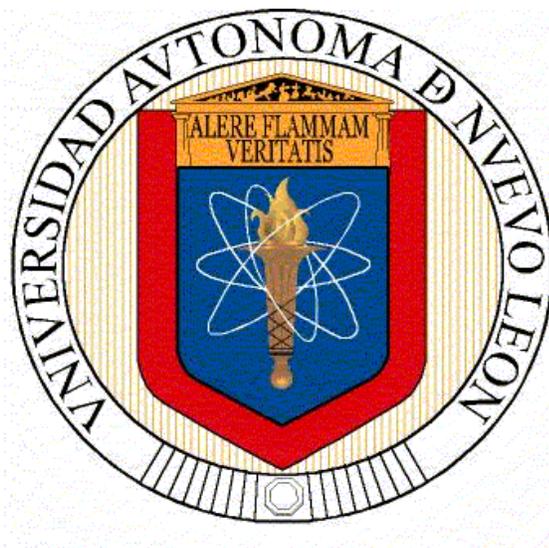


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DE COLESTEROL DE
CEPAS PROBIÓTICAS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

PRESENTA

MARTHA MONTSERRAT CASTORENA ALBA

MONTERREY, NUEVO LEÓN

MAYO, 2014

DR. EN CS. ESTEBAN GILBERTO RAMOS PEÑA
Subdirector de Investigación, Innovación y Posgrado
Facultad de Salud Pública y Nutrición.

Presente.-

Me permito comunicar a usted que he concluido la Dirección de la tesis titulada:
“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DE COLESTEROL DE CEPAS PROBIÓTICAS” presentada por la **LCA. Martha Montserrat Castorena Alba**, con el grado de obtener el grado de Maestro en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto por el momento, estoy a sus órdenes, le envío un cordial y afectuoso saludo.

Atentamente

“Alere Flamman Veritatis”

Monterrey, Nuevo León, 06 de Mayo de 2014

Dr. en C. Blanca Edelia González Martínez

Director de Tesis

Responsable del Laboratorio de Alimentos, CINSP



COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada: “**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DE COLESTEROL DE CEPAS PROBIÓTICAS**”, presentada por la **LCA. Martha Montserrat Castorena Alba**, con la finalidad de obtener el grado de Maestro en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León, 30 de Mayo del 2014

Comité Académico de Maestría

MBA. Manuel López Cabanillas Lomelí
PRESIDENTE

Dra. Blanca Edelia González Martínez
SECRETARIO

Dr. Francisco Javier Bosques Padilla
VOCAL

Avenida Dr. Eduardo Aguirre Pequeño y Yuriria
Col. Mitras, Centro, C.P. 64460
Monterrey, Nuevo León, México
Tel: (81) 13 40 48 90 y 83 48 60 80 (en fax)
www.faspyn.uanl.mx; faspyn@uanl.mx

DEDICATORIA

A mis Padres: Martha y Arturo

A mis Hermanos: Arturo e Israel

A mi Esposo: Alberto

Todo el amor y mi más sincero y eterno Agradecimiento

AGRADECIMIENTOS

A la FaSPyN por el apoyo y facilidades brindadas para la realización de este meta.

A la Doctora: Blanca Edelia González Martínez, por el apoyo, guía y consejo oportuno a lo largo de este proyecto.

Al MBA. Manuel López-Cabanillas Lomelí por el consejo y observaciones oportunas para la mejora de este trabajo.

Al Dr. Francisco Javier Bosques Padilla por su apoyo en la realización de este proyecto.

A la Ing. Silvia Osorio de Dios por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

A los docentes que me brindaron su apoyo, consejo y me compartieron sus conocimientos.

A mis colegas y amigas de maestría: Ninfa, Nancy, Joselina y Debbie, por su apoyo, compañerismo, consejos y todas y cada una de nuestras vivencias.

Al equipo de laboratorio de alimentos del CINSP: Gerardo, Abad, Berenice y Sofía, por su apoyo, ayuda y sobre todo por hacer del ambiente de trabajo un ambiente familiar.

A mis colegas y amigos de facultad, por sus consejos, apoyo y su gran amistad.

A mis padres Arturo y Martha: por su infinito apoyo y consejo que me han permitido alcanzar cada una de mis metas.

A mi hermano Arturo, siempre presente, siempre constante, siempre aquí, siempre mío.

A mi hermano Israel, por su apoyo, consejo y excelente ejemplo de perseverancia y constancia.

A mis sobrinas Isabella e Ivanna, por enseñarme a descubrir nuevamente el mundo.

A mi esposo Alberto, gracias por tu compañía, tu consejo, tu apoyo, por caminar conmigo y compartir cada una de mis aventuras.

TABLA DE CONTENIDO

1.RESUMEN	1
2.INTRODUCCIÓN	3
3.HIPÓTESIS	5
4.OBJETIVOS	6
4.1. Objetivo general.....	6
4.2. Objetivos específicos.....	6
5. ANTECEDENTES	7
5.1. Colesterol y enfermedades cardiovasculares (ECV)	7
5.2. Metabolismo de colesterol	12
5.2.1. Relación entre el colesterol y las enfermedades cardiovasculares ..	13
5.3. Probióticos.....	17
5.3.1. Efectos positivos a la salud por el consumo de probióticos.....	18
5.3.2. Productos con probióticos	22
5.4. Probióticos y colesterol.....	23
5.4.1. Estudios <i>in vitro</i>	24
5.4.2. Estudios en modelos animales.....	25
5.4.3. Estudios en humanos.....	27
5.4.3.1. Estudios en humanos utilizando alimentos.....	27
5.4.3.2. Estudios en humanos utilizando cápsulas para reducir los niveles de colesterol.....	28
5.5. Mecanismos de acción utilizados por los probióticos para reducir el colesterol	30
5.5.1. Actividad de enzima sal biliar hidrolasa utilizada por probióticos	30
5.5.2. Consumo de colesterol por bacterias intestinales	33
5.5.3. Unión del colesterol a la superficie celular	34
5.5.4. Incorporación del colesterol a la membrana celular	34
5.5.5. Conversión de colesterol a coprostanol.....	35
5.5.6. Inhibición de la formación de micelas.....	36

5.5.7. Fermentación selectiva de ciertos alimentos por la microbiota intestinal	37
6. METODOLOGÍA.....	39
6.1. Diseño	39
6.1.1. Tipo de estudio.....	39
6.2. Esquema general de análisis.....	39
6.3. Material biológico.....	39
6.4. Aislamiento de microorganismos probióticos.....	41
6.4.1. Gram y morfología bacteriana	41
6.4.2. Identificación de probióticos aislados	42
6.4.3. Identificación por métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa - PCR).....	42
6.5. Tolerancia al ácido.....	44
6.6. Tolerancia a la bilis	45
6.7. Asimilación y ensayo de colesterol	46
6.8. Determinación de polisacáridos exocelulares (EPS)	47
6.8.1. Mantenimiento de cultivos	47
6.8.2. Producción y medición de polisacáridos exocelulares (EPS)	47
6.8.2.1. Determinación de azúcares totales por el método antrona	48
6.8.3. Medición de la adhesión de los ácidos biliares	48
6.8.3.1. Determinación de azúcares totales por el método fenol – sulfúrico... ..	49
6.9. Composición de ácidos grasos de la membrana celular.....	49
6.9.1. Determinación de ácidos grasos de la membrana celular por cromatografía de gases.....	51
6.10. Determinación cuantitativa de desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH).....	51
6.11. Análisis estadístico	52
7. RESULTADOS	54
7.1. Aislamiento de cepas y obtención de cultivo puro	54
7.1.1. Identificación de cepas probióticas por métodos bioquímicos (API®CH50)	54

7.1.2. Identificación de cepas probióticas por métodos moleculares (PCR)...	57
7.2. Tolerancia al ácido.....	59
7.3. Tolerancia a la bilis.....	61
7.4. Asimilación de colesterol <i>in vitro</i>	62
7.5. Determinación de exopolisacáridos (EPS)	66
7.6. Perfil de ácidos grasos de las membranas probióticas de los microorganismos probióticos.	73
7.7. Desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH)	79
7.8. Comparación entre los mecanismos de acción para reducir el colesterol de las cepas de trabajo.....	80
8. DISCUSIÓN.....	83
8.1. Aislamiento de cepas y obtención de cultivo puro. Identificación de cepas probióticas por métodos bioquímicos (API®CH50) e identificación por métodos moleculares (PCR).....	83
8.2. Tolerancia al ácido.....	86
8.3. Tolerancia a la bilis.....	88
8.4. Asimilación de colesterol	89
8.5. Determinación de polisacáridos exocelulares (EPS)	90
8.6. Perfil de ácidos grasos de las membranas probióticas.....	92
8.7. Desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH)	92
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	95
9.1. Recomendaciones.....	96
10. ANEXOS.....	97
ANEXO 1. Cromatogramas del perfil de lípidos de las cepas analizadas en presencia de colesterol y sales biliares.....	97
11. BIBLIOGRAFÍA.....	114

LISTA DE TABLAS

TABLA		Pág.
1	Productos alimenticios con probióticos	40
2	Cepas de referencia utilizadas y su codificación	41
3	Secuencias de oligonucleótidos utilizadas	43
4	Métodos de cultivo seleccionados y sus componentes	50
5	Identificación preliminar de cepas aisladas de alimentos	54
6	Comparación de los microorganismos identificados con lo declarado en el etiquetado	56
7	Identificación de cepas por métodos moleculares	59
8	Asimilación de colesterol de cepas probióticas sometidas a medio MRS con dos concentraciones de Oxgall (0.2% o 0.4% p/v) y colesterol [100µg/ml]	64
9	Estandares para la identificación de perfil de ácidos grasos	73
10	Perfil de ácidos grasos de las cepas probióticas	77
11	Concentración de ácido cólico a partir de la desconjugación de ácido taurocólico por la acción de la enzima SBH secretada por bacterias probióticas.	79
12	Mecanismos de acción de las cepas de trabajo	82

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Esquema general de análisis	39
2	Gel de agarosa de la electroforesis realizada a los resultados de PCR para el orden <i>Eubacterium</i>	57
3	Gel de agarosa de la electroforesis realizada a los resultados de PCR para el género <i>Bifidobacterium</i>	58
4	Gel de agarosa de la electroforesis realizada a los resultados de PCR para la cepa <i>Bacillus coagulans</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>	58
5	Sobrevivencia al ácido de cepas aisladas de alimentos y de referencia a pH = 2	60
6	Sobrevivencia a la bilis de cepas aisladas de alimentos y de referencia	62
7	Porcentaje de asimilación de colesterol/12 horas de exposición	66
8	Concentración [$\mu\text{g/ml}$] de glucosa en las cepas de estudio	68
9	Concentración de pentosas y hexosas en $\mu\text{g/ml}$ en medio de cultivo MRSL	70
10	Correlaciones de sales biliares y azúcares producidas por las cepas de trabajo	72
11	Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en presencia de colesterol y sales biliares de la cepa <i>Lactobacillus para paracasei</i>	76
12	Concentración de ácido cólico en las cepas de trabajo	80

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ECV	Enfermedades cardiovasculares
FDA	Food and Drug Administration / (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Gramos
GRAS	Generally recognized as safe / (Generalmente reconocido como seguro)
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	High density lipoprotein / (Lipoproteína de alta densidad)
KCl	Cloruro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
LDL	Low density lipoprotein / (Lipoproteína de baja densidad)
M	Molar
m	Metro
mg	Miligramo
mg/dl	Miligramo por decilitro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimol
mm	Milímetro
mmol/l	Milimol por litro
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
MRSL	Man, Rogosa y Sharpe – Lactosa
MRS-LC	Man, Rogosa y Sharpe con L-cisteína

N	Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
NDM	Not fat dry milk / (Leche en polvo sin grasa)
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pág.	página
p/v	Peso por volumen
Pb	Pares de bases
PCR	Polimerase chain reaction / (Reacción en cadena de la polimerasa)
EPS	Polisacáridos exocelulares
rpm	Revoluciones por minuto
SBH	Sal biliar hidrolasa
SEM	Scanning electron microscope / (Microscopio de barrido electrónico)
TA	Temperatura ambiente
UFC	Unidad formadora de colonia
UI/kg	Unidad internacional por kilogramo
v/v	Volumen por volumen
µg/ml	Microgramo por mililitro
µl	Microlitro

1. RESUMEN

Introducción. Niveles altos de colesterol están íntimamente relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, llegando a representar uno de los principales factores de riesgo para desarrollar este padecimiento. Actualmente la forma de tratar esta patología es la combinación de dieta y fármacos, llegándose a desarrollar efectos secundarios adversos, de aquí la necesidad de desarrollar otras alternativas para tratar la enfermedad. Desde tiempos antiguos se ha relacionado el consumo de bacterias probióticas con beneficios a la salud, Mann y Spoerry en 1974 evidenciaron que el consumo continuo de algunos microorganismos probióticos tienen efecto en los niveles de colesterol lo que indica la posibilidad de utilizar probióticos para tratar la hipercolesterolemia. **Objetivo.** Evaluar la capacidad que diferentes géneros de cepas probióticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium*) poseen para reducir el colesterol *in vitro* mediante uno o más mecanismos de acción. **Material y método.** Se aislaron cepas de diferentes productos alimenticios con declaración de probióticos; posteriormente se realizó su identificación por el método API® CH50 y/o PCR. Se evaluó en las diferentes cepas obtenidas la tolerancia al ácido y bilis. Se evaluó la asimilación de colesterol (método de O-ftaldehído); la determinación de polisacáridos exocelulares (método antrona y fenol-sulfúrico); la determinación de ácidos grasos de la membrana celular (cromatografía de gases) y la presencia de la enzima SBH se determinó mediante la cuantificación de desconjugación de ácido taurocólico a ácido cólico libre. **Resultados.** Existen variaciones entre las cepas en la tolerancia al ácido y bilis, dependiendo de la cepa y de la sal biliar utilizada (ácido cólico, tauricólico y oxgall), los porcentajes de sobrevivencia oscilan entre 0% y 100%. La asimilación de colesterol oscila entre 0% y 57.65% y es influido por la concentración de oxgall. La producción de polisacáridos exocelulares es particular de cada cepa, también se hace evidente la variación dependiendo de la naturaleza de la matriz que se utilice, al correlacionar entre el contenido de polisacáridos y sales biliares se observa que no hay correlación entre el ácido cólico y el contenido de polisacáridos mientras que en presencia del ácido

taurcólico se observa una correlación de Pearson negativa de -0.480 en el caso de pentosas y de -0.476 en el caso de hexosas, ambas con una significancia de 0.01 con las concentraciones de azúcares. El perfil de ácidos grasos de las bacterias probióticas se ve modificado en base a los componentes del medio de cultivo donde fue incubado y la presencia de colesterol y sales biliares incrementa el contenido de ácidos grasos insaturados y grasas trans. Se observa que todas las cepas son capaces de desconjugar el ácido taurocólico a ácido cólico libre, lo cual sugiere que estas cepas secretan la enzima SBH, responsable de esta desconjugación; sin embargo el nivel de desconjugación es cepa dependiente. **Discusión y Conclusión.** Las características y propiedades de los microorganismos probióticos son cepa-dependiente, así como su interacción con otros microorganismos y con las diferentes matrices en las que pueden ser administrados, es necesario realizar investigaciones a cada cepa para de esta forma asegurar la viabilidad y efecto deseado al momento de utilizarlos para el desarrollo de suplementos y alimentos funcionales.

2. INTRODUCCIÓN

La evidencia científica actual relaciona los niveles altos de colesterol en el plasma y el desarrollo de enfermedades, a tal grado, que están reconocidos como uno de los principales factores de riesgo para desarrollar una enfermedad cardiovascular (ECV). A su vez, existe una fuerte evidencia que relaciona la disminución de los niveles de colesterol sanguíneo y una reducción en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Xie y colaboradores., 2011).

Hasta el momento, la forma de tratar la hipercolesterolemia es mediante la combinación de dieta y fármacos, sin embargo, al ser utilizados por un tiempo prolongado pueden desarrollar efectos secundarios adversos para el paciente; aunado a esto, está la gran inversión económica que representa mantener el tratamiento de estos padecimientos crónicos (Lay-Gaik & Min-Tze, 2010; Ledesma-Velazco, 2011).

Debido a esto, continuamente se buscan diversas alternativas de tratamiento que puedan ayudar a los pacientes con estos padecimientos para mejorar su estado de salud y tener una mayor cantidad de opciones que les ayude a contrarrestar los síntomas, disminuir riesgos de complicaciones y por consiguiente elevar su calidad de vida.

Las bacterias probióticas, son microorganismos que a lo largo del tiempo, en base a evidencias científicas, han demostrado generar diversos beneficios a la salud, moderan el sistema gastrointestinal, ayudan a prevenir o disminuir los síntomas provocados por diversos padecimientos como colitis, gastritis, diarreas por antibióticos. Además, mejora el sistema inmune ayudando a prevenir infecciones del tipo gastrointestinal y genitourinarias (Gill & Guarner, 2004).

Otro de los efectos benéficos que se le han atribuido a los probióticos es la capacidad de éstos para reducir los niveles séricos de colesterol. Se han estudiado los mecanismos de acción al aplicar diferentes tipos de estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando para ello animales de laboratorio e incluso

intervenciones en humanos, sin embargo, hasta el momento la evidencia obtenida de estas investigaciones es muy diversa y no se ha llegado a establecer con claridad cuáles son las cepas de probióticos con capacidad de reducir el colesterol, así como el o los mecanismos que estos microorganismos utilizan para reducir el colesterol, tampoco la cantidad o concentración de UFC que necesitan consumir para poder remover o eliminar el colesterol en plasma (Lay-Gaik & Min-Tze, 2010).

Cabe destacar que este efecto de reducción de colesterol es a nivel del intestino, por lo que es importante que estos microorganismos lleguen viables al colon, sobreviviendo a las concentraciones de ácido y sales biliares del tracto gastrointestinal (Kumar y colaboradores, 2012).

Además, cada cepa probiótica tiene una actividad bioquímica específica sobre el colesterol, característica que hay que tomar en cuenta al momento de seleccionar un microorganismo para el desarrollo de alimentos o suplementos que se comercializan con esta finalidad.

Aun así, el potencial de aplicación de las bacterias probióticas en diversas industrias como la farmacéutica, pero sobre todo la alimentaria, hacen de estos microorganismos candidatos idóneos para su uso en el desarrollo de alimentos funcionales, siempre dentro de una dieta balanceada pueden ayudar a prevenir o disminuir los efectos de algunas enfermedades.

Es por ello, y por la evidencia existente, que se sugiere que estos microorganismos pueden ser usados como alternativa para tratar la hipercolesterolemia.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de diversas cepas probióticas de reducir el colesterol por una técnica *in vitro*, además se estudiaron diversos mecanismos de acción por los cuales estas cepas reducen el colesterol del medio en el que se encuentran, haciendo una comparación entre las diversas cepas analizadas y entre los mecanismos estudiados. Esta información ayudará a la comunidad científica, y a la industria alimentaria e inclusive a la farmacéutica para el desarrollo de nuevos usos de las bacterias probióticas y el

posible desarrollo de alimentos funcionales y suplementos que sirvan como coadyuvante para el tratamiento de la hipercolesterolemia y amplíe las opciones existentes en el mercado.

3. HIPÓTESIS

1. Las cepas probióticas utilizan diferentes mecanismos de acción para reducir el colesterol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad que diferentes géneros de cepas probióticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium*) poseen para reducir el colesterol *in vitro* mediante uno o más mecanismos de acción.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la sobrevivencia de las cepas probióticas al ácido y a la bilis.
- Determinar la capacidad de asimilación de colesterol *in vitro* de las cepas probióticas mediante el consumo del colesterol por estos microorganismos.
- Evaluar la capacidad de producción de exopolisacáridos y la adhesión de sales biliares a la superficie celular de los microorganismos.
- Determinar la capacidad de las cepas probióticas de modificar el perfil de ácidos grasos de su membrana por la presencia de colesterol y sales biliares.
- Evaluar la capacidad de las cepas probióticas de desconjugar sales biliares por la presencia y actividad de la enzima Sal Biliar Hidrolasa.
- Determinar si las cepas probióticas son capaces de usar uno o más mecanismos de acción para reducir el colesterol

5. ANTECEDENTES

5.1. Colesterol y enfermedades cardiovasculares (ECV)

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), entre las que se incluyen hipertensión, arterioesclerosis, aterosclerosis, derrames, ataques al corazón, insuficiencia cardíaca y colesterol alto; afectan al corazón al estrechar las arterias y reducir la cantidad de sangre que éste recibe, provocando que realice más esfuerzo al trabajar. Las ECV en la mayoría de los casos se presentan sin dolor y sin ningún síntoma aparente, lo que lleva a que no se traten a tiempo y que se desencadenen problemas más serios, como un ataque al corazón o un derrame, además, es muy común que se padezca más de una condición cardiovascular al mismo tiempo sin saberlo (NAHH, 2004).

Elevados niveles de colesterol en el plasma, están directamente relacionados y reconocidos como uno de los principales factores de riesgo para padecer ECV (Xie y colaboradores, 2011). Las ECV son la principal causa de muerte alrededor del mundo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el 2030 morirán 26.3 millones de personas por esta causa; se calcula que en el año 2004, 17.3 millones de personas murieron por esta causa, llegando a representar el 30% de las muertes totales registradas, de éstas, 7.3 millones de muertes se debieron a cardiopatía coronaria y 6.2 millones a accidentes cerebro-vasculares (OMS, 2011; Clínica Centro Granada, 2011). Con respecto a México, las muertes por este motivo llegaron a representar 105,144 muertes en el 2010, por lo que se ubica como la primer causa de muerte en nuestro país (INEGI, 2010).

Las ECV afectan de forma equitativa a hombres y mujeres y se sabe que el 80% de éstas se generan en países de ingresos bajos y medios. Sin embargo, ésta es la principal causa de muerte en mujeres de edad avanzada en las sociedades desarrolladas, y se espera que esta prevalencia aumente un 30% en el año 2020. El hecho de que afecte a las mujeres en edad avanzada se debe a los cambios metabólicos que produce la menopausia, en concreto, el aumento de los índices de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos y el

descenso de los niveles de colesterol HDL, lo que puede aumentar el riesgo de ECV en mujeres a partir de los 60 años, sobre todo de la cardiopatía isquémica que se observa con mayor frecuencia en mujeres menopáusicas (Coca y colaboradores, 2009).

Se sabe que con una reducción de 1% de los niveles de colesterol sanguíneos se reduce el riesgo entre 2% a 3% de padecer una ECV (Manson, Tosteson, Ridker, Satterfield, Hebeert, & O'Connor, 1992). Actualmente, para reducir los niveles de colesterol se utiliza una combinación de dieta y fármacos, los segundos, al ser usados por tiempos prolongados conllevan a desarrollar efectos secundarios adversos (Lay-Gaik & Min-Tze, 2010) además del costo tanto de parte del paciente como del sector salud, llegando a representar un 7% del gasto total que se dirige para este fin (Lay-Gaik & Min-Tze, 2010; Ledesma-Velasco, 2011).

Al diagnosticar la hipercolesterolemia (o colesterol alto) el primer tratamiento al que se somete al paciente es la dieta, dicho tratamiento suele oscilar entre dos y seis meses; si después de este periodo aún se detectan niveles altos de colesterol, se considera combinar la dieta con un tratamiento farmacológico (Masana-Marin, 2009).

