.2460	7	0.66	0.5317
Edad	40	1.4509	1.2460	7	1.16	0.2824

Diferencias de medias de mínimos cuadrados							
Efecto	Edad	Edad	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t
Edad	0	7	4.0214	1.7621	7	2.28	0.0565
Edad	0	14	7.3808	1.7621	7	4.19	0.0041
Edad	0	21	12.0318	1.7621	7	6.83	0.0002
Edad	0	29	11.2758	1.7621	7	6.40	0.0004
Edad	0	33	11.2367	1.7621	7	6.38	0.0004
Edad	0	40	10.6054	1.7621	7	6.02	0.0005
Edad	7	14	3.3594	1.7621	7	1.91	0.0983
Edad	7	21	8.0104	1.7621	7	4.55	0.0026
Edad	7	29	7.2544	1.7621	7	4.12	0.0045
Edad	7	33	7.2153	1.7621	7	4.09	0.0046
Edad	7	40	6.5840	1.7621	7	3.74	0.0073
Edad	14	21	4.6511	1.7621	7	2.64	0.0334
Edad	14	29	3.8950	1.7621	7	2.21	0.0628
Edad	14	33	3.8559	1.7621	7	2.19	0.0648
Edad	14	40	3.2246	1.7621	7	1.83	0.1099
Edad	21	29	-0.7561	1.7621	7	-0.43	0.6808
Edad	21	33	-0.7951	1.7621	7	-0.45	0.6655
Edad	21	40	-1.4265	1.7621	7	-0.81	0.4449
Edad	29	33	-0.03905	1.7621	7	-0.02	0.9829
Edad	29	40	-0.6704	1.7621	7	-0.38	0.7149

Figura 14: Análisis estadísticos de actividad específica.

Información del modelo	
Conjunto de datos	WORK.IMPORT
Variable dependiente	Conc_proteína
Estructura de covarianza	Simetría compuestas
Efecto de sujeto	Animal(Edad)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Between-Within

Test de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	DF Num	Den DF	Valor F	Pr > F
Edad	6	14	1.19	0.3676

Medias de mínimos cuadrados						
Efecto	Edad	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t
Edad	0	21.0333	3.4859	14	6.03	<.0001
Edad	7	13.2380	3.4859	14	3.80	0.0020
Edad	14	12.9904	3.4859	14	3.73	0.0023
Edad	21	10.6314	3.4859	14	3.05	0.0087
Edad	29	9.8133	3.4859	14	2.82	0.0138
Edad	33	11.4736	3.4859	14	3.29	0.0054
Edad	40	11.0060	3.4859	14	3.16	0.0070

Diferencias de medias de mínimos cuadrados							
Efecto	Edad	Edad	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t
Edad	0	7	7.7954	4.9299	14	1.58	0.1361
Edad	0	14	8.0429	4.9299	14	1.63	0.1251
Edad	0	21	10.4019	4.9299	14	2.11	0.0533
Edad	0	29	11.2200	4.9299	14	2.28	0.0391
Edad	0	33	9.5597	4.9299	14	1.94	0.0729
Edad	0	40	10.0274	4.9299	14	2.03	0.0614
Edad	7	14	0.2476	4.9299	14	0.05	0.9607
Edad	7	21	2.6065	4.9299	14	0.53	0.6053
Edad	7	29	3.4246	4.9299	14	0.69	0.4986
Edad	7	33	1.7643	4.9299	14	0.36	0.7258
Edad	7	40	2.2320	4.9299	14	0.45	0.6577
Edad	14	21	2.3590	4.9299	14	0.48	0.6397
Edad	14	29	3.1771	4.9299	14	0.64	0.5297
Edad	14	33	1.5168	4.9299	14	0.31	0.7629
Edad	14	40	1.9844	4.9299	14	0.40	0.6934
Edad	21	29	0.8181	4.9299	14	0.17	0.8706
Edad	21	33	-0.8422	4.9299	14	-0.17	0.8668
Edad	21	40	-0.3746	4.9299	14	-0.08	0.9405
Edad	29	33	-1.6603	4.9299	14	-0.34	0.7413
Edad	29	40	-1.1926	4.9299	14	-0.24	0.8123
Edad	33	40	0.4676	4.9299	14	0.09	0.9258

Figura 15: Análisis estadísticos de proteína.