En el año 1933 Rudolf Schoenheimer demostró que al sustituir una dieta habitual por una dieta vegetariana en una paciente diagnosticada con hipercolesterolemia familiar, se producía un descenso en la cifra de su colesterol plasmático; concluyendo que el descenso de éste era consecuencia de la carencia de colesterol en la dieta vegetariana. Años más tarde, en 1949 Kempner observó que una dieta de arroz y fruta reducía la concentración de colesterol plasmático; sin embargo, en 1950 Ancel Keys y sus colaboradores demostraron que esta dieta carecía de efecto reductor si se le añadía margarina, que por su origen vegetal carece de colesterol, demostrándose que el efecto hipocolesterolemiante de la dieta no se debía a la ausencia de colesterol, sino a la de la grasa de la dieta (Pacoví-Mieras, 2004).

En el año 2001, el comité de expertos del programa nacional de educación en colesterol (NECP, por sus siglas en inglés) introdujo algunas modificaciones en el tratamiento de los pacientes de hipercolesterolemia, estableciendo como prioritarios los cambios en la alimentación y en el estilo de vida (De Luis-Roman, Bellido-Guerrero, & García-Luna, 2010).

Se recomienda que la dieta que siga el paciente sea sana y equilibrada, tratando de conseguir una reducción del peso, colesterol y triglicéridos, disminuyendo así el riesgo a desarrollar alguna enfermedad cardiovascular, siguiendo como estrategia una disminución en la ingesta calórica y un aumento en la actividad física. En términos generales, los alimentos se dividen en tres grandes grupos dependiendo de su frecuencia idónea de consumo:

1. Alimentos recomendables: en este grupo se engloban aquellos alimentos con bajo contenido de grasa saturada y/o alto contenido en carbohidratos complejos y fibra, como lo son, frutas, verduras, hortalizas, cereales integrales, pescado (especialmente el blanco) y aceite de oliva. Se recomienda un consumo de grasa saturada <7% y un consumo de ácidos grasos “trans” <2% de la energía total de la dieta y un incremento en el aporte de ácidos grasos monoinsaturados, en cuanto al consumo de ácidos grasos polinsaturados se recomienda un predominio de los ácidos omega 3, sobre los ácidos omega 6. También se recomienda un consumo diario de hasta 2g de esteroides vegetales al día, sobre todo cuando no se alcanzan los niveles de colesterol LDL deseados y antes de recurrir a un tratamiento farmacológico. Así mismo, se hace énfasis en un consumo de fibra soluble en porciones de 10g a 25g por día (De Luis-Roman, Bellido-Guerrero, & García-Luna, 2010).

Diversos estudios con ensayos clínicos han demostrado que al sustituir las grasas saturadas por polinsaturadas resulta en una reducción de la incidencia de ECV, debido a una reducción en los niveles de colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL (Siri-Tarino, Sun, Hu, & Krauss, 2010).

2. Alimentos que deben consumirse con moderación: en este grupo se encuentran aquellos alimentos que contienen una abundante cantidad de grasas insaturadas o cantidades moderadas de grasas saturadas, como las carnes magras y los aceites de semillas (Fundación hipercolesterolemia familiar, 2007).
3. Alimentos no recomendables: dentro de este grupo se encuentran aquellos alimentos que contienen una considerable cantidad de grasa saturada y/o colesterol, entre los que destacan los productos de panadería, lácteos enteros y sus derivados, mantequilla, carnes grasas, embutidos y alimentos fritos (Fundación hipercolesterolemia familiar, 2007).

Cuando las modificaciones en la dieta y el incremento en la actividad física no son efectivas es necesario incluir un tratamiento con fármacos, de los cuales, existe una amplia variedad, éstos se dividen en familias, entre las que se encuentran:

- Estatinas: éstas actúan bloqueando la síntesis del colesterol al nivel del hígado, siendo este órgano la principal fuente de colesterol endógeno. Dependiendo del tipo de estatina, y la dosis, esta familia de fármacos puede reducir el colesterol LDL entre un 25% y un 50%, razón por la cual es el tratamiento farmacológico más utilizado para controlar este padecimiento, siendo utilizado para el control del colesterol total alto, colesterol LDL y triglicéridos, en hipercolesterolemia primaria y dislipidemia mixta; este medicamento debe de administrarse junto con una dieta restringida en grasas saturadas y colesterol (P. R. Vadémecum, 2013). Aun y cuando es un medicamento seguro, pueden presentarse reacciones adversas, como malestares gastrointestinales, dolor de cabeza, mareos, náuseas (Masana-Marin, 2009).
- Inhibidores de la absorción del colesterol: un ejemplo de esta familia es la ezetemiba y actúa reduciendo la absorción del colesterol en el intestino, su porcentaje de reducción en monoterapia es del 20%, sin embargo,

tiene un efecto de reducción aditivo cuando se combina con otros medicamentos para tratar la hipercolesterolemia (Fundación Hipercolesterolemia Familiar, 2007).

- Fibratos: actúan principalmente reduciendo los triglicéridos, en menor medida aumentan el colesterol HDL y son poco eficaces en la reducción del colesterol LDL (Fundación Hipercolesterolemia Familiar, 2007).
- Resinas: éstas reducen la absorción intestinal del colesterol que está contenido en los ácidos biliares eliminándolos en las heces. Las resinas vienen en presentación de polvo, por lo que se mezcla con algún líquido para ser consumido. Es un medicamento muy seguro, por lo que puede ser utilizado en infantes, sin embargo, pueden presentarse algunas reacciones adversas que limitan su utilización, sobre todo malestares gastrointestinales como flatulencias (Fundación Hipercolesterolemia Familiar, 2007).

Hay que tomar en cuenta que los tratamientos farmacológicos existentes hasta el momento sólo pueden ser utilizados para controlar el padecimiento, mas no ofrecen una cura, por lo que las personas que los necesitan deberán utilizarlos durante toda su vida, viendo afectados su estilo de vida y la calidad de la misma.

El impacto económico que este padecimiento ha generado es tal, que el presupuesto para su prevención aumentó de 500 millones de pesos en el 2000 a 15 mil millones de pesos en el 2010, además de que el gasto generado por Diabetes Mellitus, enfermedades cardiovasculares y obesidad en el año 2006 fue de 39 mil millones de pesos, lo que representó el 7% del gasto total en salud. Aunado a esto hay que considerar el gasto individual que cada paciente tiene que hacer para solventar su tratamiento así como el tiempo de intervención del mismo, el cual generalmente es de largo plazo (Ledezma-Velazco, 2011).

5.2. Metabolismo de colesterol

El colesterol es una molécula de alta relevancia biológica en las células animales, desempeñando numerosas y variadas acciones en el organismo, el descubrimiento de esta molécula fue realizado en el año 1815 por el químico francés M. E. Chevreul, quien lo llamó colesterina y fue hasta el año de 1926 que se describieron los detalles de su estructura por los trabajos de H. Wieland y A. Windaus. La molécula de colesterol pertenece al grupo de los esteroides, los cuales se caracterizan por tener en su estructura un anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno, o esterano, un grupo OH en el carbono 3 y una cadena lateral alifática, consta de 27 carbonos, con una cadena lateral de ocho carbonos, saturada y ramificada (Lasunción-Ripa, 2006).

El colesterol circulante en el cuerpo proviene de dos fuentes: el colesterol endógeno que se crea a partir de la síntesis *in novo*, y el colesterol exógeno el cual se obtiene a partir de la dieta. El colesterol es absorbido en el intestino gracias a la acción de los ácidos biliares y de los fosfolípidos, los cuales, son excretados desde el hígado siendo la cantidad absorbida de colesterol muy variable, por otro lado el colesterol endógeno es sintetizado por el hígado en un 20% aproximadamente, esta síntesis es iniciada gracias a la acción de la enzima acetil – coA y limitada por la acción de la enzima HMG coA-reductasa (Navarro-Santamaría, Zabala-Letona, Gómez-Sorita, & Portillo-Baquedano, 2009).

Es de vital importancia que exista un equilibrio entre los compartimentos hepáticos de colesterol, tanto libre como esterificado, este equilibrio se mantiene por la acción de las enzimas acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa y la colesterol ester hidrolasa. Cuando los niveles de colesterol se elevan en el hepatocito, éste debe ser capaz de activar los procesos fisiológicos para evitar la toxicidad en el organismo. Otro aspecto importante es la producción de ácidos biliares, los cuales son sintetizados por el hígado y reciclados gracias a la circulación enterohepática, la función de este proceso es la de transportar los ácidos biliares desde el intestino delgado a la circulación portal, y de aquí al hepatocito, de éste a la bilis y finalmente de la de vesícula biliar hacia el

intestino nuevamente. La formación de sales biliares se consideran una vía de degradación del colesterol, pero a la vez estos compuestos, junto con los fosfolípidos, solubilizan el colesterol en la bilis facilitando su excreción, la acción solubilizadora de los lípidos en la luz intestinal es imprescindible para la asimilación de los lípidos provenientes de la dieta (Lasunción-Ripa, 2006; Navarro-Santamaría, Zabala-Letona, Gómez-Sorita, & Portillo-Baquedano, 2009).

El colesterol es una molécula que cumple diversas funciones en los organismos animales: es un constituyente principal de las células, sin embargo, su concentración en las membranas varía de unas células a otras, encontrándose en su forma libre, lo que contribuye a determinar las propiedades físicas de las membranas, su fluidez y permeabilidad pasiva; además le da forma y estabilidad a las sinapsis, permitiendo la sinaptogénesis neuronal, teniendo un papel primordial en la diferenciación y comunicación neuronal; interviene directamente en la adhesión de ciertas proteínas en la membrana, facilitando su función; como se mencionó anteriormente es precursor metabólico en la biosíntesis de ácidos y sales biliares, es el precursor de las hormonas esteroídicas en los animales y de las ecdisonas en los insectos; por último tiene una participación activa en la proliferación celular en animales (Lasunción-Ripa, 2006). En el cuerpo humano es precursor de compuestos como: las sales biliares, necesarias para la absorción de las grasas; hormonas sexuales, específicamente testosterona en hombres y estrógenos en mujeres; las hormonas corticoides que se encuentran implicadas en procesos fisiológicos, como la regulación de la inflamación, funcionamiento del sistema inmunitario, metabolismo de hidratos de carbono y la respuesta frente al estrés (López-Farre & Macaya-Miguel, 2009).

5.2.1. Relación entre el colesterol y las enfermedades cardiovasculares

El aumento en los índices de enfermedades crónicas no transmisibles (entre ellas las enfermedades cardiovasculares) en los adultos ha sido favorecido por los cambios en el estilo de vida y tipo de alimentación, lo cual ha llevado a un incremento de los factores de riesgo como la obesidad y las

dislipidemias, además del incremento en el consumo de alcohol y tabaco, todo ello ha potenciado la incidencia de estas enfermedades, así como sus complicaciones, siendo el principal resultado el desarrollo de afecciones cardiovasculares. Dando como resultado que las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de morbilidad-mortalidad (Velázquez-Monroy y colaboradores, 2003).

La aterogénesis conduce a la arterioesclerosis, la cual es una de las principales causas de muerte por enfermedad cardiovascular, y ha causado la muerte a millones de personas, teniéndose reportes desde la época de los antiguos egipcios, griegos y romanos (Valenzuela & Morgado, 2006).

Sin embargo, no fue hasta el año de 1799 con el trabajo publicado por Caleb H. Parry en el cual se concluye que la “syncope anginosa” o “angina pectoris” se debía a la obstrucción de las arterias coronarias, y hasta el siglo XIX se percibe un aumento en el interés de las causas de la arterioesclerosis, desde tres enfoques diferentes: 1. La arterioesclerosis es un proceso de senescencia; 2. Es una enfermedad que tiene su origen en alguna alteración metabólica de las propias arterias, enfoque que fue difundido por Rudolf Virchow; y finalmente el tercer enfoque propuesto por Karl Rotiasky, quién proponía que el proceso de la arterioesclerosis evoluciona a partir de coágulos que se adhieren a las arterias, los cuales se transforman gradualmente en placas ateroscleróticas típicas. Pero no fue hasta el año de 1904 que el patólogo F. Manrchand introdujo el término de arterioesclerosis (Cullen, Rauterberg, & Lorkowsky, 2005).

El clínico Ignatowsky en el año de 1908 alimentó a conejos con una mezcla de leche y huevos observando que en pocas semanas de haber sido inducida la dieta, las aortas de éstos animales presentaban placas blanco-grisáceas, las cuales también se encontraban en humanos fallecidos por problemas cardíacos, reproduciendo así de forma experimental la patología típica de la enfermedad. Fue en el año de 1910 con los trabajos realizados por el patólogo A. Windaus que se hace el primer indicio que relaciona al colesterol

con el desarrollo de arterioesclerosis, cuando esté encuentra que las lesiones ateromatosas contenían 6 veces más colesterol libre y 20 veces más colesterol esterificado que un una pared arterial normal (Gutiérrez-Abejón, 2010).

Stuckey y Anichkov replicaron el experimento de Ignatowsky, pero dando a los conejos tres diferentes suplementos: homogenizado de tejido de pollo, homogenizado de clara de huevo o sólo yema de huevo, observando que aquellos conejos alimentados solo con yema de huevo presentaban placas ateromatosas (Gutiérrez-Abejón, 2010).

Sergi Chalaty, otro colaborador de Anichkov observó que en los ateromas de los conejos, se producían pequeñas gotas de grasa que al ser observadas bajo luz polarizada eran birrefringentes y mostraban figuras de doble cruz, pensando que esto se debía a la presencia de fosfolípidos o colesterol, por lo que alimentaron a los conejos con alguno de estos; confirmando que aquellos conejos alimentados con colesterol desarrollaban ateromas, sin embargo, en trabajos posteriores se observó que no todos los animales desarrollaban ateromas, a pesar de los niveles de colesterol, llegando a la conclusión que el colesterol no es el único causante de esta patología, y que había otros factores que también incidían en este enfermedad con tanto o más efecto que el colesterol mismo, además de que una enfermedad cardiovascular no es sinónimo de aterosclerosis por lo que una alta concentración de colesterol LDL o de colesterol total puede ser un resultado secundario de factores no controlados que promueven dichas enfermedades como lo es la falta de actividad física, el estrés mental, fumar y la obesidad, ya que estos factores desencadenan una inflamación crónica lo que permite que el colesterol se acumule en las paredes de los vasos sanguíneos; también se ha visto que la hipertensión y la taquicardia inducida en animales experimentales alimentados con dietas aterogénicas, causaban un desarrollo acelerado de la placa dando origen al padecimiento (Ravnskov, 2002; Clínica Centro de Granada, 2011).

En 1935, el patólogo Timothy Leary postuló que la arterioesclerosis era causada por un exceso de colesterol plasmático y en 1950 John Gofman comunicó que al ultracentrifugar el suero extraído de conejos alimentados con colesterol, este se separa en dos fracciones, la que flotaba en la superficie era una mezcla de proteínas, fosfolípidos y colesterol, por la que la denominó “Lipoproteína de Baja Densidad “, conocida como LDL, la otra fracción era más densa, por lo que fue denominada “Lipoproteína de Alta Densidad” también conocida HDL, por sus siglas en inglés; Gofman también observó que en los conejos normocolesterolémicos la mayor parte del colesterol era transportado en las HDL, mientras que en los hipercolesterolémicos este era mayormente transportado por la LDL, este hallazgo fue corroborado al ultracentifugar suero sanguíneo de hombres y mujeres con antecedentes de arterioesclerosis y de infarto, por lo que Gofman concluyó que no es el colesterol total sino el colesterol LDL el indicador de riesgo cardiovascular (Valenzuela & Morgado, 2006).

En 1950 Lawrence Kinsell descubrió que al alimentarse con vegetales y disminuyendo la ingesta de productos animales se producía una disminución en el colesterol plasmático, principalmente en el colesterol LDL, este hallazgo fue confirmado por Ahrens y colaboradores, quienes además, asociaron el consumo de grasas insaturadas con la reducción de colesterol plasmático (Valenzuela & Morgado, 2006).

Finalmente en 1958 William Dock, en una editorial publicada en la revista *Circulation*, concluyó que el colesterol de la dieta y la composición de la misma, desempeñan un papel fundamental en mayor o menor medida en el desarrollo de la aterosclerosis de las arterias. Y en 1983, Michael Brown y Joseph Goldstein descubrieron el receptor celular de las LDL responsable del control intracelular que determina los niveles plasmáticos de colesterol LDL y su relación con la aterogénesis (Valenzuela & Morgado, 2006).

5.3. Probióticos

La palabra “probiótico” viene del griego que significa “para la vida”. El primero en observar el efecto benéfico sobre la salud que tenía el consumo de productos que contuvieran bacterias fermentadoras fue el Dr. Eli Metchnikoff quien desarrolló una dieta con leche fermentada por una bacteria a la que denominó “bacilo búlgaro”; sin embargo, no fue sino hasta 1960 que se acuñó la palabra “probiótico”. El investigador Fuller, redefinió la palabra como “un suplemento microbiano vivo que afecta benéficamente al huésped mejorando su equilibrio intestinal” (Guarner y colaboradores, 2008); en el año 2001 la Organización Mundial de la Salud y FAO redefinieron a los probióticos como “organismos vivos que al ser administrados en raciones adecuadas confieren un beneficio a la salud en el huésped” (WHO/FAO, 2001).

Microbiológicamente, los probióticos son, en su mayoría, bacterias Gram positivas, principalmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (WHO/FAO, 2001) las cuales son capaces de sobrevivir a la digestión, permanecer viables a través de largos periodos de almacenamiento e inocuos para el consumo humano (Ewaschuk & Dieleman, 2006).

Además de lactobacilos y bifidobacterias hay otras especies de diversos géneros que se han clasificado como probióticos como son: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, al igual que la levadura *Saccharomyces boulardii* (Mack, 2005).

La OMS estableció ciertos criterios que los microorganismos probióticos deben cumplir para ser usados para consumo humano (WHO / FAO; 2001):

- Deberán ser de origen humano.
- No patogénicas.
- No toxigénicas.
- Estabilidad en presencia de ácido gástrico y bilis.
- Antagonismo contra bacterias patógenas y carcinogénicas.
- Producción de sustancias antibacteriales.

- Capacidad de adherirse a células intestinales humanas.
- Capacidad de colonizar en tracto intestinal humano.
- Crecimiento adecuado *in vitro*.
- Seguras para su uso clínico y en alimentos.
- Comprobación de efecto benéfico.

Entre las áreas de estudio en las que se ha evaluado el uso de microorganismos probióticos se encuentra el tratamiento y la prevención de enfermedades diarreicas, la prevención de vaginitis e infecciones genitourinarias en adultos, la prevención de alergias alimentarias, la acción antitumoral del intestino, vejiga y cérvix entre otros padecimientos (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001).

5.3.1. Efectos positivos a la salud por el consumo de probióticos

Con el consumo habitual de probióticos se generan cambios en la composición de la microbiota, así como de los perfiles metabólicos de la misma, lo que influye en la salud del huésped y la resistencia a las enfermedades (Bezcorovainy, 2001).

Existen evidencias de que la microbiota está íntimamente relacionada con la salud y las enfermedades del huésped. Una microbiota saludable produce un efecto de barrera, modula el sistema inmune, disminuye los procesos inflamatorios del intestino y reduce la actividad metabólica relacionada con la producción de compuestos carcinogénicos. El efecto benéfico de los microorganismos probióticos se debe a que cuando estas cepas son ingeridas en cantidades adecuadas, ocurre una modificación del ecosistema de los billones de microorganismos que habitan en el intestino, lo que genera un equilibrio que se manifiesta un estado de salud, en el que existe competencia por los nutrientes entre los probióticos y los patógenos ingeridos de manera inadvertida, junto con esto, se genera una competencia por los sitios de adherencia a las paredes intestinales, lo que impide la colonización de patógenos y refuerza los mecanismos de defensa que estimulan al sistema

inmune (Guarner, 2000; Bezkorovainy, 2001; Khani, Hosseini, Taheri, Nourani & Imani-Fooladi, 2012).

El ser humano desde hace años utiliza los probióticos por sus efectos en la mejoría del estado nutricional y para tratar y prevenir diversas enfermedades entre las que se encuentran algunas disfunciones intestinales, infecciones gastrointestinales causadas por virus y por bacterias enteropatógenas, diarrea asociada a tratamiento con antibióticos, enfermedades de base inmunológica y la actividad antitumoral (Sanders y colaboradores., 2013).

La mejoría en el estado nutricional generada por el consumo de probióticos está dada principalmente por el aumento de la disponibilidad de algunos nutrientes como ácidos grasos de cadena corta que aportan energía, vitamina K y vitaminas del grupo B y algunos aminoácidos esenciales como lisina (Metges y colaboradores, 1999; Metges, 2000; St-Onge, Farnworth & Jones, 2000).

Las disfunciones intestinales en las que se ha observado un efecto positivo con el tratamiento con probióticos son la intolerancia a la lactosa y el estreñimiento. La intolerancia a la lactosa, en los productos lácteos con probióticos, se mejora debido a que, durante el proceso de fermentación, las bacterias ácido lácticas degradan la lactosa que contienen este tipo de productos (Rolfe, 2000; Mayo y Delgado, 2003). Se ha comprobado que el efecto de mejoría en los problemas de intolerancia a la lactosa es mayor cuando se ingieren productos con organismos vivos (Adolfsson, Meydani & Russel, 2004).

El estreñimiento es una disfunción intestinal motora definida en términos de la frecuencia de defecación, que se traduce en un incremento del tiempo de tránsito intestinal con síntomas como la presencia de malestar abdominal, dificultad para evacuar y vaciado incompleto del recto. Las causas de este padecimiento son muy variadas y principalmente se debe a una dieta baja en fibra (Mayo y Delgado, 2003). Existen pocos reportes sobre el papel de los

probióticos en esta patología y los resultados son muy diversos. En una revisión realizada por Adolfsson en 2004, se mencionan resultados prometedores como el incremento en el número de defecaciones de 3 a 7 por semana con el consumo de leche fermentada con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y hasta de 15 por semana cuando la leche fue fermentada con *L. acidophilus*.

Los probióticos se utilizan como preventivos o en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales causadas por rotavirus, diarrea asociada a tratamiento con antibióticos; infecciones por *Helicobacter pylori* y gastroenteritis causada por bacterias como *Escherichia coli* enteropatógena, diferentes especies de *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Yersenia enterocolitica*, *Campilobacter*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* (Girardin y Seidman, 2011).

El efecto positivo de los probióticos sobre el rotavirus ha sido evidenciado por de Roos y Katan (2000). Además en el año 2003, Reid, Jass, Sebulsky & McCormick realizaron una revisión de una decena de investigaciones que incluyen estudios doble ciego, aleatorizados y con placebo, concluyen que los probióticos, en especial *Lactobacillus rhamnosus* GG, tienen un efecto positivo en el tratamiento de la diarrea causada por rotavirus.

De la diarrea asociada al consumo de antibióticos se ha descrito que alrededor del 20% de los pacientes que consumen estos medicamentos pueden dañar severamente la ecología microbiana del intestino, dando como resultado, de manera frecuente la aparición de diarrea (Rolfe, 2000; Saavedra, 2001). En un meta-análisis realizado en el 2002 por D'Souza, Rajkumar, Cooke, & Bulpitt, concluyen que los probióticos pueden ser usados para prevenir la diarrea asociada a antibióticos y que de entre los microorganismos que presentan mayor potencial se encuentran *Sacharomyces boulardii* y algunas especies de *Lactobacillus*.

Sullivan y Nord (2002) trabajaron con probióticos y su efecto sobre *H. pylori* llegando a reportar resultados alentadores aunque ninguno de ellos se confirmaron con biopsias gástricas en la erradicación del patógeno; sin embargo Reid, Jass, Sebulsky & McCormick (2003) así como Chenoll, y colaboradores. (2011) es sus estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de las bacterias de la flora intestinal de reducir la viabilidad de *H. pylori*.

Los efectos benéficos de los probióticos sobre las diarreas de origen bacteriano se reportan en la reducción de número de evacuaciones diarreicas y en los días de estancia hospitalaria en estudios de doble ciego, sin embargo, los resultados benéficos publicados son diversos y poco concluyentes como lo refiere Heyman, (2000). Mientras que Vanderhoff y Young (2002) hacen hincapié en que estos efectos son cepa dependiente debido a la considerable variabilidad genética de los diferentes organismos probióticos. En un meta-análisis realizado por Van Niel, Feudtner, Garrison & Christakis (2002) donde los probióticos son utilizados como terapia de diarreas en niños encontraron que en forma significativa acortan la diarrea en 0.7 días, así como también inducen una reducción de 1.6 en el número de evacuaciones en el segundo día de tratamiento, y concluyen que los probióticos son seguros y efectivos en el tratamiento de la diarrea infecciosa en niños.

Los probióticos han sido reportados como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades de base inmunológica como síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria crónica como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, (Mayo y Delgado, 2003; Adolfsson, Meydani & Russel; 2004). El efecto positivo se basa en que los probióticos pueden participar en los procesos antiinflamatorios (Isolauri, Kirjavainen & Salminen, 2002) o atenuando las citoquinas proinflamatorias como la interleucina 10 (Madsen y colaboradores, 2001).

Cuando estos probióticos se introducen en alimentos, ya sea como parte del proceso de elaboración o como aditivos, se generan alimentos funcionales, es decir, aquellos alimentos que se obtienen por cualquier procedimiento, con

características de alguno de sus componentes, sea o no un nutrimento, y que afecta de manera positiva o promueve un efecto fisiológico al organismo más allá de su valor nutricional (Diplock y colaboradores, 1999), mostrando una influencia positiva en la salud humana, y en el caso de los probióticos, especialmente en efectos inmunomoduladores, beneficios en el sistema digestivo, actividad antitumoral y un posible efecto terapéutico y profiláctico sobre las enfermedades cardiovasculares y la obesidad (Kapka-Skrzypczak, Niedzwiecka, Wojtyla, & Kruszewski, 2012).

5.3.2. Productos con probióticos

Las bacterias ácido lácticas y probióticas han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos fermentados a base de leche como yogurth, jocoque, quesos madurados, así como en diversos productos cárnicos y en algunas hortalizas. Las bacterias ácido lácticas se utilizan por su capacidad de proporcionar sabor y textura además de incrementar el valor nutricional de los alimentos (Mateos, 2002) las técnicas artesanales para producir alimentos fermentados evolucionaron hasta lograr productos industrializados, sin embargo, fue hasta el siglo pasado que se introducen microorganismos específicos a los alimentos fermentados para obtener mayores beneficios a la salud.

En algunos países europeos y en Japón, el consumo de probióticos es común y se han utilizado como profilácticos de enfermedades diarreicas desde hace muchos años. Sin embargo, en occidente el consumo de estos productos tiene solo unas pocas décadas y los probióticos se comercializan en alimentos como yogurth, leches fermentadas, quesos, fórmulas infantiles, bebidas a base de jugos, entre otros (Torres, 2002).

Un requisito indispensable en la elaboración de alimentos con probióticos es la certeza de que los microorganismos adicionados son inocuos. La inocuidad de los probióticos se investiga tradicionalmente mediante experimentos de consumo a largo plazo; algunas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* han sido utilizados en el procesado

de alimentos desde hace siglos sin reporte de efectos negativos, por lo que la FDA los ha considerado como productos GRAS (Ishibashi y Yamazaki, 2001).

La inocuidad abarca la resistencia de genes resistentes a antibióticos, la estabilidad genética del probiótico, actividades deletoras, así como su potencial patogenicidad y toxicidad. Actualmente existen técnicas genéticas para evaluar la presencia de genes no deseables en las cepas probióticas (Sanders y colaboradores, 2010).

Aunque cada cepa probiótica es única, es esencial que en ellas se evalúen aspectos como la estabilidad genética, la sobrevivencia en el producto y las propiedades técnicas de las cepas. Ya que los diferentes componentes de la matriz del alimento pueden afectar la viabilidad de la cepa en el alimento y en el intestino. La sobrevivencia en el alimento es fundamental para que se obtengan los efectos benéficos de los probióticos (Forssten, Sindelar, & Ouwehand, 2011).

Las guías elaboradas por el Comité de expertos en el 2002, han sido propuestas como base de información que se debe reunir y presentar para que los diferentes organismos puedan evaluar las solicitudes de Claims o declaraciones de nutrición y en especial de salud (Pineiro y Stanton, 2007).

5.4. Probióticos y colesterol

Los primeros en realizar observaciones que relacionaban la ingesta de probióticos con efectos hipocolesterolemiantes fueron Mann y Spoerry (1974), quienes al hacer estudios en una tribu Massai, la cual tenía los niveles de lípidos en rangos normales, observaron que estas personas consumían una leche fermentada llegando a concluir que algo en esta leche era la causante de su buen estado de salud.

A partir de este momento nace la inquietud de conocer las bacterias probióticas responsables de la reducción de colesterol, los estudios realizados han utilizado las cepas: *Lactobacilos acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus*, *Enterococcus faecium* y *L. plantarus* (Ros, 2003).

Sin embargo, los estudios realizados entre 1974 – 1998 indicaban que el uso de leches fermentadas no eran la mejor opción como coadyuvantes en hipercolesterolemia, lo anterior debido a que los estudios clínicos realizados arrojaban resultados variables generando conclusiones contrastantes. Estos resultados contradictorios pueden deberse al diseño experimental, al uso de un tamaño de muestra inadecuado y a las variaciones en los niveles basales de lípidos en sangre (Taylor & Williams, 1998; De Roos & Katan, 2000; Pereira & Gibson, 2002b).

Estudios más recientes han generado resultados positivos demostrando de esta manera el uso potencial de alimentos o suplementos probióticos como coadyuvantes en el tratamiento de hipercolesterolemia como se describe en los siguientes apartados: estudios en humanos usando alimentos y utilizando capsulas, con probióticos ya sean liofilizados o en gel, para reducir los niveles de colesterol.

5.4.1. Estudios *in vitro*

Una de las primeras opciones para evaluar la capacidad reductora de colesterol de diversas cepas probióticas es el desarrollo de estudios a nivel *in vitro*, en los que se ha probado, además de la reducción de colesterol, la tolerancia a la acidez, la tolerancia a la bilis y sales biliares, así como la supervivencia del proceso de digestión.

Meei - Yn y Tseng - Wei, (2000) estudiaron las habilidades reductoras de colesterol de 6 diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus* a nivel *in vitro*; encontrando que todas ellas son capaces de reducir el colesterol del medio de cultivo en diferentes porcentajes, sin embargo, la cepa ATCC 4356 fue la que mostró mayor eficacia llegando a reducir del medio los niveles de colesterol entre 57% y 71%, cuando este se encontraba en forma de oxgall (como fuente de bilis conjugada y desconjugada) y de ácido cólico.

Por otro lado, Pereira y Gibson en el 2002a evaluaron la capacidad reductora de diversas cepas probióticas: *Lactobacillus fermentum* cepas F53 y KC5b, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Streptococcus bovis* ATCC 43143,

Enterococcus durans DSM 20633, *Enterococcus gallinarum*, y *Enterococcus faecalis* a nivel *in vitro* en medio enriquecido con colesterol y ácidos biliares; también se evaluó la tolerancia a la bilis y al ácido, encontrándose que la cepa *Lactobacillus fermentum* KC5b, fue la que reportó un mejor eficiencia y por lo tanto muestra un potencial uso como probiótico reductor del colesterol.

Al - Saleh, Metwalli y Abu - Tarboush, (2006) examinaron la tolerancia al ácido, a la bilis y la capacidad de remoción de colesterol de tres cepas de *Lactobacillus acidophilus* (DSM 9126, DSM 20079 y DSM 20242), dos cepas de *Bifidobacterium: infantis* DSM 20088 y *angulatum* DSM 20098) y *Streptococcus thermophilus* DSM 20617, ellos encontraron variaciones entre los diferentes medios de cultivo tanto en su tolerancia al ácido y a bilis, la cepa que mostró una mejor eficiencia de remoción de colesterol fue *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 llegando a remover 66.61 mg de colesterol del medio (95.6%).

En otro estudio se aislaron 6 cepas diferentes de *Lactobacillus* de una crema fermentada, conocida como Jiaoke, se encontró que *Lactobacillus plantarum* KLD S 1.0344 mostró mayor tolerancia a la bilis y mayor potencial de remoción de colesterol del medio, utilizando diferentes mecanismos como la coprecipitación, remoción y asimilación del colesterol por las bacterias probióticas, esto debido a que del 54.08% del colesterol fue removido en el medio, 18.57% fue resolubilizado en el líquido del lavado, 15.69% fue retenido por las células y 19.82% no pudo ser recuperado (Guo, Yang, & Huo, 2011).

5.4.2. Estudios en modelos animales

Es necesario que los beneficios provocados por el consumo de probióticos sea evaluado a nivel *in vivo*, para esto se utilizan organismos modelo como: ratas, ratones, hamsters, cerdos de guinea y cerdos, debido a la similitud que estos poseen con los humanos en la forma en metabolizar el colesterol, la producción de bilis, la distribución de las lipoproteínas en el plasma y la regulación del colesterol hepático por las enzimas (Lay – Gaik & Min – Tze, 2010), los estudios en animales deben corroborar los efectos encontrados a

nivel *in vitro* y sustentar su posterior extrapolación en una intervención con humanos.

Bhathena, Martoni, Kulamarva, Urbanska, Malhorta & Prakash (2009) realizaron un estudio en hámsters inducidos a la hipercolesterolemia a los cuales se les administró la cepa probiótica *Lactobacillus fermentum* 11976, esta suplementación produjo una reducción significativa en suero del colesterol total, colesterol LDL, y de los niveles de triglicéridos en plasma.

Xie, y colaboradores (2011) estudiaron los efectos hipocolesterolémicos de las cepas *Lactobacillus plantarum* 9-41- A y *Lactobacillus fermentum* M1-16 y evaluaron los cambios en el peso corporal, metabolismo de lípidos y microbiota intestinal en ratas con hipercolesterolemia inducida mediante dieta durante un período de 6 semanas; después de ese tiempo las ratas fueron sacrificadas, se realizaron estudios histológicos, en sus órganos y lípidos en plasma encontrando que en aquellas ratas con suplementación con probióticos mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) de colesterol LDL y en los niveles de triglicéridos, así mismo, hubo un descenso significativo en el colesterol hepático, en los niveles de triglicéridos y en el depósito de lípidos, también hubo un incremento significativo en la excreción fecal de colesterol y ácidos biliares, en la microbiota intestinal se observó un incremento en estas cepas probióticas, mientras que otras bacterias como la *Escherenchia coli* decrecieron, estas observaciones sugieren que las bacterias probióticas utilizadas en este estudio tienen un efecto hipocolesterolémico.

La forma de metabolizar el colesterol en animales es muy parecida a la forma en que los humanos lo hacen, lo que nos da un amplio panorama de lo que sucedería en el organismo al administrar estos microorganismos y el efecto positivo, adverso o nulo, que éstas podrían tener en el cuerpo humano, dando respuesta a la pregunta de si es posible trasladar los resultados obtenidos en estudios *in vitro*.

Hay otros estudios que relacionan el uso de microorganismos probióticos y la reducción de colesterol, un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Lee, Kim, Yun, Kim, Oh & Kim (2010) quienes diseñaron un estudio genético y proteómico con *Lactobacillus acidophilus* A4, (donde deletaron el gen *ccpA*, el cual tiene una importante participación en el catabolismo y regulación del carbono, y del metabolismo del nitrógeno) probando a nivel *in vitro*, y comprobando a nivel *in vivo* (utilizando como modelo animal ratas Sprague-Dawley) que aquellas bacterias a las cuales se les habían deletado el gen, disminuían el nivel de colesterol en el medio en menor proporción (sólo un 10%) en comparación con las bacterias parentales, las cuales redujeron el colesterol en un 20%, sugiriendo que este gen está altamente implicado en el o los mecanismos que utiliza *Lactobacillus acidophilus* para disminuir el colesterol del plasma.

5.4.3. Estudios en humanos

Existen en la literatura científica reportes de estudios en humanos, del tipo de intervención, de los cuales se mencionan algunos ejemplos en las siguientes secciones, en los que se ha estudiado la relación que existe entre el consumo de probióticos y el metabolismo del colesterol y otros lípidos séricos, enfocándose sobre todo en el efecto que el consumo de estos microorganismos provoca.

La administración de estos probióticos puede ser de diversas formas: ya sea como componente de un alimento (ej. Bioyogurth, leche fermentada) o como un suplemento alimentario en forma de cápsulas y/o polvos.

5.4.3.1. Estudios en humanos utilizando alimentos

Se han desarrollado diversas intervenciones que incluyen en la dieta de voluntarios una leche fermentada y/o bioyogurth (yogurth que además de ser fermentado con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* posee alguna cepa que se cree le confiere propiedades a la salud) adicionado con alguna cepa probiótica con el fin de estudiar la capacidad reductora de colesterol. Uno de los productos más estudiados, es el bioyogurth comercial

llamado Gaio[®], el cual contiene *Enterococcus faecium* utilizado con la finalidad de reducir el colesterol. El metanálisis realizado por Agerholm-Larsen, Bell, Grunwald, y Astrup, (2000) concluyeron que en estudios a corto tiempo, alrededor de 6 semanas, se reducen los niveles de colesterol en un 4%, así como una reducción del 5% del colesterol LDL. Sin embargo, los investigadores sugieren que para tener resultados más sustanciales es necesario realizar estudios a largo plazo.

En esta misma línea, Anderson y Gilliland (1999) administraron una leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* L1, con un consumo de 200 ml diarios de yogurth durante 3 semanas a un grupo de voluntarios, llegando a encontrar una reducción en el colesterol sérico entre 2.4% y 3.2%, los investigadores sugieren que una adecuada administración de *Lactobacillus acidophilus* L1 puede llegar a reducir el riesgo de desarrollar una ECV entre un 6% y un 10%.

Otros estudios se han enfocado en el probiótico *Lactobacillus acidophilus* utilizando diversas cepas para producir leches fermentadas, así mismo, se han estudiado diversas dosis con el fin de encontrar la más efectiva. Andrade y Borges, (2009) en un estudio doble ciego, placebo controlado y cruzado realizado en mujeres con niveles de colesterol de normal a moderadamente elevado, encontraron que al consumir 125 ml de leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* 145 y *Bifidobacterium longum* BB536, 3 veces al día, durante 4 semanas, se redujeron los niveles de colesterol LDL y HDL de manera significativa en aquellos individuos que presentaban niveles de colesterol sobre 190 mg/dl.

5.4.3.2. Estudios en humanos utilizando cápsulas para reducir los niveles de colesterol

Otro de los métodos de intervención en el que se han enfocado los investigadores, es la administración de las cepas probióticas en forma de cápsulas, llegando a obtener resultados contradictorios. La evidencia sugiere que estas discrepancias recaen en la dosis y el tiempo de aplicación de la

intervención, pero sobre todo en los diferentes efectos que pueden causar cada una de las cepas microbianas por ser diferentes entre sí.

En un estudio con un grupo de 43 voluntarios, divididos en dos grupos (grupo de estudio y grupo placebo) a los cuales se les administró una cápsula que contenía *Enterococcus faecium* M-74 en una cantidad de 2×10^4 UFC/cápsula o un placebo durante 56 semanas, realizándose análisis en sangre a la semana 0, 56 y 60 (4 semanas después de terminado el tratamiento) encontraron una reducción en los niveles sanguíneos de colesterol, sobre todo del colesterol LDL (de 1.96 mmol/L a 1.91 mmol/L), la cual se mantuvo por 4 semanas después de concluido el tratamiento (Hlivak, Odraska, Ferencik, Ebringer, Jahnova & Mikes, 2005).

Resultados similares fueron encontrados por Bosch-Gallego, Espadaler-Mazo, Méndez-Sánchez, Pérez-Carre & Farrán-Codina (2011) en un estudio clínico doble ciego, controlado por placebo y aleatorizado, donde administraron durante un año la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT7315/7316 en un grupo de adultos de la tercera edad con el fin de observar sus efectos sobre el tránsito intestinal y el estado nutricional en general de los sujetos de estudio. Encontraron, entre otras cosas, una disminución significativa en los niveles de colesterol.

Sin embargo, los resultados obtenidos por otros investigadores difieren de los resultados anteriormente presentados, por ejemplo Lewis y Burmeister (2005) quienes no observaron un efecto positivo en los niveles de colesterol en los voluntarios de estudio cuando se administraron *Lactobacillus acidophilus* en una concentración de 3×10^{10} UFC; realizando una intervención cruzada con una duración de 18 semanas de tratamiento (6 semanas de administración de probiótico o placebo, 6 semanas en lavado y otras 6 semanas de administración de probiótico o placebo) en 80 voluntarios con elevados niveles de colesterol, realizándose los análisis al principio y final de cada intervención.

Hatakka, Mutanen, Holma, Saxelin & Korpela (2008) estudiaron las cepas *Lactobacillus rhamnosus* LC705 y *Propionibacterium freudenreichii* spp. *Shermani* JS a una concentración de 2×10^{10} UFC de cada probiótico, en una intervención de 10 semanas, que comprendía 8 semanas de tratamiento, dividido en dos períodos de 4 semanas cada uno y un periodo de lavado de 2 semanas con el fin de disminuir los niveles de lípidos en plasma en 38 hombres aparentemente sanos, al finalizar el tratamiento no encontraron cambios en el colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos entre los sujetos a los que les administró el probiótico comparando con aquellos a los que se les suministró el placebo.

En las intervenciones en humanos son evidentes las discrepancias en los resultados obtenidos por los investigadores, es de destacar los tiempos de intervención y el uso diferentes cepas, lo que sugiere que cada cepa interviene de manera diferente en el metabolismo de los lípidos y del colesterol, generando de esta manera la variedad de resultados obtenidos.

5.5. Mecanismos de acción utilizados por los probióticos para reducir el colesterol

Se han realizado una gran cantidad de estudios en los que se ha demostrado la capacidad reductora de una gran variedad de microorganismos probióticos, sin embargo, hasta el momento no se conoce del todo el mecanismo o mecanismos de acción que estos microorganismos utilizan, por lo que se han desarrollado una serie de investigaciones cuyo objetivo es dilucidar esta incógnita.

A continuación se enlistan los mecanismos propuestos, así como estudios que demuestran tales mecanismos de acción.

5.5.1. Actividad de enzima sal biliar hidrolasa utilizada por probióticos

Las sales biliares son excretadas en el duodeno en forma de compuestos N–acil conjugados con glicina o taurina, tienden a facilitar la función de la emulsificación de los lípidos y ayudan en la absorción de los nutrientes lipídicos, además la excreción de bilis es la principal ruta de eliminación de colesterol que

utiliza el cuerpo, así como una de las principales vías del metabolismo de este compuesto. Cuando las sales biliares conjugadas son hidrolizadas en el intestino, proceso conocido como desconjugación, su solubilidad y capacidad de emulsificación disminuye, lo que ocasiona que las sales biliares desconjugadas sean menos solubles y absorbidas por el intestino que las conjugadas; es sabido que coprecipitan el colesterol a valores de pH menores de 5.5 y lo unen a las células bacterianas y fibra dietética, lo que facilita su excreción en las heces. Aunado a esto, las sales biliares desconjugadas son menos eficientes para formar micelas, por lo que se ha asumido que es la causa de la disminución de la solubilidad del colesterol (Ahn, Kim, Lim, Baek, & Kim, 2003).

La secreción de la enzima sal biliar hidrolasa, por algunas bacterias probióticas incrementa la excreción de bilis en las heces (Begley, Hill & Gahan, 2006) la cual cataliza la hidrolisis de las sales biliares conjugadas con los aminoácidos glicina o taurina a sales biliares libres (Corzo & Gilliland, 1999) al ser el colesterol uno de los principales componentes de la bilis, el aumento de su excreción en las heces, da como resultado una menor cantidad de colesterol disponible para ser absorbido y metabolizado por el cuerpo a su vez que hay una reducción del mismo en el plasma (Segarra-Espinoza, 2006).

Lo anterior sugiere que este es uno de los mecanismos que utilizan los microorganismos para reducir el colesterol, ya que la producción de la enzima sal biliar hidrolasa utilizará el colesterol para producir sales biliares, las cuales son posteriormente excretadas en las heces, además de que se disminuye la solubilidad del colesterol y su posterior absorción en el lumen. Se ha reportado la actividad de la enzima en *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides* (Pereira, McCartney & Gibson, 2003; Begley, Hill, & Gahan, 2006).

Pereira, McCartney & Gibson (2003) evaluaron a nivel *in vitro* la producción de la enzima sal biliar hidrolasa por la bacteria *Lactobacillus fermentum* KC5b y su utilización para la producción de ácidos grasos de cadena corta, reduciendo

de esta forma el colesterol en el medio de cultivo, se utilizó para ello un sistema *in vitro* de 3 fases de cultivo continuo, encontrando un aumento en la producción de acetato, butirato y propionato cuando al sistema se le administraba la cepa en una concentración de 2×10^9 UFC/ml, sugiriendo que el microorganismo puede afectar el metabolismo del colesterol, ya sea utilizándolo para la producción de ácidos biliares o reduciendo la solubilidad del colesterol y por ende la absorción del mismo.

Liong & Shah (2005a) examinaron la habilidad de cepas de lactobacilos de desconjugar sales biliares, la actividad de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH) y la habilidad de remover colesterol mediante su coprecipitación con bilis desconjugadas con el fin de seleccionar cepas con propiedades de reducción del colesterol. Las cepas estudiadas fueron 11; 7 *Lactobacillus casei*: CSCC 2607, ASCC 1520, ASCC 1521, ASCC 279, ASCC 290, ASCC 292 y ATCC 15820; y 4 cepas de *Lactobacillus acidophilus*: ATCC 33200, ATCC 4356, ATCC 5357 y ATCC 4962; encontrando que se libera más ácido cólico (medición indirecta de desconjugación de ácidos biliares conjugados) a partir de ácido glicocólico que de ácido taurocólico, también reportaron que las cepas de *L. acidophilus* tienen una mayor capacidad desconjugante que las cepas de *L. casei*. Se observó el mismo comportamiento al medir la actividad de SBH, encontrando una mayor especificidad al sustrato cuando éste era glicina en lugar de taurina, en cuanto a la coprecipitación de colesterol, aun y cuando se observó coprecipitación con ambas sales biliares, ésta fue mayor en presencia de glicocolato de sodio. Las cepas *L. acidophilus* ATCC 33200, 4356 y 4962, y la cepa *L. casei* ASCC 1521 mostraron mayor habilidad de desconjugación y actividad de SBH cuando la mezcla de bilis era similar a la humana, por lo que estas cepas son candidatos promisorios para hacer pruebas *in vivo*.

Sridevi, Vishwe & Prabhune (2009) aislaron la enzima sal biliar hidrolasa de *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005 para después inmovilizarla en goma gel gellam al 0.5%. Posteriormente esta enzima inmovilizada fue dosificada a ratas Wistar a las cuales se les indujo a hipercolesterolemia, las dosis fueron de 10

UI/kg de la enzima inmovilizada encontrando una reducción de 50% de colesterol y 15% de triglicéridos en el plasma sanguíneo. Cuando las dosis se aumentaron a 20 UI/ kg la reducción de colesterol fue de 58% y de triglicéridos de 45%.

5.5.2. Consumo de colesterol por bacterias intestinales

En tiempos recientes se ha considerado que algunos polisacáridos exocelulares producidos por bacterias lácticas podrían actuar como prebióticos, emulando las acciones que éstos generan en el intestino, como el aumento de la eliminación de las sales biliares en las heces, con la consecuencia de la reducción de los niveles de colesterol sérico (Reyes-Gavilán, Abelardo, Ruas-Madiedo, Noriega, Sánchez, & Cuevas, 2004).

Pigeon, Cuesta & Gililliand (2002), estudiaron diferentes cepas de *Streptococcus termophilus* (St-143, St-OSU1, St-OSU2, St-OSU3) y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Bulgaricus* (Lb-18, Lb-10442, Lb-OSU4 y Lb-OSU5) que producen exopolisacáridos exocelulares, los cuales tienen la habilidad de unir ácidos biliares *in vitro* mediante la unión de éstos a la superficie de la membrana debido a la formación de polisacáridos exocelulares, utilizando como fundamento los resultados obtenidos por Nakajima, Susuki, Kaizu, & Hirota (1992) quienes mostraron en un grupo de ratas, utilizadas como organismos modelos, una reducción significativa de los niveles de colesterol en el grupo que consumió una leche fermentada con bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos exocelulares en comparación con aquellas que consumieron leche fermentada con cepas no productoras de estos azúcares. Se sabe que los exopolisacáridos le confieren a los productos fermentados ciertas características organolépticas de un gel mucilaginoso, que en algunos productos es deseable, como en leches fermentadas y yogures, también se ha relacionado a estos exopolisacáridos con efectos a la salud como antitumorales, actividad inmunoestimuladora y disminución del colesterol (Aznar, Dueñas, Jiménez, López, & Ruas-Madiedo, 2012).

Pereira & Gibson (2002a) evaluaron el efecto de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias sobre los niveles de colesterol en un estudio *in vitro*, estudiándose 7 cepas: *Lactobacillus fermentum* F53, *Lactobacillus fermentum* KC5b, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Streptococcus bovis* ATCC 43143, *Enterococcus durans* DSM 20633, *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus faecalis*; siendo la cepa *L.fermentum* KCb5 (aislada de heces humanas) capaz de asimilar un máximo de 14.8 mg de colesterol/g de peso seco de células del medio de cultivo, por lo que se considera a esta cepa como un probiótico potencial.

Ahire y colaboradores (2012) observaron en un estudio *in vitro*, que *Lactobacillus helveticus* era capaz de asimilar el 100% del colesterol de un medio MRS con una concentración de colesterol 3 mM después de 42 horas de incubación a 37°C, también observaron que las UFC del probiótico incrementaron a través del tiempo de incubación.

5.5.3. Unión del colesterol a la superficie celular

Cueto y Aragón (2012) aislaron 53 cepas a partir de nueve muestras de suero proveniente de matrices lácteas de productos autóctonos colombianos, probando el potencial probiótico de las bacterias por su sobrevivencia al ácido y la bilis en estudios *in vitro*, de las 53 aisladas se seleccionaron 5 microorganismos y se identificaron molecularmente, como *Lactobacillus fermentum*. Además evaluaron la capacidad de adsorber el colesterol de estas bacterias por el método de Kimoto, observando una disminución de 53.06 ± 2.69 µg/ml para la cepa K73 y 7.23 ± 2.69 µg/ml para la cepa K75. Después de estas observaciones concluyeron que la cepa con mayor potencial probiótico fue K73.

5.5.4. Incorporación del colesterol a la membrana celular

Alrededor del 70% del colesterol circulante se encuentra en forma de esteroides de colesterol, en los que el colesterol se encuentra esterificado con un ácido graso de cadena larga, generalmente linoleico. Esta esterificación aumenta la hidrofobicidad del colesterol (Universidad de Buenos Aires, 2010).

Noh, Kim, & Gilliland (1997) estudiaron la asimilación del colesterol de la cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, encontrando que este colesterol no era degradado metabólicamente, ya que la mayoría de éste fue recuperado con las células en las fracciones membranales de éstas, además se encontró que las células que unían colesterol a la membrana eran más resistentes a la lisis por sonicación, lo que sugiere una alteración a la pared celular debida a la incorporación del colesterol a ésta.

Lye, Rahmat-Ali & Liong (2010) estudiaron la habilidad de remover colesterol de 5 cepas de lactobacilos: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *L. acidophilus* FTCC 0291, *Lactobacillus bulgaricus* FTCC 0411, *L. bulgaricus* FTDC 1311 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 por diversos mecanismos; entre ellos la incorporación del colesterol a la membrana celular. Para esto se realizaron observaciones de las células mediante microscopia de barrido (SEM) para observar si fueron o no capaces de unir colesterol a la membrana, encontrando que la unión se debe a un fenómeno físico efectuado por las propiedades físicas y estructurales de los peptidoglicanos de la pared celular, los cuales poseen aminoácidos capaces de unir colesterol y de esta forma inhibir la absorción intestinal del mismo, encontrando que todas la cepas estudiadas tienen esta capacidad, y que el colesterol se adhiere a las células tras la fermentación, lo que hace suponer que la unión del colesterol es dependiente del crecimiento.

5.5.5. Conversión de colesterol a coprostanol

El colesterol a nivel del intestino puede ser absorbido o transformado en una serie de metabolitos microbianos, siendo el coprostanol el más abundante de todos (Macdonald, Bokkenheuser, Winter, McLernon, & Mosbach, 1983).

Lye, Rusul,& Liong (2010) analizaron la capacidad de reducción del colesterol por diferentes lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *L. acidophilus* FTCC 0291, *Lactobacillus bulgaricus* FTCC 0411, *L. bulgaricus* FTDC 1311 y *Lactobacillus casei* ATCC 393) mediante la conversión de éste a coprostanol, en presencia de sales biliares (oxgall, ácido cólico y ácido

taurocólico) se observó mayor concentración de coprostanol en el medio que contenía oxgall, siendo más predominante en *L. bulgaricus* FTDC 1311, mientras que la menor concentración fue observada en el medio que contenía ácido cólico comparado con las otras sales biliares estudiadas.

Benno, Midtvedt, Alam, Collinder, Norin & Midtvedt (2005) reclutaron a 633 personas entre hombres y mujeres a los cuales se les determinó las concentraciones de colesterol y coprostanol excretado en heces, expresando los resultados como el porcentaje de coprostanol en la cantidad total de colesterol y coprostanol presente, encontrando que entre mayores eran los pacientes (>50 años) mayor era su tasa de conversión a coprostanol (>40%). También encontraron que había un mayor porcentaje de mujeres (M) altamente convertidoras en comparación de los hombres (H) sobre todo en los grupos <36 años (76%M vs. 62%H) y en el grupo de 36 a 50 años (70%M vs. 60%H).

5.5.6. Inhibición de la formación de micelas

Las saponinas procedentes de plantas forman complejos insolubles con esteroides, entre ellos el colesterol y ácidos biliares, esto se debe a que la parte hidrofóbica de la saponina se asocia con la porción hidrofóbica del núcleo del esteroide mediante una unión lipofílica en una asociación micelar apilada. Las saponinas se unen al colesterol en la bilis del intestino previniendo su reabsorción, al afectar la permeabilidad de las células intestinales por la formación de estos complejos y ser las saponinas anfipáticas es de esperarse que influyan en la emulsificación y formación de sustancias solubles en grasa, incluyendo la formación de micelas (Cheeke, 2000).

Susuki, Kaizo y Yamauchi (1991), estimaron las concentraciones de colesterol en suero cada 12 días en ratas que habían sido alimentadas con una dieta alta en colesterol que además contenía una leche descremada o leche fermentada con diversas bacterias, encontrando que las leches fermentadas tenían la habilidad de inhibir el colesterol y que esta habilidad dependía de la cepa más que de la especie del microorganismo. Observaron que la cepa utilizada, *L. acidophilus* SBT 2056, era la más eficiente, y presentó un

incremento en la concentraciones de esteroides en bilis y en heces, también se incrementó la actividad de la enzima 7 α -hidrolasa en el hígado, además se observó un efecto inhibitorio contra la absorción en las micelas a nivel de intestino.

En 1996 Fukushima y Nakano estudiaron el efecto de una mezcla probiótica (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces* y *Candida*) y lo compararon con los efectos de *L. acidophilus* o *S. faecalis*, los cuales fueron administrados a un grupo de ratas, encontrando que el grupo que fue alimentado con la mezcla de microorganismos tenía una mayor concentración de colesterol excretado en heces, también encontraron que en este grupo la formación de micelas fue significativamente más baja (aproximadamente 9%, $p < 0.05$), lo cual indica que la mezcla de microorganismos al ser parte de la dieta disminuye la síntesis de colesterol en el hígado e incrementa la excreción de esteroides del intestino, lo cual le otorga un rol hipocolesterolémico a esta mezcla.

5.5.7. Fermentación selectiva de ciertos alimentos por la microbiota intestinal

La fermentación selectiva de ciertos alimentos por las microbiota intestinal da como resultado la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y por consiguiente la reducción de los niveles de colesterol en el plasma (Trautwein, Rieckhoff, & Erbersdobler, 1998).

La formación de AGCC es un evento importante, ya que favorece el desarrollo de microorganismos benéficos, así como de las células epiteliales del colon. La microbiota del colon fermenta material orgánico que no puede ser digerido de otro modo por el huésped en el intestino superior, siendo los principales productos acetato, propionato y butirato, aunque también se pueden producir lactato, succinato y etanol. El acetato es el principal AGCC producido en el colon, el cual es usado para la lipogénesis una vez que entra en la circulación sistemática, además de que es el principal sustrato para la síntesis de colesterol, por otro lado se ha reportado que el propionato inhibe la síntesis

de colesterol en tejido hepático, siendo relevante la proporción propionato:acetato en el colon, ya que ésta reduce la síntesis de colesterol procedente de la vía de acetato (Huazano-García & López, 2013).

Farooq, Mohsin, Liu, y Zhang (2013) estudiaron el efecto sobre la producción de AGCC de las diferentes fracciones de fibra dietética de dos variedades de mijo (mijo perla -*Pennisetum glaucum* y mijo - *Setaria italica*) al ser fermentadas por bacterias probióticas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidus*) encontrando que la fracción de fibra dietética total es la más adecuada para la producción de AGCC y que la producción de éstos sigue el siguiente patrón: acetato > propionato > butirato.

Por todo lo anterior es importante analizar si las cepas de probióticos que encontramos en los alimentos que se comercializan poseen la capacidad de reducir el colesterol, así como los mecanismos que utilizan para este fin, para que en un futuro se desarrollen alimentos funcionales que junto con una dieta y tratamiento adecuado coadyuven al manejo de la hipercolesterolemia, ampliando de esta forma las opciones de los pacientes para los cuidados de este padecimiento.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño

6.1.1. Tipo de estudio

Experimental transversal.

6.2. Esquema general de análisis.

En la figura 1 se presenta el esquema que se siguió para el logro de los objetivos del presente trabajo.

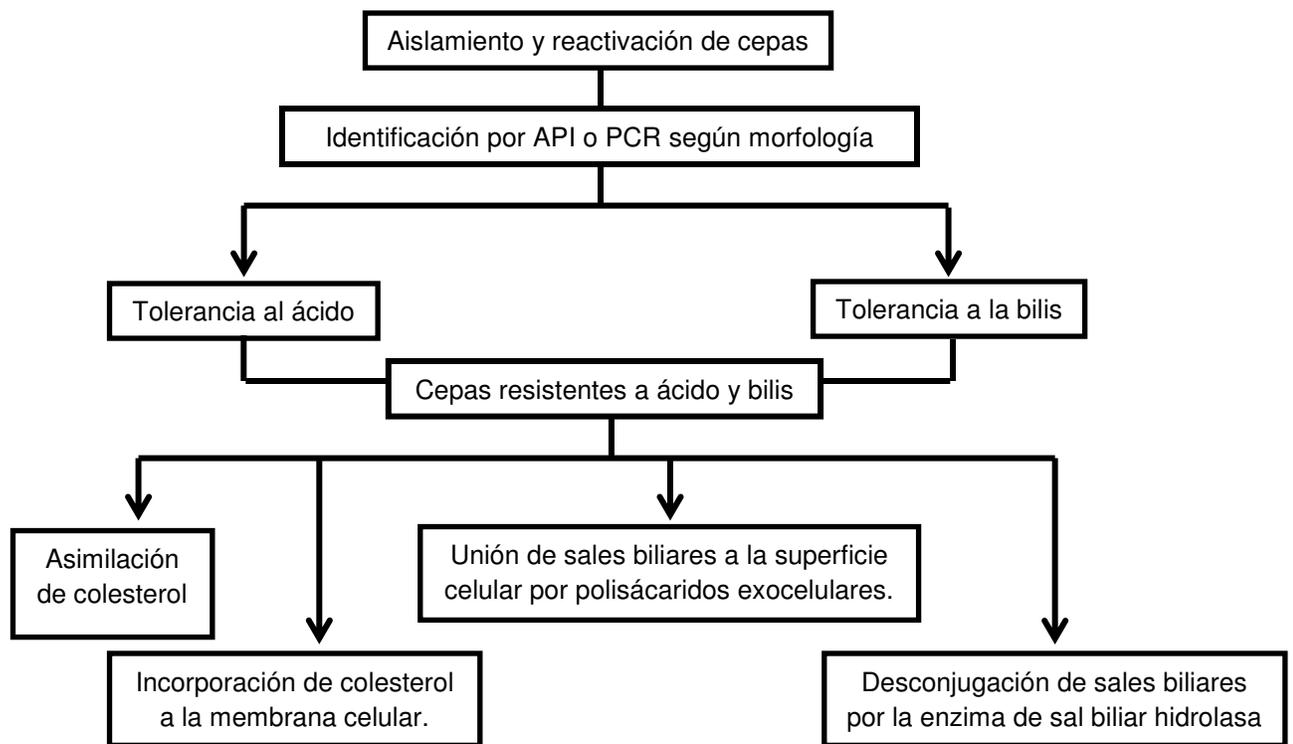


Figura 1. Esquema general de análisis.

6.3. Material biológico

Para esta investigación se utilizaron microorganismos aislados e diferentes alimentos, como bioyogurth (yogurth que además de ser fermentado con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* posee alguna cepa que se cree le confiere propiedades a la salud), leches fermentadas, leches maternizadas y cereales de desayuno en cuyas etiquetas se declaraba el uso de estos microorganismos probióticos en su formulación, los cuales se

describen en la Tabla 1, el aislamiento se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por González-Martínez, Jiménez-Salas & Gómez-Treviño (2006).

Tabla 1. Productos alimenticios con probióticos.

Producto	Origen	Cepa declarada por el fabricante
A	Bioyogurth	<i>Bifidobacterium Lactis</i>
B	Leche maternizada	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
C	Cereal	<i>Bacillus coagulans</i>
D	Bioyogurth	<i>Lactobacillus casei</i>
E	Bioyogurth	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
F	Leche maternizada	<i>Lactobacillus reuteri</i>
G	Leche fermentada	<i>Lactobacillus casei shirota</i>
H	Bioyogurth	Bifidobacterias.

Las cepas de referencia se obtuvieron de la colección de cepas del Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales se encontraban criogenizadas en glicerol y almacenadas a -20°C, o bien, liofilizadas y mantenidas a 4°C, estas fueron reactivadas en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (BD[®]) incubadas a 37°C / 24 horas en condiciones de anaerobiosis. En la tabla 2 se muestran las cepas de referencia reactivadas y que fueron utilizadas para esta investigación.

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas y su codificación

Código	Cepa de referencia	ATCC
10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	ND
11	<i>Lactobacillus brevis</i>	367
12	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	LB 30
13	<i>Lactococcus sp.</i>	7963
14	<i>Bacillus coagulans</i>	7050
15	<i>Bifidobacterium longum</i>	15707
16	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	15703
17	<i>Bifidobacterium lactis.</i>	*DSM 10140

ND = No Declarado, * Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Germany)

6.4. Aislamiento de microorganismos probióticos

Para aislar las cepas probióticas de los productos se realizaron diluciones decimales de los alimentos como lo establece la NOM-110-SSA1-1994, se realizaron siembras en vertido en placa mediante en agar MRS en buffer de fosfatos 0.3 mM, pH 7.2 (Secretaria de Salud, 1994). Las cajas Petri fueron incubadas a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis con Gas Pak System (BD®). Después de este tiempo se procedió a resembrar las colonias que presentaron diferente morfología en cajas con agar MRS por la técnica de estriado en 3 campos incubando en iguales condiciones.

6.4.1. Gram y morfología bacteriana

A las cepas aisladas de alimentos y cultivadas en caldo MRS se les realizó una tinción de Gram para diferenciar su morfología bacteriana (bacilos, cocos, bifidobacterias) de los cultivos obtenidos. Las cepas aisladas se resembraron en caldo MRS para la obtención de cultivo puro incubando en las condiciones ya descritas.

En el caso de las cepas de referencia, se reactivaron de forma similar a la metodología antes mencionada en la que se empleó caldo MRS, posteriormente se realizó una tinción de Gram y se corroboró su morfología celular.

6.4.2. Identificación de probióticos aislados

Identificación bioquímica (API®/CH50). Aquellas cepas que presentaron morfología bacteriana de bacilos y cocos se procedió a su identificación mediante pruebas de fermentación de carbohidratos, API®CH50 (Biomerux, France).

Las colonias se depositaron en medio CHL hasta alcanzar una turbidez similar a McFarland 3, el medio se agitó para homogenizar y se colocó en los pocillos de la galería CH50 hasta el borde, está se colocó en el porta galería previo acondicionamiento y etiquetado de la misma, la galería se incubó en condiciones de anaerobiosis en Gas Pak System (BD®) a 37°C por 24 – 48 horas, al concluir el tiempo de incubación los resultados de las fermentaciones de azúcares se utilizaron para identificar los microorganismos mediante el uso del software de API Biomerux, France.

6.4.3. Identificación por métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa - PCR)

A las cepas que presentaron morfología bacteriana de Bifidobacterias o las cepas obtenidas de los productos en cuya etiqueta se declaraba el uso de esta variedad de probiótico se procedió a su identificación mediante la técnica de PCR. Como se describe a continuación:

A partir del cultivo puro de las cepas de interés en caldo MRS se procedió a la extracción del DNA genómico por el método de DNAzol® (Xu & Blakesley, 1996).

Con las secuencias de oligonucleótidos (primers) utilizados, previamente reportados por Ventura, Reinero y Zink (2001) se realizó la comprobación para DNA de eubacterias, posteriormente se comprobó si pertenecían al género *Bifidobacterium*, aquellas cepas que dieron positivo al género *Bifidobacterium*, se analizaron para ver si pertenecían a la cepa de *B. animalis* sub. *lactis*.

La especificidad de los oligonucléotidos se corroboró utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST), los cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas

Bacteria	Oligo	Secuencia	Locación
Eubacteria	P0	F GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	6–28 (16S rRNA)
	338F	R GCTGCCTCCCGTAGGAGT	321–338 (16S rRNA)
Género	P0	F GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	6–28 (16S rRNA)
Bifidobacterium	LM3	R CGGGTGCTNCCCACTTTCATG	1412–1432 (16S rRNA)
B. lactis	Bflac2	F GTGGAGACACGGTTTCCC	991–1009 (16S rRNA)
	Bflac5	R CACACCACACAATCCAATAC	1651–1671 (16S-23S spacer region)
Bacillus	BACO186	F GCATGGAGGAAAAAGGAA	16S rRNA
coagulans	BACO447	R CCCGGCAACAGAGTTTTA	16S rRNA

Fuente: Ventura, Reiner & Zink, 2001; Hidaka, Horie, Akao, & Tsuno, 2010

Se realizaron las reacciones de PCR en volúmenes de 25 µl, conteniendo una mezcla de DNA, dNTP's, y Taq polimerasa (utilizando 25 pmoles de cada primer, 200 µM de la mezcla de cada uno de los 4 dNTP's, 1.5 µM de MgCl₂, 1X de amortiguador 10X [compuesto de 200mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl], 2.5 unidades de la enzima Taq-DNA polimerasa, 10-200 ng de DNA templado y 8.5 µl de agua) las condiciones del termociclador (Axygen modelo Maxigen) fueron un ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos y el último ciclo a 72°C por 7 minutos y manteniendo la temperatura a 4°C en forma constante. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE1X, aplicando un voltaje de 20 Volts por 5 minutos y 80 Volts por 4 minutos utilizando una cámara de electroforesis y un marcador de pares de bases Hyperladder II (Bioline™) como referencia, como controles positivos y negativos para la PCR, se utilizaron DNA de cepas de referencia de los mismos gene y/o especies y agua respectivamente. Los geles obtenidos se analizaron en el

sistema de fotodocumentación (Transiluminador UVP Gel Doc-It™ Imaging System).

También se analizó por métodos moleculares la presencia de *Bacillus coagulans* en el producto C, utilizándose la metodología descrita por Hidaka, Horie, Akao & Tsuno (2010). Para la amplificación se utilizaron los primers que corresponden a un segmento del gen para el RNAr 16S, los cuales fueron corroborados en el programa Gene Bank y Blast (www.ncbi.nih.gov/genbank y www.ncbi.nih.gov/BLAST).

Para la extracción de DNA se utilizó el método de DNAzol® mencionado anteriormente y las condiciones de PCR fueron iguales que las de bifidobacterias ya descritas. Las condiciones del termociclador (Axygen modelo Maxigen-Gradient) fueron un ciclo a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos a 94°C por 20 segundos, 48°C por 20 segundos, 72°C por 40 segundos y el último ciclo a 72°C por 5 minutos y manteniendo la temperatura a 4°C en forma constante. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE1X, aplicando un voltaje de 20 Volts por 5 minutos y 80 Volts por 4 minutos utilizando una cámara de electroforesis y un marcador de pares de bases Hyperladder IV (Bioline™) como referencia, así como controles positivos y negativos para la PCR, utilizando para ello DNA de la cepa de referencia y agua respectivamente. Los geles obtenidos se analizaron en el sistema de fotodocumentación (Transiluminador UVP Gel Doc-It™ Imaging System).

6.5. Tolerancia al ácido

Para probar la sobrevivencia de las cepas probióticas al pH ácido similar al que se presenta en estómago se evaluó la tolerancia al ácido de las cepas tanto aisladas de alimentos como de referencia.

Para la prueba de tolerancia al ácido se siguió la metodología propuesta por Pereira y Gibson (2002a) con algunas modificaciones las cuales se describen a continuación:

En un cultivo fresco con la cepa de interés fue sembrado en caldo MRS, incubado toda la noche a 37°C en condiciones de anaerobiosis mediante el sistema Gas Pak (BD[®]), posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 24°C, el pellet se resuspende con caldo MRS y se le ajustó el pH a 2 utilizando HCl concentrado, posteriormente se incubó a 37°C durante 2 horas en condiciones anaeróbicas (con aceite mineral estéril al tubo de ensaye); durante el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 1 ml a los 0, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, de esta alícuota se realizaron diluciones en series de 10 en buffer de fosfatos, y se sembró por vertido en placa con agar MRS y se incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis con el sistema Gas Pak (BD[®]), cuantificándose las UFC que sobrevivieron a las condiciones de acidez en los diferentes tiempos.

6.6. Tolerancia a la bilis

Es necesario evaluar la sobrevivencia de las cepas a las condiciones del intestino para que estas lleguen viables para colonizar el colón, lo cual se puede estimar al probar la tolerancia a la bilis de los diferentes microorganismos con los que se trabajó.

Para esta prueba se siguió la metodología descrita por Liong y Shah (2005a) con algunas modificaciones que a continuación se describen, se prepararon tres caldos MRS conteniendo oxgall o ácido cólico o ácido taurocólico en concentraciones de 0.30% p/v de sales biliares, estos caldos se inocularon con la cepa de interés y se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis, utilizando para ello sobres BD[®] y el sistema Gas Pak (BD[®]); además se usó como control caldo MRS sin sal biliar.

Cada hora se tomó una alícuota de 1 ml y se midió la absorbancia a 620nm durante 8 horas, así mismo se realizó una siembra por vertido en placa con agar MRS al inicio y final de la prueba para obtener la sobrevivencia de la cepa analizada en las distintas fuentes de sales biliares, las cajas se incubaron a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis, con sobres y el sistema Gas Pak (BD[®]).

6.7. Asimilación y ensayo de colesterol

Para probar la capacidad de asimilar el colesterol de las diferentes cepas elegidas en base a su tolerancia al ácido y bilis se siguió la metodología propuesta por Liong y Shah (2005a), con algunas modificaciones que a continuación se detallan:

En tubos con 10 ml de caldo MRS a los cuales se le adicionó con 0.2% o 0.4%p/v de oxgall mas una solución colesterol hasta alcanzar una concentración de 100mg/L se inocularon con la cepa de interés y se incubaron a 37°C por 12 horas en condiciones anaeróbicas (con aceite mineral estéril). Durante el tiempo de incubación, cada hora se tomó una alícuota y se midió su densidad óptica a 650nm (se utilizó como control un tubo con medio estéril sin inóculo).

Pasadas las 12 horas se removieron las células bacterianas por centrifugación (5000 rpm por 10 minutos a 4°C), se separó el sobrenadante midiendo el volumen de líquido removido, llevándose las células a peso constante en el horno a 80°C.

Posteriormente se realizó el ensayo de colesterol, para ello se resuspendieron las células secas con agua destilada en igual volumen del sobrenadante removido, se tomó una alícuota de 0.5ml, se agregó 3 ml de etanol al 95%, se mezcló, se agregaron 2 ml de KOH al 50%, y se mezcló nuevamente. Se calentó a 60°C en baño maría por 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente (TA). Después de este tiempo se agregaron 5 ml de hexano y mezcló con vortex por 20 segundos, realizándose 5 repeticiones, se agregaron 3 ml de agua destilada y se repitió el mezclado con vortex. La mezcla se dejó reposar por 15 min a TA para permitir el separado de fases y se transfirieron 2.5 ml de la capa de hexano a un tubo limpio el cual se dejó evaporar a 60°C en el horno de convección. Después de haberse evaporado el hexano se agregaron 4 ml de reactivo de Orto-ftalaldehído (0.5 mg de o-ftalaldehído /ml de ácido acético glacial) y se dejó reposar 10 minutos a TA; con ayuda de una pipeta se agregó lentamente 2 ml de H₂SO₄ concentrado dentro

del tubo, se mezcló con vortex como se describió anteriormente y se dejó reposar a TA por 10 minutos; se tomó la densidad óptica a 550nm.

La curva de calibración se realizó siguiendo este mismo procedimiento en concentraciones conocidas de una solución de colesterol.

6.8. Determinación de polisacáridos exocelulares (EPS)

Para este apartado se siguió la metodología propuesta por Pigeon, Cuesta & Gilliland (2002) que consiste en los siguientes puntos:

6.8.1. Mantenimiento de cultivos

Para comprobar la tolerancia de los microorganismos a las condiciones del medio se subcultivarán las cepas de interés inoculando al 1% un tubo con caldo MRSL (el caldo MRSL se prepara por ingrediente, en el cual la dextrosa se sustituye por lactosa en una concentración del 4% y se incubó a 37°C por 18 horas en condiciones de anaerobiosis, utilizando para ello es sistema Gas pak (BD[®]).

Después del tiempo de incubación se subcultivo la cepa en leche NDM (no fat dry milk) 10% p/v. Para ello se reconstituyó leche descremada en polvo (NDM) con agua desionizada, logrando una solución de 10% p/v la cual se pasteurizó a 80°C por 30 minutos e inmediatamente se llevó a refrigeración a 7°C, esta leche se preparó y uso el mismo día.

6.8.2. Producción y medición de polisacáridos exocelulares (EPS)

Se Inoculó con la cepa de interés 10 ml de leche NDM y se incubó a 45°C por 8 horas, posteriormente se tomó una alícuota de 5.5 ml y se agregaron 1.1 ml de citrato de sodio al 20% p/v para solubilizar las proteínas de leche y se agregaron 4 ml de agua desionizada para alcanzar una concentración final de citrato de sodio del 2% v/v, posteriormente se recolectaron las células por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos a 3°C, se lavó el pellet con 11 ml de agua desionizada fría y se repitió la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5.5 ml de agua desionizada fría. Finalmente se determinó el contenido de azúcares totales por el método de antrona.

También se realizó una cuenta en placa para comparar el crecimiento entre cepas en la leche fermentada, realizando diluciones seriadas, como se describió anteriormente, utilizando agar MRSL, el cual fue preparado por ingrediente sustituyendo la glucosa por 4% p/v de lactosa.

6.8.2.1. Determinación de azúcares totales por el método antrona

La metodología seguida en este apartado fue descrita por Rodríguez-Arzave (1987) con pequeñas modificaciones que a continuación se detalla:

Se tomó una alícuota de 2 ml de suspensión celular de interés (o tubos para la curva de calibración), los tubos se mantuvieron en baño de hielo durante 10 minutos se agregaron 4 ml de solución de antrona (0.2% de antrona en H₂SO₄ concentrado) y nuevamente se llevó a baño de hielo durante 5 minutos, después de este tiempo se mezcló con vortex y se llevó a baño de hielo, una vez mezcladas las muestras se calentaron 5 minutos en baño de agua a 100°C y se dejaron enfriar (puede ser en un baño de hielo para mayor rapidez), posteriormente se midió la absorción a 540 nm.

6.8.3. Medición de la adhesión de los ácidos biliares

Se siguió la metodología propuesta por Pigeon, Cuesta & Gilliland (2002) con algunas modificaciones. La cepa de interés (1% v/v de suspensión) se inoculó en un frasco con 75 ml de caldo MRSL y se incubó a 45°C por 8 horas en condiciones de anaerobiosis en un sistema Gas pak (BD[®]).

Después del tiempo de incubación se dividieron los 75 ml en dos frascos en alícuotas de 22.5 ml (el frasco debe de ser de al menos 50 ml); en uno se agregó 2.5 ml de una solución de ácido cólico 15 mM para alcanzar una concentración final de ácido biliar de 1.5 mM y a otro se le agregó una concentración igual de ácido taurocólico.

Los tubos se mantuvieron en agitación (200 rpm) por 2 horas a 37°C para permitir el contacto de las células con las sales biliares, después del tiempo de incubación se ajustó el pH a 7 utilizando para ello una solución de NaOH 10N, se centrifugaron los tubos a 5000 rpm durante 10 minutos a 3°C, se

tomó una alícuota de 15 ml del sobrenadante y ajustó su pH a 1.0 utilizando HCl 10 N; posteriormente se ajustó el volumen a 24 ml utilizando agua desionizada, se tomó una alícuota de 3 ml y se agregaron 9 ml de etil – acetato, se mezcló con vortex durante 2 minutos y se dejó reposar a TA para la separación de fases. Después se transfirió una alícuota de 3 ml de la capa de etil – acetato a un tubo nuevo y se evaporó a 60°C en el horno de convección, se agregó 1 ml de NaOH 0.01 N para disolver el residuo y se mezcló con vortex con agitación suave. Se agregaron 6 ml de H₂SO₄ 16 N e inmediatamente se añadió 1 ml de furfuraldehído al 1% y se mezcló con vortex durante 1 minuto. Los tubos se sometieron a calentamiento a 65°C por 13 minutos en baño de agua, pasado este tiempo las muestras se dejaron enfriar a TA, después se agregaron 5 ml de ácido acético glacial y se midió su absorbancia a 660 nm.

Se realizó este mismo procedimiento para un blanco, el cual consistió en un tubo sin inocular; además de que también se realizó una curva de calibración con ácido cítrico. También en una poción del cultivo inicial se midió el contenido de EPS por el método de fenol – sulfúrico.

6.8.3.1. Determinación de azúcares totales por el método fenol – sulfúrico

Para estas determinaciones se siguió la metodología propuesta por Dubois, Gilles, Hamillton, Rebers & Smith (1956) con modificaciones que describen a continuación.

Se preparó una curva de calibración con glucosa como estándar en un rango de 0 – 100 µg/ml. En un tubo se agregaron 2 ml de la muestra y 0.05 ml de la solución de fenol 80%, después se agregaron 5 ml de H₂SO₄ concentrado se homogenizó la muestra con vortex con agitación suave y se dejó en reposo por 10 minutos; se agitó nuevamente con vortex. Posteriormente las muestras se calentaron en agua a baño maría 28° C por 15 minutos, se dejaron enfriar a TA y se midió la absorbancia a 480 nm para pentosas y 490nm para hexosas.

6.9. Composición de ácidos grasos de la membrana celular

Para esta determinación se siguió la metodología propuesta por Lye, Rusul & Liong (2010) con pequeñas adecuaciones. En tubos de caldo MRS –

LC (caldo MRS al cual se le adicionó 0.15% de L – cisteína), 0.3% p/v de sal biliar (ácido cólico, ácido taurocólico u oxgall), 0.1% p/v de pancreatina y colesterol (100 µg/ml) fueron inoculados con las cepas de interés, se ajustó a pH de 8 y se incubaron por 20 horas a 37° C en condiciones de anaerobiosis, utilizando el sistema Gas pak (BD®). También se utilizó como control un tubo sin colesterol. En la tabla 4 se describen los diferentes medios de cultivo, así como sus componente, los cuales fueron seleccionados para trabajar en esta fase de la investigación.

Tabla 4. Medios de cultivo seleccionados y sus componentes

Medio	Componentes
1	MRS + 0.15% p/v de L- cisteína + 0.1% p/v de Pancreatina
2	MRS + 0.15% p/v de L-cisteína + 0.1% de Pancreatina + 100µg/ml de colesterol
3	MRS + 0.15% p/v de L-cisteína + 0.1% de Pancreatina + 100µg/ml de colesterol + 0.3% p/v de Oxgall
4	MRS + 0.15% p/v de L-cisteína + 0.1% de Pancreatina + 100µg/ml de colesterol + 0.3% p/v de ácido taurocólico
5	MRS + 0.15% p/v de L-cisteína + 0.1% de Pancreatina + 100µg/ml de colesterol + 0.3% p/v de ácido cólico

Después del tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. Del pellet celular se extrajeron los lípidos por el método modificado de Bligh & Dyer (1959) en el que se resuspendió el pellet celular con 1 ml de solución de metanol:cloroformo (2:1), se mezcló con vortex a TA por 2 minutos y se mantuvieron a 4°C durante 24 horas, pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue separado y el pellet se lavó con 1 ml de una mezcla de metanol:cloroformo:agua (2:1:0.8) y se volvió a centrifugar; este proceso se repitió dos veces. Posteriormente se agregó 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, la fase de cloroformo fue recolectada con ayuda de una pipeta y se dejó evaporar a 60°C en un baño de agua, el residuo lipídico se disolvió con 250 µl de hexano, se mezcla con vortex.

La conversión a esteres metílicos de ácidos grasos se realizó con la técnica descrita por Fernández-Murga, Cabrera, Font de Valdez, Disalvo & Seldes (2000), en que al residuo lipídico y disuelto con hexano de la fase anterior se le adicionó 100 μ L de KOH 2 M metanólico, se mezcló la solución, se adicionaron 5 gotas de indicador naranja de metilo, se mezcló y se agrega gota a gota HCl 2 M hasta que el indicador viró a rosa. Se dejó reposar la mezcla y la fase orgánica se inyectó en el cromatógrafo de gases como se describe a en el siguiente apartado.

6.9.1. Determinación de ácidos grasos de la membrana celular por cromatografía de gases

Después de la extracción de los lípidos y la conversión a esteres metílicos de ácidos grasos, estos se cuantificaron por cromatografía de gases, se utilizó un cromatógrafo (Thermo – Scientific, TraceTMGC Ultra) equipado con una columna capilar (50 m x 0.53 mm de diámetro interno x 0.70 mm de diámetro exterior). La temperatura del horno se mantuvo a 100°C hasta la inyección de la muestra (1 μ l) y se incrementó a 225°C en un rango de 5°C por minuto. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 260°C a 280°C respectivamente, se utilizó gas helio como acarreador (3 ml/minuto) con un radio de Split de 1:100, y el volumen de inyección de 1 μ l. La concentración de esteres metílicos de ácidos grasos se determinó utilizando estándares Sigma-Aldrich[®] (Metil miristoleato, Met. palmitato, Met, palmitelaidato, Met. palmitoleato, Met. estarato, Met. elaidato, Met. oleato, Met. linoelaidato, Met. linoleato), con los cuáles se cuantificó el contenido de ácidos grasos de las membranas celulares de los diferentes cultivos analizados.

6.10. Determinación cuantitativa de desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH)

Para este apartado se siguió la metodología descrita por Liong y Shah (2005b) con algunas modificaciones. Se parte de caldo MRS (10 ml) adicionado con 0.2% p/v de ácido taurocólico 0.2% p/v de ácido cólico (control) el cual fue inoculado con 1% v/v de la cepa de interés y se incubó a 37°C por 20 horas en condiciones de anaerobiosis. Después del tiempo se ajustó el pH a 7 utilizando

para ello NaOH 1 N, inmediatamente después se centrifugaron los tubos (centrífuga Eppendorf 5804R[®]) a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y a este se le ajustó el pH a 1 con HCl 10 N. Posteriormente se tomó una alícuota de 1ml de este sobrenadante y se agregaron 2ml de etil acetato, se agitó con vortex por 1 minuto y se dejaron reposar los tubos para permitir la separación de fases.

Una vez separadas las fases se transfirieron 2 ml de la fase superior (fase del solvente) a un tubo nuevo y se evaporó el solvente en un baño seco (AccuBlock[®]-Labnet) a 60°C; ya evaporado en su totalidad el solvente, se disolvió el residuo adicionando 1ml de NaOH 0.1 N, se mezcló con vortex y se adicionó 1ml de furfuraldehído 1% v/v, (el cual debe ser preparado a momento de su uso) y 1ml de H₂SO₄ 16 N, se mezcló con vortex durante 1 minuto; inmediatamente después los tubos se calentaron a baño maría a 65°C por 10 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 2ml de ácido acético glacial a cada tubo y se mezcló con vortex durante 1 minuto. Después se midió su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific[®] Evolution 300).

6.11. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS versión 15.0

- En todos los resultados obtenidos de tolerancia al ácido, tolerancia a la bilis, asimilación de colesterol, producción de exopolisacáridos, adhesión de sales biliares a la superficie celular y desconjugación de ácido taurocólico por la acción de la enzima sal biliar hidrolasa se les realizó estadística descriptiva.
- A los valores obtenidos de asimilación de colesterol se realizó análisis de varianza ANOVA, como la prueba de Kruskal-Wallis para determinar la diferencia entre grupos, seguidas de las pruebas post-hoc de Duncan.
- En resultados de polisacáridos exocelulares, se analizó mediante análisis de varianza, ANOVA, además de la prueba de Kruskal-Wallis para

determinar la diferencia entre grupos, posteriormente se realizaron las pruebas post-hoc de Duncan.

- Finalmente se realizaron pruebas de correlación entre pentosas y cada una de las sales biliares, así como de hexosas y cada una de las sales biliares.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de cepas y obtención de cultivo puro

De los 8 productos analizados 4 eran bioyogurths, 1 cereal de desayuno, 2 leches maternizadas y 1 leche fermentada, todos ellos se encuentran a la venta en tiendas de autoservicio y supermercados del área metropolitana de Nuevo León.

En la Tabla 5 se presentan los alimentos seleccionados en base a que las etiquetas declaraban contener probióticos, así como los resultados de la morfología celular por microscopia según lo observado en la tinción de Gram y los métodos utilizados para su identificación.

Tabla 5. Identificación preliminar de cepas aisladas de alimentos.

Código	Producto	Tipo de Producto	Cepa Declarada	Morfología bacteriana	Gram	Método de Identificación
1	A	Bioyogurth	Cultivos lácticos	Coco	+	API
8			⁺ <i>Bifidobacterium lactis</i>	Bacilo bífido		PCR
-	B	Leche	<i>Bifidobacterium longum</i>	Bacilo	+	PCR
2		Maternizada	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			API
3	C	Cereal	<i>Bacillus coagulans</i>	Bacilo	+	API / PCR
4	D	Bioyogurth	<i>Lactobacillus casei</i>	Bacilo	+	API
5	E	Bioyogurth	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Bacilo	+	API
6	F	Leche maternizada	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Bacilo	+	API
7	G	Leche fermentada	<i>Lactobacillus casei shirota</i>	Bacilo	+	API
9	H	Bioyogurth	Bifidobacterias	Bacilo bífido	+	PCR

. ⁺*Bifidobacterium animalis* sub. *lactis*, comúnmente llamado *Bifidobacterium lactis*.

7.1.1. Identificación de cepas probióticas por métodos bioquímicos (API[®]CH50)

De los productos se aislaron 7 diferentes cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y 1 al género *Lactococcus*. Las especies que se encontraron,

fueron *Lactobacillus rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. paracasei paracasei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei shirota* y *Lactococcus lactis lactis*.

En la Tabla 6 se presentan los perfiles obtenidos por el software APILAB (Biomerioux®), de las cepas aisladas de alimentos con declaración en su etiqueta con uso de probióticos, con sus interpretaciones y el % de confiabilidad de la identificación bioquímica, además se realiza una comparación con las cepas declaradas en las etiquetas de los productos.

Cabe mencionar que en 3 productos (A, G y H), las cepas identificadas coinciden con las cepas declaradas en el etiquetado, en los otros 5 productos se detectaron cepas diferentes, sin embargo, esto no necesariamente quiere decir que los productos no contengan las cepas declaradas, puede darse el caso de productos que contengan varias cepas y las de interés no hayan sido aisladas, además, en la mayoría de las etiquetas de los productos se presenta la leyenda “cultivos lácticos” lo que indica que se utilizan otros microorganismos además de los declarados en la etiqueta, lo que hace posible la identificación de microorganismos diferentes a los declarados.

En algunos casos, debido a las cepas declaradas en el etiquetado o las diferentes morfologías detectadas por tinción de Gram, además de la identificación por métodos bioquímicos se realizó una identificación por métodos moleculares, (PCR para genes específicos). Tal es el caso de los productos A, B y H que declaraban contener *Bifidobacterium lactis*; *B. longun* y Bifidobacterias respectivamente.

Tabla 6. Comparación de los microorganismos identificados con los declarados en el etiquetado

Producto	Código	Cepa declarada	Perfil API	% confiabilidad de Identificación
Bioyogurth 1	1	Cultivos lácticos	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	-
	8	* <i>Bifidobacterium lactis</i>	ND	83.1
Leche maternizada 1	-	* <i>Bifidobacterium longum</i>	ND	-
	2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	70.1
Cereal	3	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.7
Bioyogurth 2	4	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	99.2
Bioyogurth 3	5	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	96.1
Leche maternizada 2	6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus fermentum.</i>	99.8
Leche fermentada	7	<i>Lactobacillus casei shirota</i>	*** <i>Lactobacillus para paracasei</i>	99.9
Bioyogurth 4	9	*Bifidobacterias.	ND	ND

*Identificación por métodos moleculares (PCR)

***Perfil correspondiente a *Lactobacillus casei shirota*.

ND = No Detectado por métodos bioquímicos (API).

7.1.2. Identificación de cepas probióticas por métodos moleculares (PCR)

Las cepas probióticas que tenían declarado en sus etiquetas el uso de bifidobacterias y que en la tinción de Gram se evidenció morfología de bacilos irregulares típica de este género, fueron identificadas por métodos moleculares. Se realizó un análisis preliminar para comprobar que el material genético pertenecía al orden de las eubacterias; como se escribió en el apartado de metodología.

Se encontró en todas las cepas analizadas la presencia de DNA bacteriano al visualizar la banda de 358 pares de bases (pb) del fragmento objetivo, lo que se puede ver en la figura 2.

Junto con las cepas aisladas de alimentos se analizaron cepas de referencia, las cuales fueron sometidas a los mismos análisis.

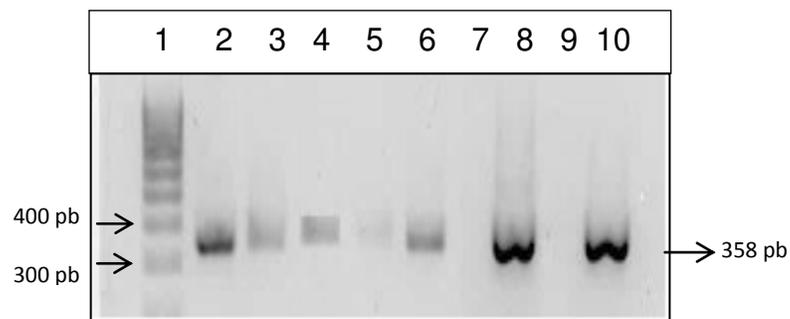


Figura 2. Gel de agarosa de la electroforesis realizada a los resultados de PCR para el orden *Eubacterium*. Carril 1: Marcador de pb Hyperladder IV, Carril 2 – 6: cepas 1, 16, 15, 2 y 17; Carril 7: Vacío; Carril 8: cepa 3; Carril 9: control negativo (agua); Carril 10: Control Positivo (EuH3). Fragmento esperado 358 pares de bases (pb).

Posterior a la comprobación genética para el orden de las eubacterias, para aquellas que declaraban tener bifidobacterias en su formulación, se evidenció la presencia de este género, encontrándose la presencia de estos microorganismos en los productos A y H, más no así en el producto B. Así mismo se analizaron las cepas de referencia de *Bifidobacterium*, para corroborar la naturaleza de estas, lo anterior puede observarse en figura 3.

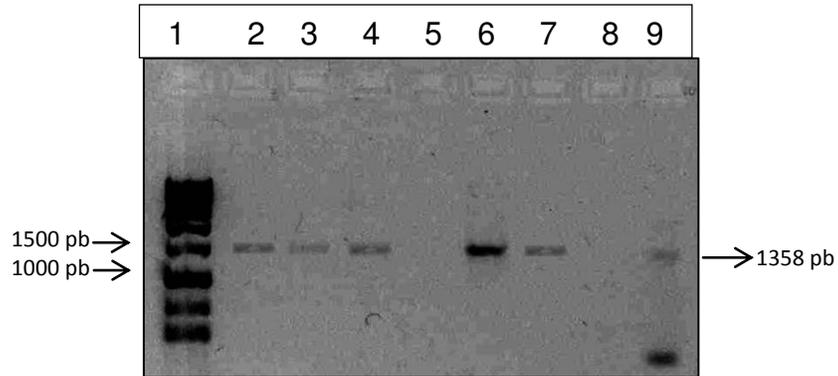


Figura 3. Gel de agarosa de la electroforesis realizada a los resultados de PCR para el género *Bifidobacterium*. Carril 1: Marcador Hyperladder III, Carril 2: cepa 15, Carril 3: cepa 16, Carril 4: cepa 17, Carril 5: control negativo, Carril 6: cepa 8 (producto A), carril 7: cepa 9 (Producto H), Carril 8: cepa 2 (Producto B), Carril 9: Control Positivo. Fragmento esperado 1358 pb.

Aquellas muestras que dieron positivo para el género *Bifidobacterium*, se les realizó un análisis para confirmar si pertenecían a la subespecie *Bifidobacterium lactis*; encontrándose que de las muestras estudiadas la perteneciente al producto A dio positivo para *B. lactis*. Las demás muestras no pertenecían a las subespecies analizadas, estos resultados pueden observarse en la figura 4.

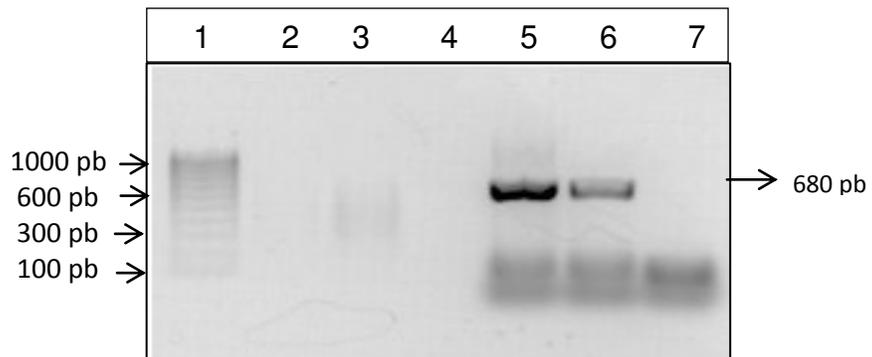


Figura 4. Gel de agarosa de la electroforesis realizada a los resultados de PCR para la cepa *Bacillus coagulans* y *Bifidobacterium lactis*. Carril 1: marcador de pb Hyperladder IV; Carril 2: cepa 3; Carril 3: cepa 3; Carril 4: Control Negativo; Carril 5: cepa 9; Carril 6: cepa 9; Carril 7: cepa 8. Fragmentos esperados: *B. coagulans* = 262 pb, *B.lactis* = 680 pb.

También, se examinó una muestra del cereal de desayuno que declaraba en su etiqueta el uso de *Bacillus coagulans*.

En la tabla 7 se presentan los resultados de la identificación de las cepas por métodos moleculares.

Tabla 7. Identificación de cepas por métodos moleculares

Origen	Producto	Cepa	<i>Eubacterium</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
Alimento	A	8	+	+	+	NA
	B	2	+	+	-	NA
	C	3	+	NA	NA	-
	H	9	+	+	-	NA
Referencia	NA	15 (<i>B. coagulans</i> ATCC7050)	+	NA	NA	+
	NA	16 (<i>B. adolescentis</i> ATCC15703)	+	+	-	NA
	NA	17 (<i>B. lactis</i> DSM 10140)	+	+	+	NA
	NA					

NA = No Aplica.

7.2. Tolerancia al ácido

Se evaluó la sobrevivencia de las cepas a un medio ácido (pH = 2) los resultados son presentados en la figura 5. Se debe destacar que el comportamiento de las cepas es muy diferente dependiendo de su fuente de recuperación (alimentos o referencia) siendo las cepas aisladas de alimentos más tolerantes a la presencia de ácido que las de referencia, hecho que se ve evidenciado en su crecimiento.

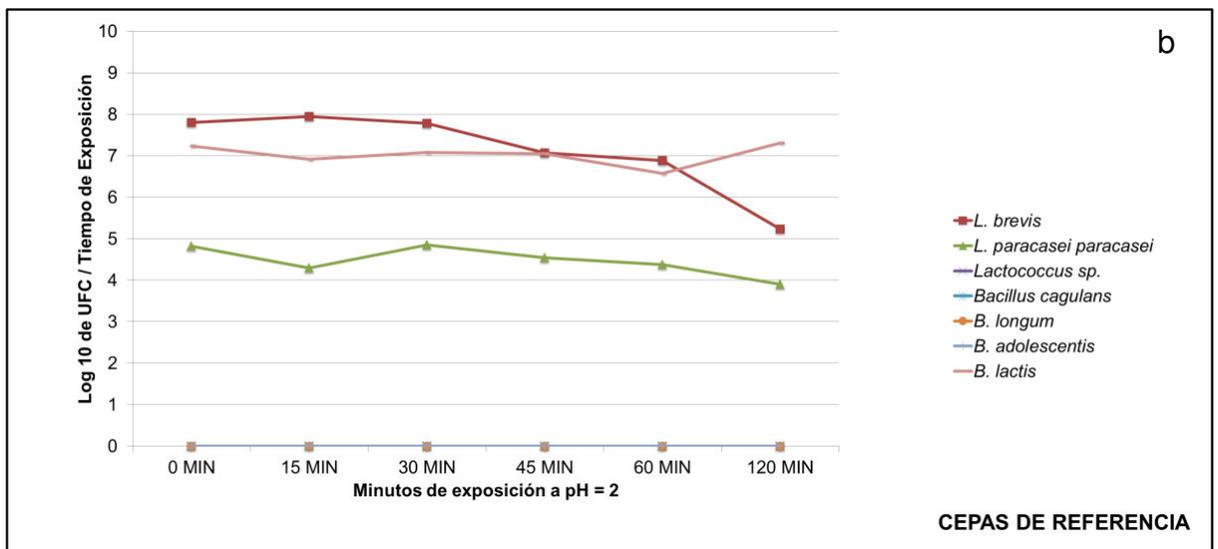
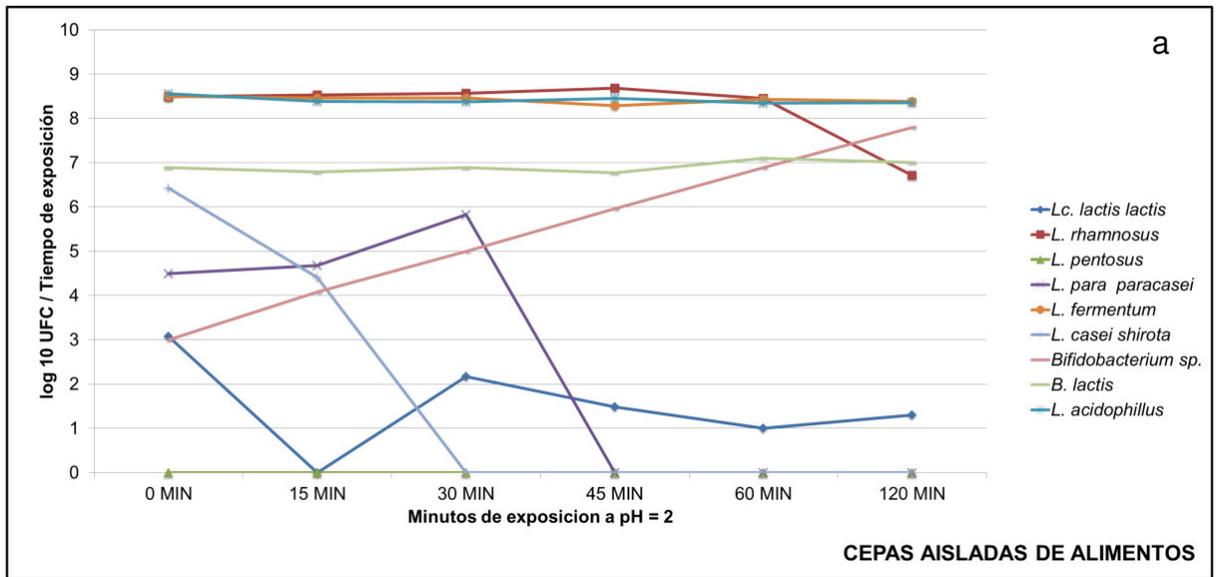


Figura 5. Sobrevivencia al ácido de cepas aisladas de alimentos (a) y de referencia (b) a pH= 2. Se determinó la sobrevivencias de las cepas aisladas de alimentos a pH2 después de 120 minutos de exposición a este tratamiento, los resultados son expresados en log10 de UFC/ tiempo de exposición.

También se observa que el ácido afecta de manera diferente el crecimiento, dependiendo de tipo de cepa; en algunos casos se observa que las cepas no son tolerantes a la presencia del ácido, evidenciado por el nulo crecimiento, como en *L. pentosus* aislada de alimentos y en las cepas de referencia *Lactococcus sp*, *Bacillus cagalans*, *B. longum*, *B. adolescentis*; en

otros microorganismos la acidez afecta a través del tiempo, observándose que los probióticos no logran sobrevivir a las condiciones de acidez después de 30-45 minutos observándose un crecimiento solo al inicio del experimento, como se observa en *Lc. lactis lactis* y *L. casei shirota*, aislados de alimentos. Otra situación que se presenta es la modificación de la tasa de crecimiento al inicio del tratamiento pero la cepa se recupera al final, por ejemplo en la cepa *Bifidobacterium* sp. Es importante resaltar que en *L. fermentum*, *Lactobacillus acidophillus*, *B. lactis* de las cepas aisladas de alimentos y *B. lactis* DSM10140 para las cepas de referencia la presencia del ácido prácticamente no afecta el crecimiento de la cepa.

7.3. Tolerancia a la bilis

En la figura 6 se presentan las gráficas de la tolerancia a la bilis; se observa que las cepas cuya fuente fueron alimentos tienen mayor resistencia a la presencia de las diferentes sales biliares (ácido cólico, ácido taurocólico u oxgall). Se puede observar cómo las diferentes sales biliares afectan la sobrevivencia de la cepa, siendo en su mayoría más tolerantes a la presencia de oxgall, después al ácido taurocólico y por último ácido cólico.

Los porcentajes de sobrevivencia a cada una de los tipos de sales biliares varían entre 0 y 100% y esta capacidad es particular de cada cepa, sin embargo, se observa que las cepas aisladas de alimentos son más tolerantes a las diferentes tipos de sales biliares, el 56% de las cepas presenta tolerancia al oxgall, 44% al ácido cólico y 67% al ácido taurocólico, es importante resaltar que cepas como *L. rhamnosus* y *L. acidophillus* toleran perfectamente una sal biliar (oxgall y ácido cólico), pero son inhibidas por completo con otra sal biliar (ácido cólico). Algo similar ocurre con *B. lactis* la cual sobrevive a ácido cólico y taurocólico pero no a oxgall.

Por otra parte las cepas de referencia presentaron poca tolerancia llegando a sobrevivir solo el 25% de las cepas expuestas a las diferentes sales biliares (ácido cólico, taurocólico y oxgall), la sobrevivencia a las diferentes

sales biliares es similar, entre el 90 y 100% para *L. brevis* y entre el 58 y 62% para *L. paracasei paracasei*.

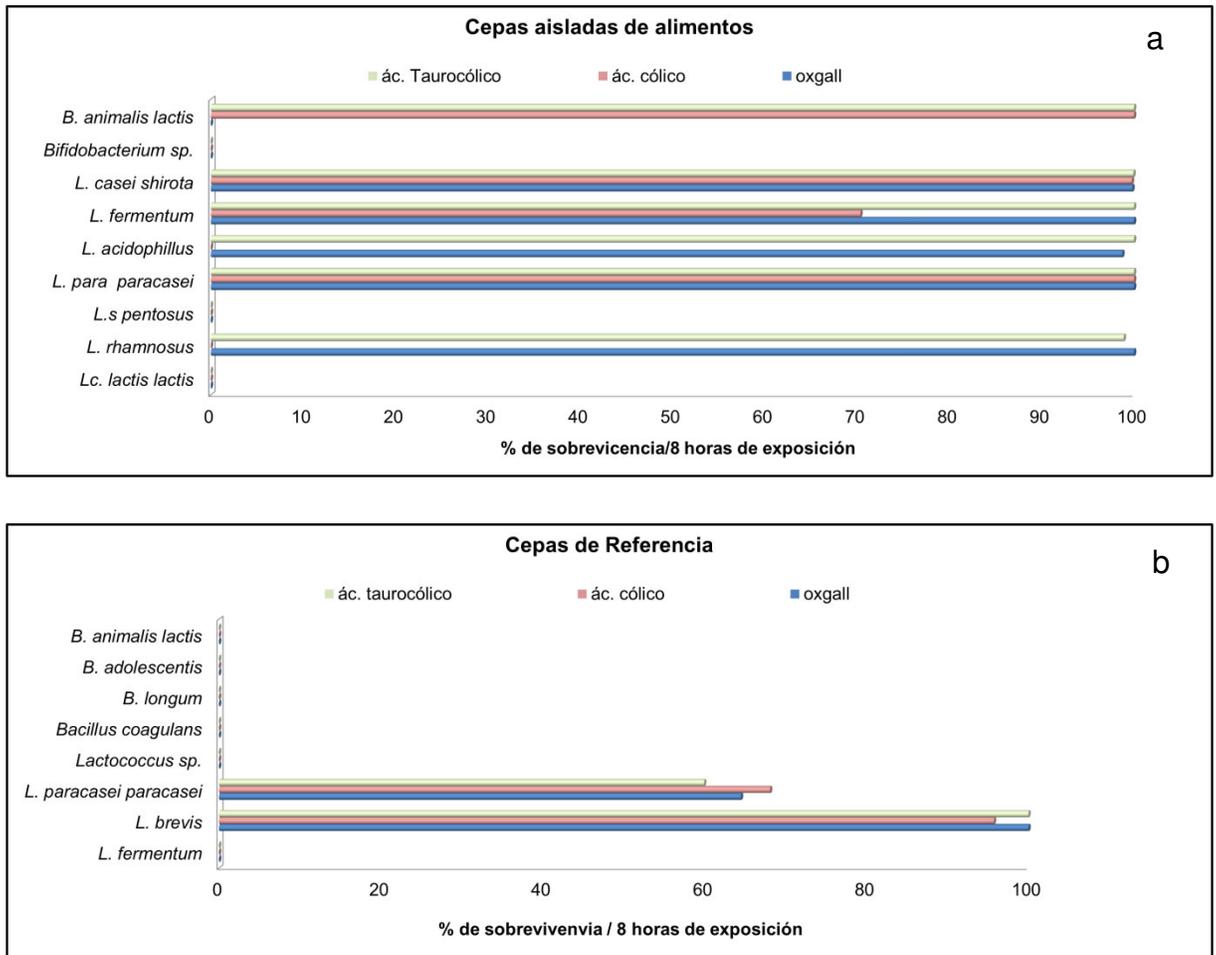


Figura 6. Supervivencia a la bilis de cepas aisladas de alimentos(a) y de referencia (b). Los resultados son expresados en % de supervivencia/8 horas de exposición a una concentración de 0.3% p/v de sal biliar (oxgall o ácido cólico o ácido taurocólico) durante 8 horas.

7.4. Asimilación de colesterol *in vitro*.

Algunas cepas probióticas muestran la capacidad de asimilar colesterol del medio de cultivo por diferentes mecanismos, lo que sugiere que al consumirse estos microorganismos pueden tener la misma acción en el intestino ayudando a controlar el colesterol en el plasma.

En la Tabla 8 se encuentran los resultados expresados como % de la asimilación de colesterol (medias y sus desviaciones estándar). Los

microorganismos fueron sometidos a dos diferentes concentraciones de oxgall los tratamientos consistían en 100 µg/ml de colesterol + oxgall (0.2% ó 0.4% p/v)

Al hacer la prueba de Levene sobre la igualdad de las varianzas se observa que no hay homogeneidad entre cepas y los tratamientos, así como tampoco se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los porcentajes de asimilación. Cuando las cepas fueron sometidas a una concentración de 0.2% de oxgall los porcentajes de asimilación de colesterol oscilan entre 0.08 y 54.26%, las cepas que presentaron mayor porcentaje de asimilación son *L. acidophilus* (54.26%), *L. fermentum* (49.34%) y *B. lactis* (47.39%) y las cepas que mostraron menos asimilación de colesterol fueron *L. rhamnosus* (13.21%), *L. pentosus* (4.31%), las cuales provenían de alimentos y la cepa de referencia *B. lactis* DSM10140 (0.08%). Cuando la concentración de oxgall se aumentó a 0.4% las cepas que más asimilaron colesterol fueron *L. fermentum* (57.65%), *L. pentosus* (52.54%) y *Lc. lactis lactis* (47.36%), todas ellas aisladas de alimentos y las que presentaron menor asimilación fueron *B. lactis* DSM10140 (18.69%) y *L. paracasei paracasei* LB30 y *L. rhamnosus* (aislada de alimentos), las cuales no presentaron asimilación.

Tabla 8. Asimilación de colesterol de cepas probióticas sometidas a medio MRS con dos concentraciones de Oxgall (0.2% p/v o 0.4% p/v) y colesterol [100 µg/ml].

% de ASIMILACIÓN DE COLESTEROL					
	CÓDIGO	CEPA	MRS + 0.2% Oxgall + Colesterol [100 µg/ml]	MRS + 0.4% Oxgall + Colesterol [100 µg/ml]	
Cepas aisladas de alimentos	1	<i>Lc. lactis lactis</i>	36.94 ± 0.037	47.36 ± 0.047	↑
	2	<i>L. rhamnosus</i>	13.21 ± 0.083	ND	↓
	3	<i>L. pentosus</i>	4.31 ± 0.123	52.54 ± 0.094	↑
	4	<i>L. para paracasei</i>	39.08 ± 0.019	37.06 ± 0.073	↓
	5	<i>L. acidophilus</i>	54.26 ± 0.012	39.41 ± 0.016	↓
	6	<i>L. fermentum</i>	49.34 ± 0.020	57.65 ± 0.011	↑
	7	<i>L. casei shirota</i>	40.08 ± 0.038	37.78 ± 0.044	↓
	8	<i>Bifidobacterium sp.</i>	35.73 ± 0.021	27.89 ± 0.027	↓
	9	<i>B. lactis</i>	47.39 ± 0.001	22.35 ± 0.014	↓
Cepas de referencia	10	<i>L. fermentum</i>	38.51 ± 0.017	46.42 ± 0.007	↑
	11	<i>L. brevis</i>	43.55 ± 0.019	38.99 ± 0.011	↓
	12	<i>L. paracasei paracasei</i>	32.81 ± 0.005	ND	↓
	17	<i>B. lactis</i>	0.08 ± 0.014	18.69 ± 0.027	↑

ND = No detectado

En la figura 7 se presentan los gráficos de porcentaje de asimilación de colesterol de las cepas de alimentos y de referencia que fueron seleccionadas en base a sus tolerancias al ácido y bilis.

Para cepas aisladas de alimentos (7a) se observa que el porcentaje de asimilación se ve afectado negativamente al aumentar la concentración de sal biliar (6/9 cepas), mientras que algunas presentan mayor asimilación, en otros casos como con *Lc. lactis lactis* y *L. fermentum* el porcentaje de asimilación aumentó al utilizar una mayor concentración de sal biliar. En el caso de *L. rhamnosus* se observó que al aumentar la concentración de sal biliar el porcentaje de asimilación disminuye completamente hasta tender a cero.

Para las cepas de referencia (figura 7b) se observa que los porcentajes de asimilación de colesterol es menor comparado con los porcentajes de asimilación de las cepas aisladas de alimentos.

En 2 de estas cepas (*L. fermentum* y *B. lactis* DSM10140) también se observa que el porcentaje de asimilación es directamente proporcional a la concentración de sal biliar, del mismo modo la cepa *B. lactis* DSM10140 que en una concentración de 0.2% de oxgall se detecta asimilación muy poca asimilación (0.08%) y cuando se aumenta la concentración de la sal biliar a 0.4% el porcentaje de asimilación aumenta a 18.69%. En la cepa *L. paracasei paracasei* LB30 cuando se aumenta la concentración de sal biliar el porcentaje de asimilación tiende a cero.

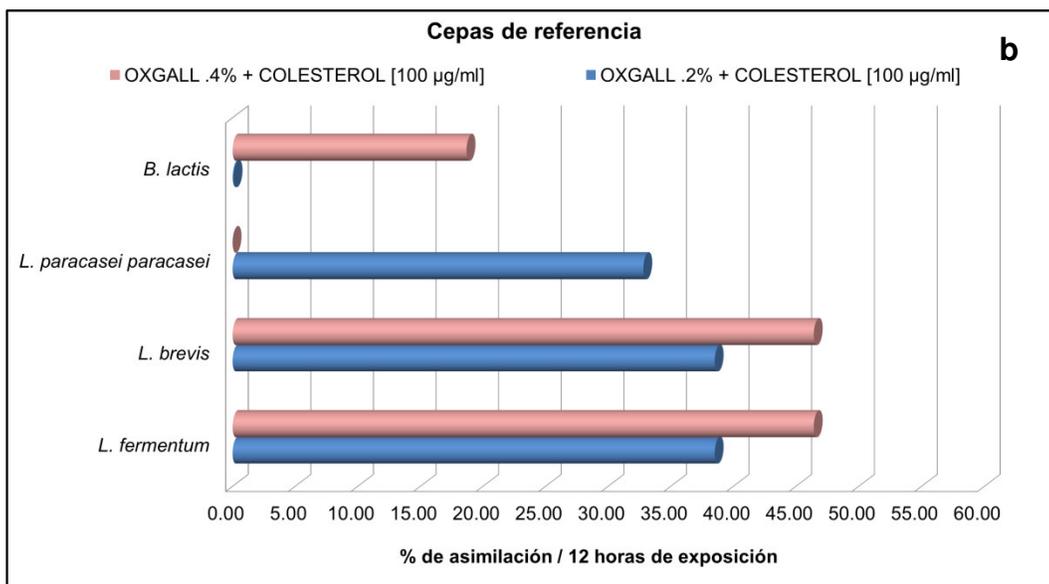
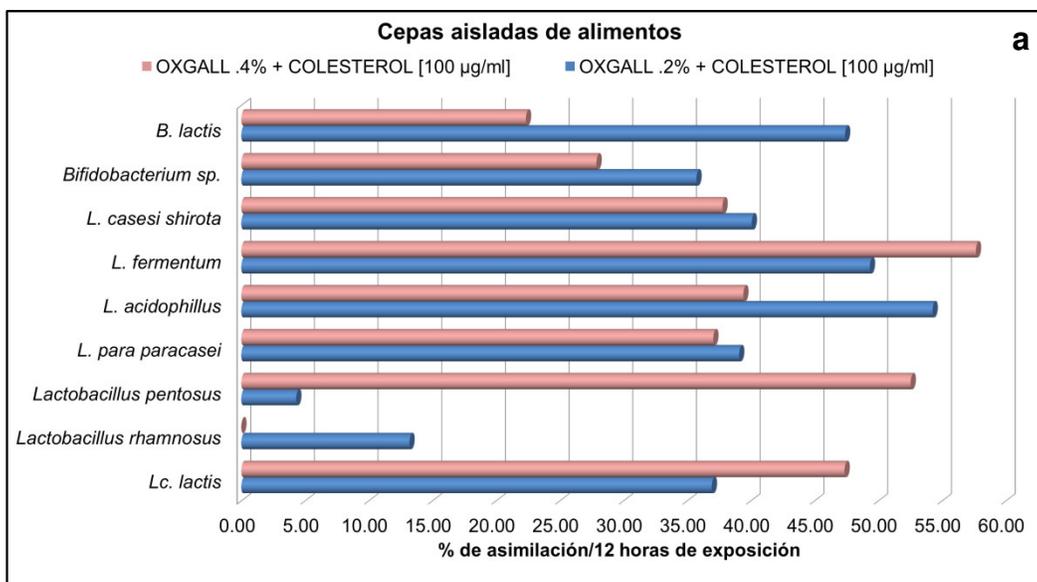


Figura 7. % de Asimilación de colesterol / 12 horas de exposición. (a) Cepas aisladas de alimentos (b) cepas de referencia.

7.5. Determinación de exopolisacáridos (EPS)

Los polisacáridos exocelulares o exopolisacáridos son producidos por ciertas bacterias ácido-lácticas, son sustancias mucilaginosas que incrementan la viscosidad de leches fermentadas, además, las evidencias sugieren que estos pueden actuar como prebióticos de estas mismas bacterias confiriendo mayor sobrevivencia de los probióticos en el intestino y por ende mayores

beneficios a la salud del huésped, se les ha relacionado con efectos antitumorales, actividad inmunoestimuladora así como en la intervención del metabolismo de colesterol al adherir sales biliares a la membrana de la célula.

Se observa que la producción de polisacáridos exocelulares es particular de cada cepa, también se hace evidente la variación dependiendo de la naturaleza de la matriz que se utilice, (leche descremada o medio de cultivo MRSL). En el caso de las cepas aisladas de alimentos y cultivadas en leche, se encontró diferente contenido de polisacáridos exocelulares, medida como glucosa total, desde 20.54 µg/ml hasta 587.25 µg/ml, para las cepas *Lc. lactis lactis* aislada de alimentos y *L. acidophilus* respectivamente; de las cepas de referencia la cepa de menor producción (24.97 µg/ml) fue *L. brevis* ATCC367 y la de mayor producción (180.54 µg/ml) para *B. lactis* DSM10140.

En la figura 8 se muestran las concentraciones de glucosa en leche descremada, donde se observa que estadísticamente las concentraciones entre *Lc. lactis lactis* (cepa 1) y *L. brevis* ATCC367 (cepa 11) son iguales entre sí estadísticamente, así como *L. paracasei paracasei* LB30 (cepa 12) y *L. rhamnosus* (cepa 2) y entre *L. para paracasei* (cepa 4) y *L. acidophilus* (cepa 5), todas las demás son diferentes entre sí, lo anterior al realizar las pruebas de Duncan con un α 0.05.

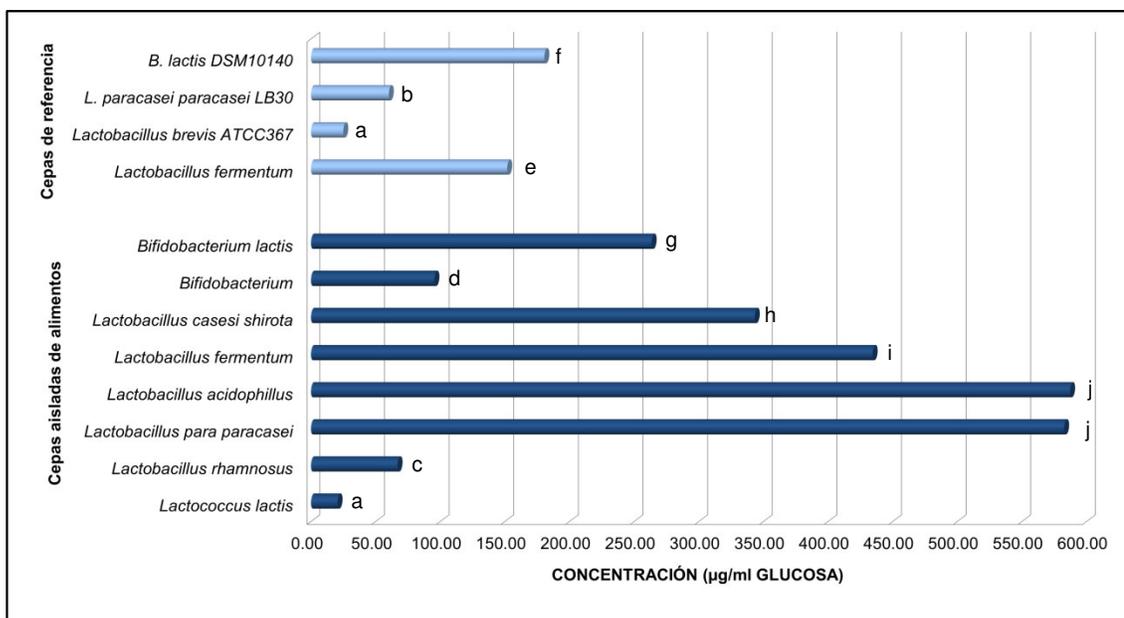


Figura 8. Concentración [$\mu\text{g/ml}$] de glucosa en las cepas de estudio. Los resultados están expresados en la media de tres repeticiones de la determinación de glucosa por el método antrona en leche descremada fermentada con las cepas de estudio. Superíndices diferentes representan diferencias significativas.

Para las cepas cultivadas en medio MRSL, la producción de polisacáridos exocelulares se puede diferenciar entre pentosas y hexosas. En ambas, la producción depende de la cepa, en términos generales la producción de pentosas oscila entre $95.58 \mu\text{g/ml}$ para *B. lactis* DSM10140 y $633.11 \mu\text{g/ml}$ de *L. brevis* ATCC367, ambas cepas son de referencia. De las cepas aisladas de alimentos la que tiene menor producción de pentosas es *L. rhamnosus* con $105.18 \mu\text{g/ml}$, y la de mayor producción fue *L. para paracasei* con $311.04 \mu\text{g/ml}$.

Para las hexosas la producción se encuentra entre $73.72 \mu\text{g/ml}$ y $621.18 \mu\text{g/ml}$ siendo *B. lactis* DSM10140 la de menor producción y *L. fermentum* y *L. brevis* ATCC367 las de mayor producción, ambas son cepas de referencia, para las cepas de alimentos la que produjo menos cantidad de polisacáridos exocelulares fue *B. lactis* con $127.26 \mu\text{g/ml}$ y la que presentó una mayor producción fue *L. para paracasei* con $302.04 \mu\text{g/ml}$.

Las cepas que presentaron mayor producción fueron las cepas de referencia, en ambos casos (hexosas y pentosas) las cepas más productoras fue *L. brevis* ATCC367 y *L. fermentum*.

En la figura 9 se presentan los gráficos de las concentraciones de pentosas y hexosas en medio MRSL. En el caso de las pentosas al hacer la prueba de la prueba de Duncan con un α de 0.05 se pueden apreciar las igualdades estadísticas entre las diferentes determinaciones, también se realizó estas pruebas estadísticas (Duncan) en el caso de las hexosas, en el que también se observan igualdades estadísticas entre algunas de las cepas, estas se pueden observar en figura 9 de este apartado.

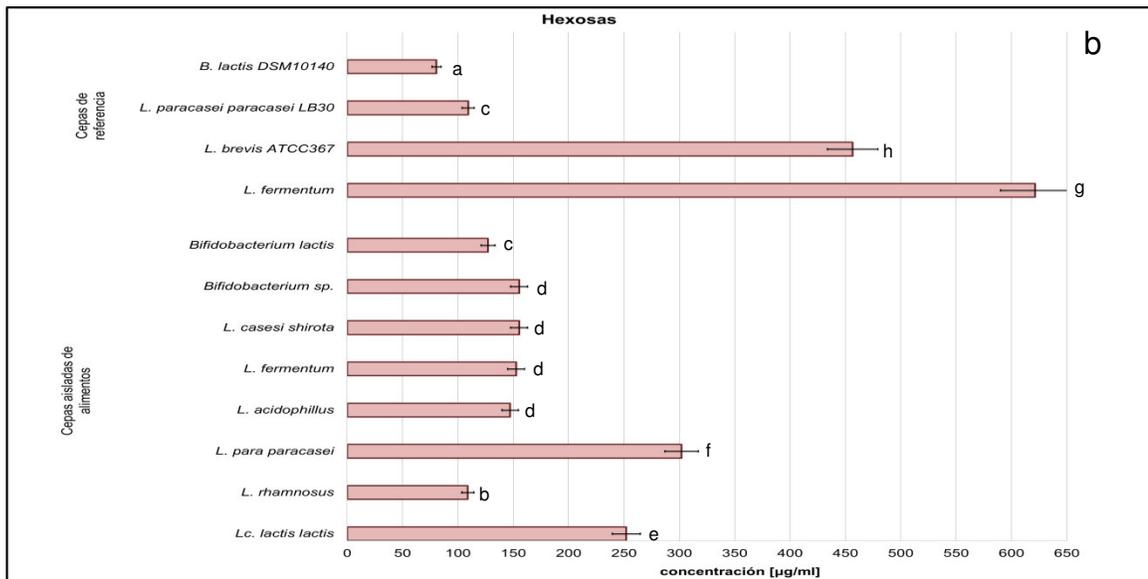
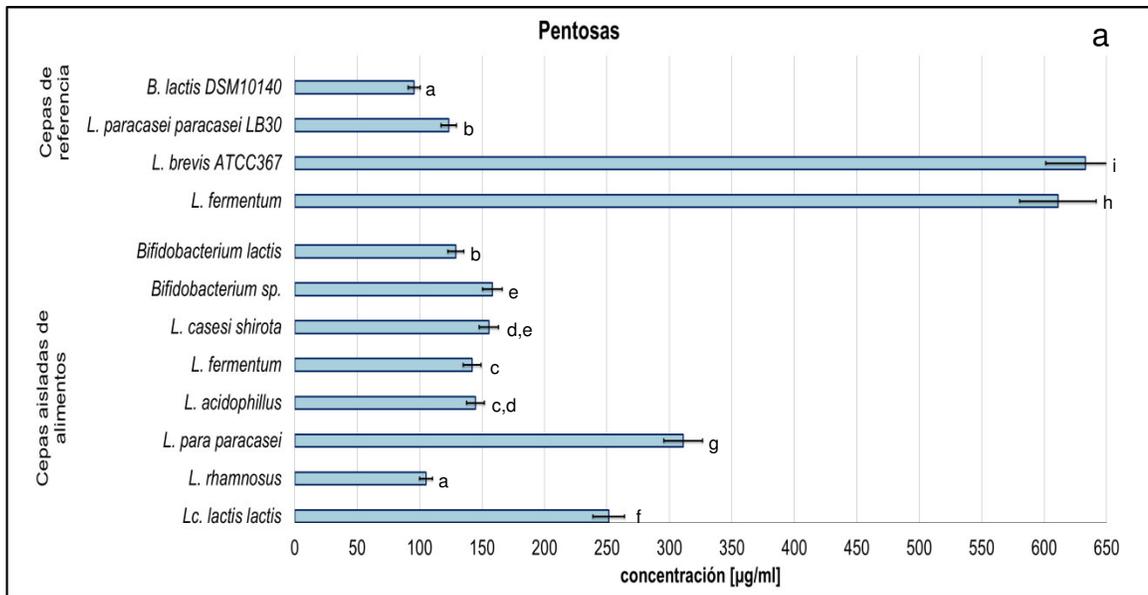


Figura 9. Concentración de pentosas (a) y hexosas (b) en µg/ml en medio de cultivo MRSL. Los datos están expresados en la media de tres repeticiones de la determinación de pentosas y hexosas por el método fenol-sulfúrico producidas por las cepas de estudio. Superíndices diferentes representan diferencias significativas.

En la adhesión de sales biliares a la membrana celular se determinó la concentración de ácido cólico o ácido taurocólico presente en la membrana; el ácido cólico mostro más afinidad a la membrana (9 de 12 cepas) que el ácido

taurocólico (5 de 12 cepas), sin embargo, esta afinidad es específica de cada cepa.

También se observa que algunas cepas no tienen la capacidad de adherir a su membrana las sales biliares, ejemplos de lo anterior son las cepas *Lc. lactis lactis*, *L. para paracasei*, *L. acidophillus*, *L. fermentum*, todas ellas cepas aisladas de alimento, las cuales son incapaces de adherir ácido cólico a su membrana. En el caso del ácido taurocólico las cepas que no mostraron adherencia fueron *Lc. lactis lactis*, *L. rhamnosus*, *L. para paracasei*, *L. casei shirota* de las cepas aisladas de alimentos y *L. fermentum*, *L. brevis* y *L. paracasei paracasei* para las cepas de referencia. La capacidad de adherir las sales biliares a su membrana es dependiente del tipo de sal biliar, se observa que pueden adherir un tipo de sal biliar pero no así la otra, por ejemplo *L. acidophillus* y *L. fermentum*, ambas aisladas de alimentos, no son capaces de adherir ácido cólico, pero si ácido taurocólico, aunque en bajas concentraciones 0.61 $\mu\text{M/ml}$ y 0.55 $\mu\text{M/ml}$, respectivamente. Mientras que *L. rhamnosus* y *L. casei shirota* para cepas aisladas de alimentos pueden adherir ácido cólico con concentraciones de 0.82 $\mu\text{M/ml}$ y 0.10 $\mu\text{M/ml}$; también *L. fermentum*, *L. brevis* ATCC637 y *L. paracasei paracasei* LB30 (con concentraciones de 1.15 $\mu\text{M/ml}$, 0.75 $\mu\text{M/ml}$ y 1.08 $\mu\text{M/ml}$ respectivamente), presentan esta característica.

Las cepas que mostraron mayor capacidad de adherencia a el ácido cólico son: *B. animalis sub. lactis* cepa aislada de alimentos con una concentración de 1.01 $\mu\text{M/ml}$; *L. fermentum* con 1.15 $\mu\text{M/ml}$ y *L. paracasei paracasei* con 1.09 $\mu\text{M/ml}$; estas últimas corresponden a cepas de referencia. Para el ácido taurocólico la que presentó mayor capacidad fue las cepas aislada de alimentos *B. animalis sub. lactis* con una concentración de 1.11 $\mu\text{M/ml}$.

Al realizar las pruebas de Duncan con un α de 0.05 no hay igualdad entre las medias de ácido cólico, y entre las cepas de ácido taurocólico solo se presenta igualdad entre *L. rhamnosus* y *L. paracasei paracasei*, ambas aisladas de alimentos.

La correlación entre el contenido de polisacáridos de las cepas de trabajo y sales biliares se presenta en la figura 10. Para pentosas y ácido cólico en el inciso (a), para pentosas y ácido taurocólico (b), hexosas y ácido cólico (c), hexosas y ácido taurocólico (d), donde se observa que no hay correlación entre la presencia del ácido cólico y el contenido de polisacáridos (medidos como pentosas y hexosas), mientras que en presencia del ácido taurocólico se observa una correlación de Pearson negativa de -0.480 en el caso de pentosas y de -0.476 en el caso de hexosas, ambas con una significancia de 0.01 con las concentraciones de azúcares, ya sea pentosas o hexosas.

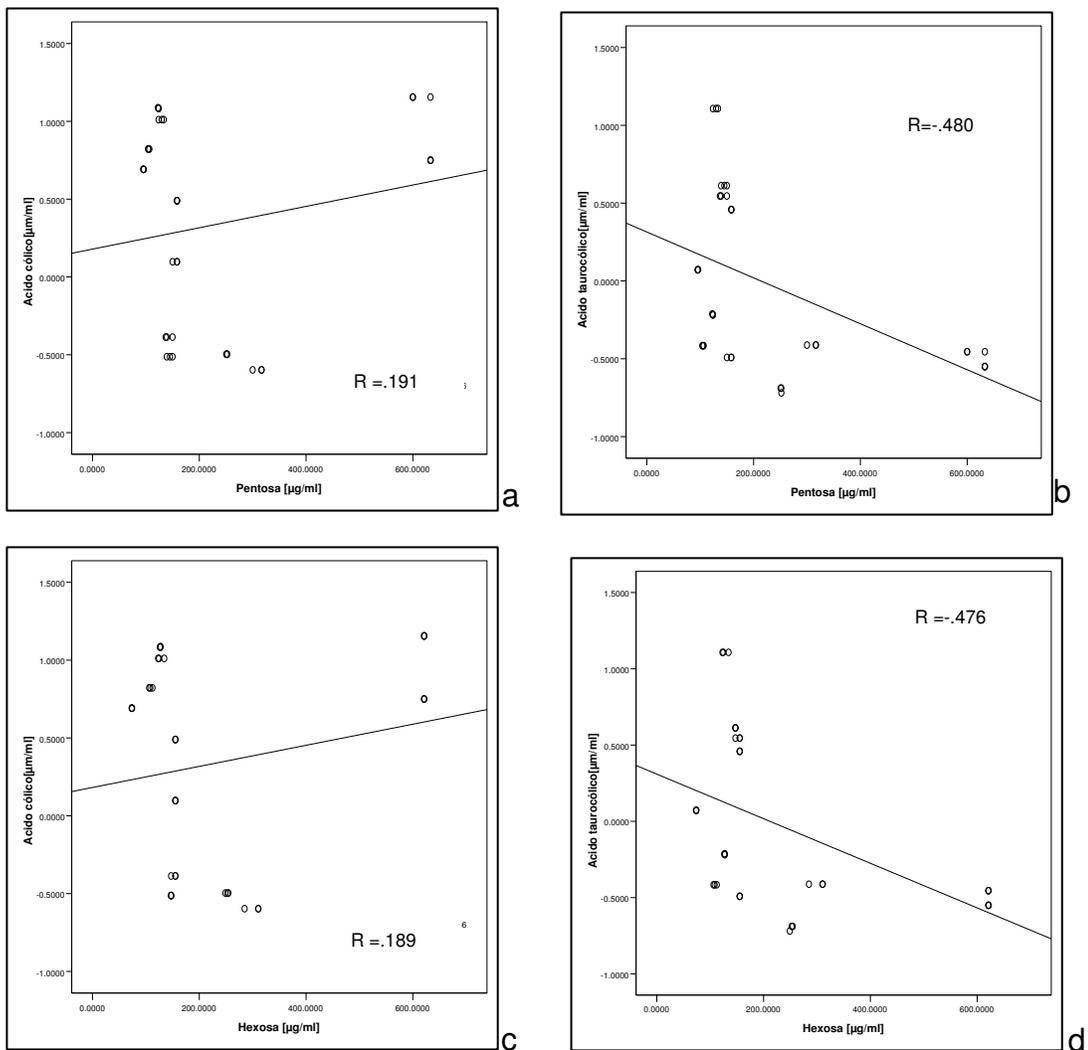


Figura 10. Correlaciones de sales biliares y azúcares producidos por las cepas de trabajo. En la figura (a) correlación entre las pentosas y el ácido cólico, (b) correlación negativa entre ácido taurocólico y pentosas.

7.6. Perfil de ácidos grasos de las membranas probióticas de los microorganismos probióticos.

El perfil de ácidos grasos de las bacterias probióticas se ve modificado en base a los componentes del medio de cultivo donde fue incubado. Para la identificación adecuada de los ácidos grasos se utilizaron estándares, los cuales se presentan en la tabla 9, también se presenta el tiempo de retención de cada uno, su límite de detección y cuantificación.

Tabla 9. Estándares para la identificación de perfil de ácidos grasos.

Nombre común	Taquigrafía de lípido	Tiempo de retención (min)	Límite de detección	r de curva de calibración
Miristoleico	C14:1 <i>c</i> 9	10.3	10 µl/ml	0.92
Palmitico	C16:0	12.4	10 µl/ml	0.90
Palmitelaidico	C16:1 <i>t</i> 9	13.4	10 µl/ml	0.89
Palmitoleico	C16:1 <i>c</i> 9	13.9	10 µl/ml	0.89
Estearico	C18:0	18.4	7.5 µl/ml	0.96
Elaídico	C18:1 <i>t</i> 9	19.9	10 µl/ml	0.95
Oleico	C18:1 <i>c</i> 9	20.5	10 µl/ml	0.86
Linoelaídico	C18:2 <i>t</i> 9,12	22.9	10 µl/ml	0.91
Linoleico	C18:2 <i>c</i> 9,12	24.4	10µl/ml	0.92

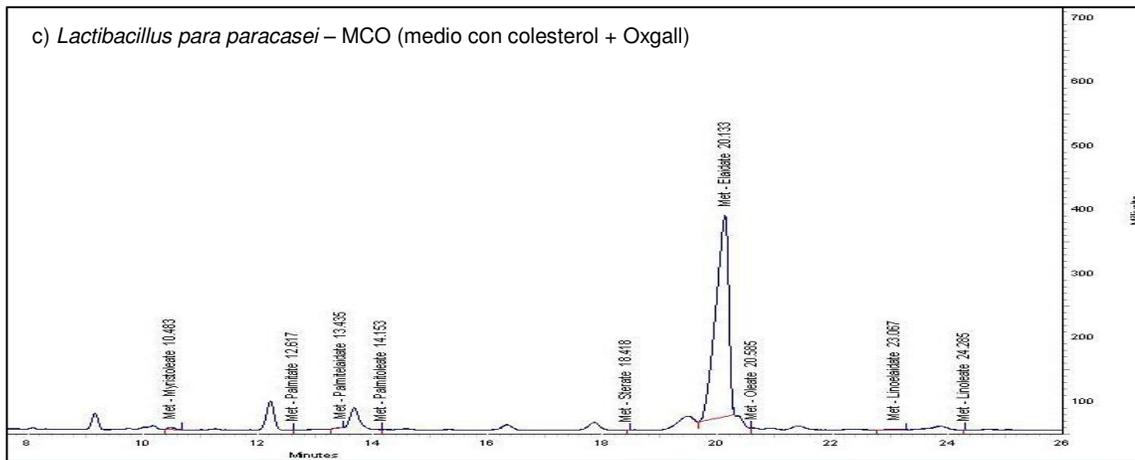
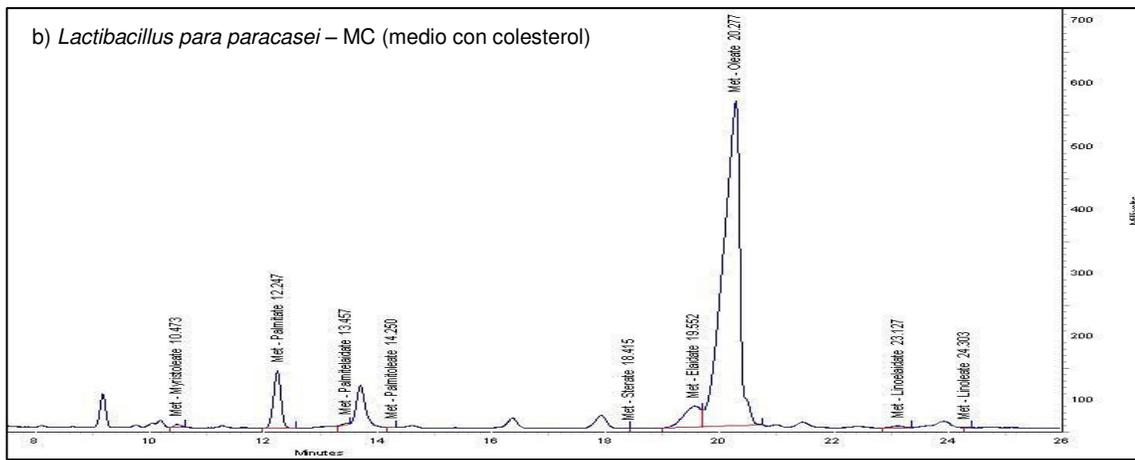
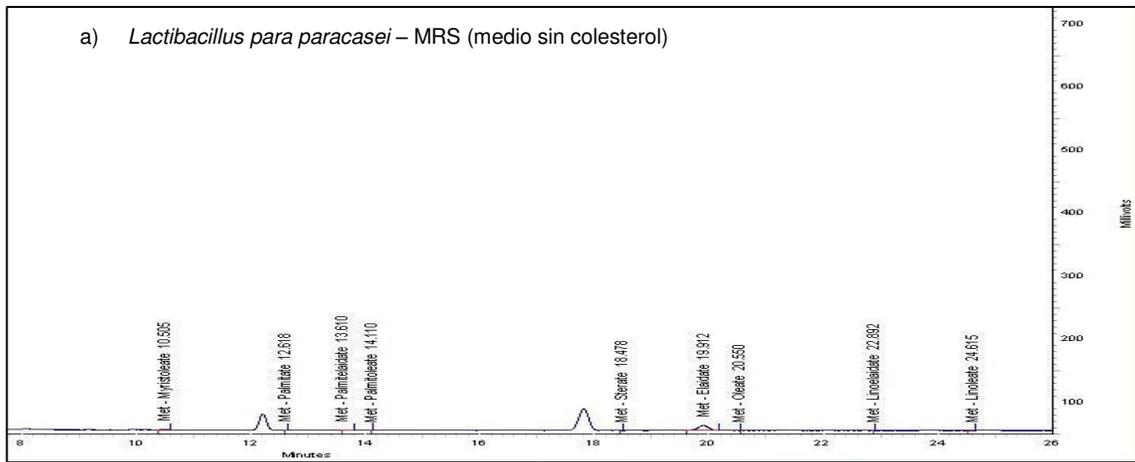
En la tabla 10 se observan los cambios en el perfil de ácidos grasos de cada uno de los probióticos analizados, en términos generales se observa que el perfil de ácidos grasos de cada microorganismo, así como los cambios de estos en base a los componentes del medio al que son incubados los microorganismos son características inherentes de este. Los ácidos grasos que se mas se detectaron fueron miristoleico y elaídico.

También en cada uno de los microorganismos analizados se observa la aparición de picos en el cromatograma que no pertenecen a los estándares elegidos para la identificación, como ejemplo de lo anterior es lo que se puede apreciar en la figura 11 en los cromatogramas de la cepa *L. para paracasei*, donde se observa que cuando el microorganismo crece sin la adición del

colesterol en el medio, se observa la presencia de miristoleico y elaídico, en contraste, cuando se agrega el colesterol se encuentran el ácido palmítico y el ácido oleico. Al adicionar sales biliares se modifica el perfil de ácidos grasos, específicamente con la adición de ácido taurocólico se produce ácido palmitelaídico; lo que indica la formación de isómeros de los ácidos grasos analizados posiblemente con enlace trans o con modificación de la posición del doble enlace, aunque es una situación que se presenta en todos los medios, es más evidente en el medio con colesterol sin sales biliares, el medio con oxgall y el medio con ácido cólico.

En los microorganismos probióticos aislados de alimentos los ácidos más comunes fueron miristoleico y oleico. Mientras que en las cepas de referencia se encontraron principalmente el ácido miristoleico y palmítico.

En el anexo 1 se presentan los cromatogramas de todas las cepas analizadas.



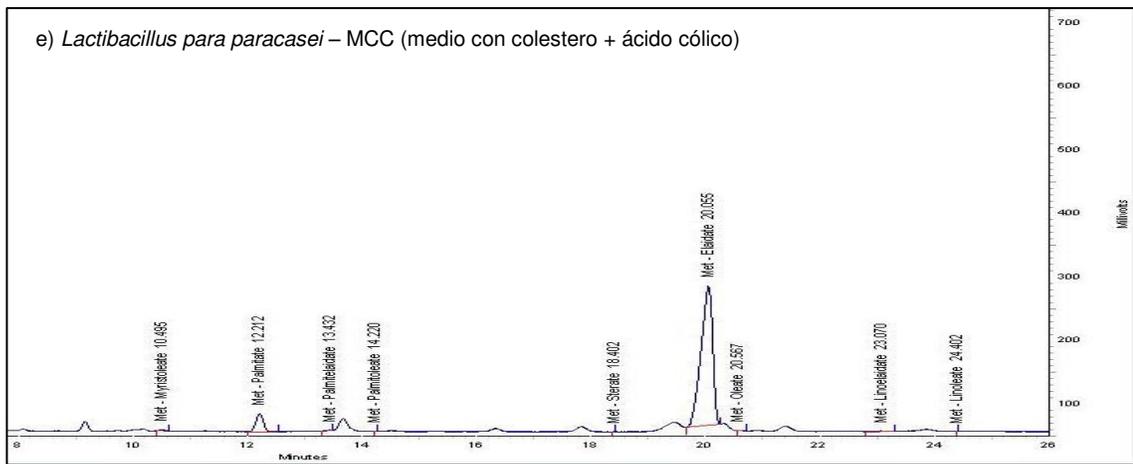
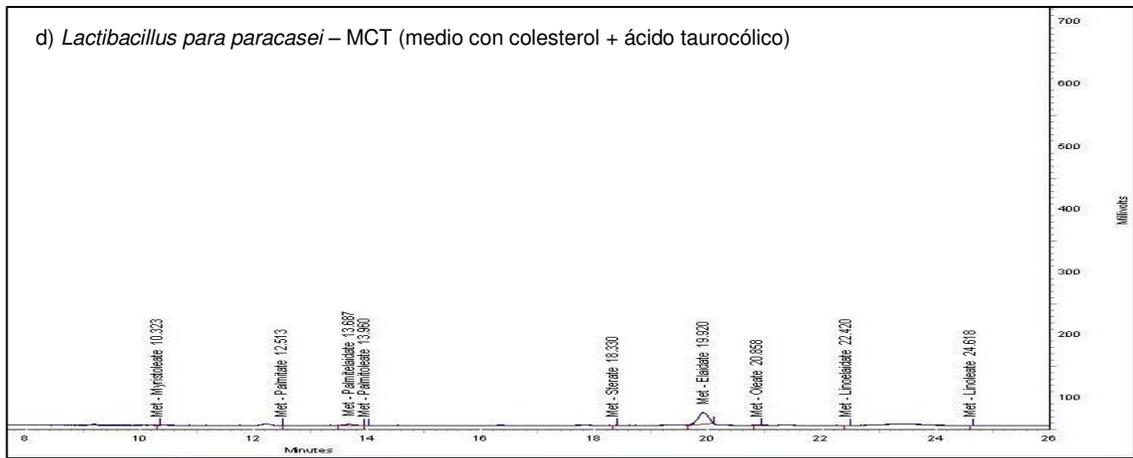


Figura11. Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en presencia de colesterol y sales biliares de la cepa *Lactobacillus para paracasei*. En los diferentes incisos se presentan los resultados del perfil de ácidos grasos en los diferentes medios empleados.

Tabla 10. Perfil de ácidos grasos de las cepas probióticas

	CÓDIGO	CEPA	MRS	MC	MCC	MCT	MCO
Cepas aisladas de alimentos	1	<i>Lc. lactis lactis</i>	C14:1c9	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C18:1t9, C18:1c9	C14:1c9 C18:1t9	C18:1t9
	2	<i>L. rhamnosus</i>	ND	C14:1c9	C16:0 C18:1t9	C14:1c9 C16:0	C18:1t9, C18:1c9
	4	<i>L. para paracasei</i>	C14:1c9	C14:1c9 C16:0 C18:1t9, C18:1c9	C14:1c9 C18:1t9	C16:1t9 C18:1t9	C14:1c9 C16:0 C18:1t9
	5	<i>L. acidophilus</i>	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C18:1t9	C16:1t9 C18:1t9	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C16:1t9 C18:0, C18:1t9
	6	<i>L. fermentum</i>	C14:1c9 C18:1t9	C18:1t9	C14:1c9 C18:1t9	C16:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C16:0, C16:1c9 C18:1t9
	7	<i>L. casei shirota</i>	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C16:1t9 C18:1t9	C18:1t9	C14:1c9	ND
	8	<i>Bifidobacterium sp.</i>	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C16:0, C16:1c9 C18:0, C18:1t9, C18:1c9	ND	C14:1c9 C16:0
	9	<i>B. lactis</i>	C16:0	C14:1c9 C16:1t9	ND	C16:0	ND
	Cepas de referencia	10	<i>L. fermentum</i>	ND	C14:1c9	C14:1c9 C16:0	C14:1c9 C16:0
11		<i>L. brevis</i> ATCC367	C14:1c9 C16:0	C14:1c9	C14:1c9 C16:0	C14:1c9 C16:0	C14:1c9 C16:0
12		<i>L. paracasei paracasei</i> LB30	C14:1c9 C16:0	C14:1c9 C18:1t9	C14:1c9 C16:0	C14:1c9 C16:0 C18:1t9	C14:1c9
17		<i>B. lactis</i> DSM10140	ND	C14:1c9	C14:1c9 C16:0	C14:1c9 C16:0 C16:1t9	C14:1c9 C16:1t9

MRS: Control, MC: MRS + Colesterol, MCC: MRS + Colesterol + Ácido Cólico, MCT: MRS + Colesterol + Ácido Taurocólico, MCO: MRS + Colesterol + Ovgall

A continuación se detallan los hallazgos de cada una de las cepas analizadas. En las cepa *Lc.lactis lactis*, cuando la cepa se encuentra en presencia de colesterol y oxgall se detecta ácido oleico que en los otros medios no se detectó.

En la cepa *L. rhamnosus* se observa la presencia del ácido palmítico, cuando los medios cuentan como componente alguna sal biliar. El ácido palmiteláidico y el ácido oleico solo se detectaron en el medio con ácido cólico.

En *L. acidophilus* se detectó la presencia de ácido esteárico solo cuando en el medio se encuentra la presencia de ácido taurocólico.

En *L. fermentum* se detectó la presencia de ácido palmítico en presencia de colesterol, y ácido taurocólico y ácido palmitoleico cuando el microorganismo se encuentra en un medio con colesterol; el ácido elaídico se detecta en todos los medios, una situación similar se presenta en la cepa *L. casei shirota*, en la cual se detecta ácido palmítico cuando el medio cuenta con colesterol y ácido taurocólico y el ácido elaídico se encuentra en todos los medios.

En el caso de *Bifidobacterium sp.* es en el medio de con colesterol cuando se observan más cambios en el perfil de ácidos grasos llegando a detectar 6 de los 9 ácidos grasos analizados.

Finalmente, en el caso de las cepas *B. lactis* aislada de alimentos y de las cepas de referencia se observa que los cambios en el perfil de ácidos grasos es menor en comparación con los cambios observados en las demás cepas.

Los ácidos miristoleico, palmítico, palmiteláidico y elaídico los que se presentan en la mayoría de las cepas aunque estos cambios dependen también de los componentes en el medio de incubación.

En forma general se observa que la presencia de colesterol en el medio de cultivo incrementa la producción de ácidos grasos insaturados, así como también se incrementan al incorporar sales biliares en el medio de cultivo.

7.7. Desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH)

En la tabla 11 se observa que todas las cepas son capaces de desconjugar el ácido taurocólico a ácido cólico libre, lo cual sugiere que estas cepas secretan la enzima SBH, responsable de esta desconjugación; sin embargo el nivel de desconjugación es cepa dependiente, siendo *Lc. lactis lactis* aislada de alimentos, la que presenta mayor desconjugación con 0.450 $\mu\text{M/ml}$, la cepa que presento menor desconjugación fue *L. brevis* ATCC367 con una concentración de 0.437 $\mu\text{M/ml}$, aunque no se encontró diferencia significativa estadística entre ellas.

Tabla 11. Concentración de ácido cólico a partir de la desconjugación de ácido taurocólico por la acción de la enzima SBH secretada por bacterias probióticas.

Origen	Código	Cepa	Ác. Cólico a partir de ác. taurocólico [$\mu\text{M/ml}$]
Alimentos	1	<i>Lc. lactis lactis</i>	0.450±0.000
	2	<i>L. rhamnosus</i>	0.444±0.000
	4	<i>L. para paracasei</i>	0.442±0.000
	5	<i>L. acidophilus</i>	0.446±0.000
	6	<i>L. fermentum</i>	0.446±0.000
	7	<i>L. casei shirota</i>	0.439±0.000
	8	<i>Bifidobacterium sp.</i>	0.439±0.000
	9	<i>B. lactis</i>	0.445±0.000
	Referencia	10	<i>L. fermentum</i>
11		<i>L. brevis</i> ATCC367	0.437±0.000
12		<i>L. paracasei paracasei</i> LB30	0.443±0.000
17		<i>B. lactis</i> DSM10140	0.445±0.000

El análisis de varianza (ANOVA) el cual no muestra diferencias significativas entre las cepas ($p < 0.05$), y al realizarse las pruebas de Duncan no muestra ninguna igualdad entre las medias de las cepas que estuvieron en presencia de ácido taurocólico, teniendo un α de 0.05.

En la figura 12 se muestra los gráficos de las concentraciones de ácido cólico a partir de ácido taurocólico.

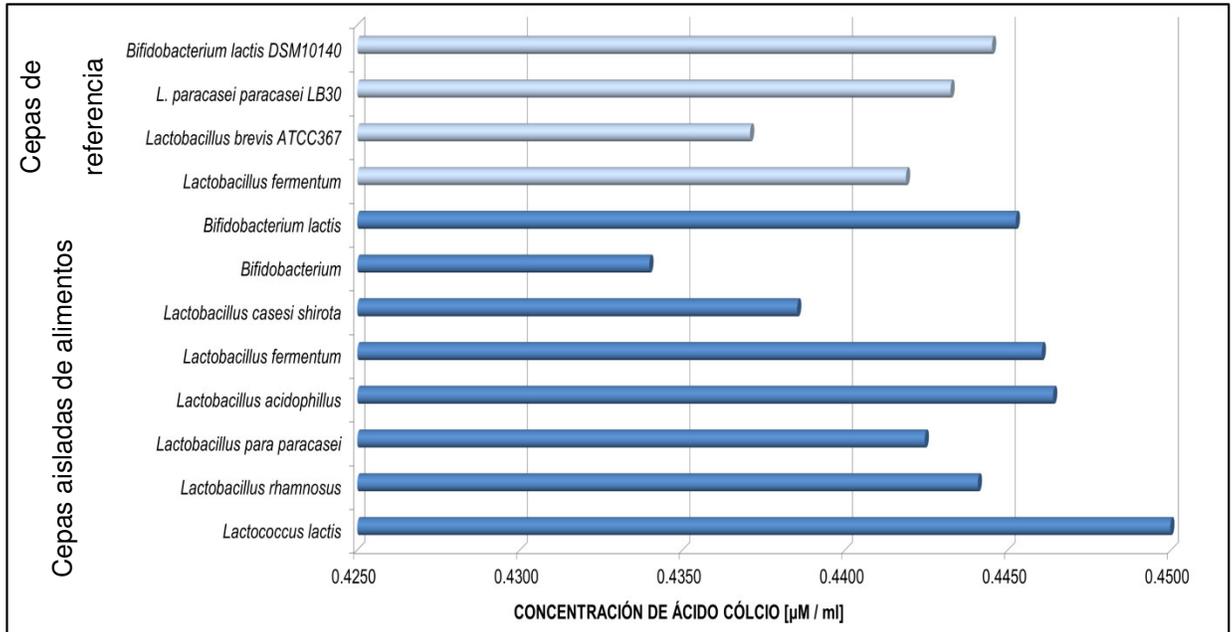


Figura 12. Concentración de ácido cólico en las cepas de trabajo. En la figura se muestran las concentraciones de ácido cólico a partir de ácido taurocólico presente en las distintas cepas de trabajo. Los resultados se expresan en la media de tres repeticiones de cada determinación.

7.8. Comparación entre los mecanismos de acción para reducir el colesterol de las cepas de trabajo.

En la tabla 12 se presenta un cuadro comparativo entre las cepas analizadas y los mecanismos de acción probados en cada uno.

Se puede observar que todas cepas presentan todos los mecanismos analizados, sin embargo, hay diferencias entre ellos, las cuales se describen a continuación.

En el caso de asimilación de colesterol se observa que todas las cepas son capaces de asimilar colesterol, pero algunas cepas son influenciadas por la concentración de sal biliar a las que son expuestas a tal punto que la asimilación de colesterol se ve altamente afectada, en esta situación se encuentra la cepa *L. rhamnosus* y *L. paracasei paracasei* LB30 que al

aumentar la concentración disminuye su capacidad de asimilar colesterol, al contrario de *B. lactis* DSM 10140 que a una concentración de 0.2% no presenta asimilación y al aumentar la concentración a 0.4% se observa asimilación de colesterol.

Para el mecanismo de producción de polisacáridos exocelulares y la unión de sales biliares a la superficie celular, se observa que todos los microorganismos estudiados son capaces de producir estas sustancias, sin embargo, su capacidad de unir sales biliares a la superficie celular es diferente entre las cepas y se ve influenciada por el tipo de sal biliar presente en el medio, ya que algunas cepas son capaces de unir ácido cólico, mientras que otras unen ácido taurocólico, solamente *Bifidobacterium sp*, *B. lactis* y *B. lactis* DSM 10140 tienen la característica de unir ambas sales biliares a los azúcares presentes en la superficie celular.

Para los últimos mecanismos analizados (perfil de ácidos grasos de la membrana celular y desconjugación de ácido taurocólico por la acción de la enzima sal biliar hidrolasa) se observa que cada una de las bacterias analizadas presentan ambos mecanismos.

Los resultados presentados permiten comprobar la hipótesis planteada de que los microorganismos probióticos utilizan diferentes mecanismos de acción para reducir el colesterol.

A pesar de lo descritos en los párrafos anteriores cabe señalar que la manera en que una de las cepas se comporta en cada uno de los mecanismos analizados es inherente a ella, para tener una visión más particular de cada una se puede revisar los apartados donde se describe a detalle cada uno de estos mecanismos.

Tabla 12. Mecanismos de acción de las cepas de trabajo

Origen	Cepa	Asimilación		exopolisácaridos			Unión a la suerficie		Cambios en la membrana	SBH
		0.2% oxgall	0.4% oxgall	Leche	Pentosas	Hexosas	Ác. cólico	Ác. Taurocólico	Acidos grasos	Desconjugación
Alimentos	<i>Lc. lactis lactis</i>	++	++	+	++	++	-	-	++	+++
	<i>L. rhamnosus</i>	++	+	++	++	++	++	-	++	++
	<i>L. para paracasei</i>	++	++	++	++	+++	-	-	++	+
	<i>L. acidophilus</i>	+++	++	++	++	++	-	++	++	++
	<i>L. fermentum</i>	++	+++	++	++	++	-	++	++	++
	<i>L. casei shirota</i>	++	++	++	++	++	+	-	++	++
	<i>Bifidobacterium sp.</i>	++	++	++	++	++	++	+	++	++
	<i>B. lactis</i>	++	++	++	++	+	++	+++	++	++
Referencia	<i>L. fermentum</i>	++	++	+++	++	++	+++	-	++	++
	<i>L. brevis</i> ATCC367	++	++	++	+++	++	++	-	++	+
	<i>L. paracasei paracasei</i> LB30	++	+	++	++	++	++	-	++	++
	<i>B. lactis</i> DSM10140	+	++	++	+	++	++	++	++	++

+ cepa que presento el valor mínimo

+++ cepa que presentó el valor máximo

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento de cepas y obtención de cultivo puro. Identificación de cepas probióticas por métodos bioquímicos (API®CH50) e identificación por métodos moleculares (PCR)

Los alimentos fermentados o que contienen microorganismos vivos son bien conocidos a lo largo del mundo, tradicionalmente este proceso se utilizaba, ya sea bien para aumentar la vida de anaquel o modificar las características organolépticas de los productos, pero la fermentación también puede mejorar el valor nutritivo de los alimentos al producir ciertas vitaminas y al descomponer ciertos factores no nutritivos. En épocas recientes se ha incrementado la evidencia de que algunas bacterias pueden mejorar la salud y metabolismo humano, lo cual ha aumentado el interés de la industria y consumidores en estos productos (Farnworth, 2008), sin embargo, es necesario fundamentar adecuadamente con estudios y ensayos científicos los beneficios proporcionados por estos microorganismos, por lo que las compañías que buscan etiquetar sus productos con declaraciones de salud pueden enfrentarse con una serie de problemáticas como son:

- La necesidad de contar con técnicas moleculares e informáticas por lo que se requiere contar con técnicas moleculares e informáticas para la adecuada identificación.
- Realizar la identificación hasta el nivel de cepa ya que las evidencias muestran que aun especies bacterianas cercanamente emparentadas pueden tener diferentes propiedades.

Además hay que tomar en consideración la necesidad de cuantificar la cantidad de UFC de cada uno de los microorganismos que componen el producto, además, de que los microorganismos deben permanecer viables hasta el momento del consumo, situaciones que normalmente no son declaradas en la etiqueta, sin mencionar, la comunicación deficiente al utilizar frases como “cultivos lácticos” para englobar una serie de microorganismos que no son declarados individualmente, declarando solo aquellas bacterias que

coinciden con el beneficio declarado en la etiqueta y en la mayoría de los casos no se declara la cantidad de UFC otorgadas al momento del consumo. La mayoría de las deficiencias señaladas con respecto a la información presentada en las etiquetas fueron observadas en los productos analizados, a excepción de un producto (G) que declara tanto la cepa contenida como la cantidad de UFC aportadas.

En el año 2002 la FAO/WHO emitió una serie de recomendaciones en las que expresan que los productos y suplementos que dicen contener probióticos deben de declarar la siguiente información en su etiquetado:

- a) Notificación de la presencia de bacteria viva;
- b) La naturaleza precisa de la bacteria;
- c) Números de cada especie, en unidades comprensibles para el consumidor y que sea microbiológicamente precisa;
- d) La cantidad mínima necesaria para declarar algún efecto en la salud, ya sea en términos numéricos de bacteria o de porciones; y
- e) La precisión del contenido al momento de la compra, no solo en algún momento de la etapa de fabricación (FAO/WHO, 2002).

Al utilizar la declaración de cultivos lácticos, en el cual se engloban las cepas que no están declaradas específicamente en la etiqueta se traduce en una falta de información al consumidor, tal y como lo reportará Martínez, González, Campos, Barba & Jiménez en (2008) y Yeung, Sanders, Kitts, Cano & Tong en (2002), cuyos estudios sugieren que el etiquetado inadecuado es común en los productos comerciales, al utilizar los métodos moleculares para la identificación de microorganismos obtuvieron altos porcentajes de confiabilidad (arriba del 80%) en la identificación de este tipo de microorganismos, lo que hace a la PCR un método confiable de identificación.

Los productos probióticos deben dar a conocer la cantidad de UFC que aporta el producto para que de esta manera el consumidor sepa si está ingiriendo la cantidad necesaria para que se produzca el efecto que está esperando, esta situación solo se presenta en solo uno de los productos (G),

ninguno de los otros productos analizados declaran la cantidad de UFC que aportan al consumo. Sin embargo, los hallazgos detectados coinciden con investigaciones realizadas tanto a nivel internacional, como nacional, el Consejo para la Ciencia y Tecnología Agrícolas, en Estados Unidos, ha documentado casos en los que los postulados que aparecen en las etiquetas en relación con el número y tipo de microorganismos viables presentes y la cantidad que hay que consumir para que se vea el beneficio a la salud no coincide, por esta razón sugieren que los fabricantes declaren en las etiquetas género, especie, cepa y la cantidad de células viables al final de la vida útil del producto (van Loveren et al, 2012 y Guarner et al., 2008).

Hallazgos similares fueron descritos por Scott-Weese, en (2003) quien analizó una veintena de productos probióticos comercializados en Ontario, Canadá encontrando que en un 43% de los productos los microorganismos estaban mal identificados, en un 25% mal escrito y solamente 9 estaban adecuadamente identificados. De igual manera, Hamilton, Shah & Winkler en (1998) detectaron en su estudio de calidad de etiquetado de alimentos y suplementos probióticos que los bioyogurths solo indicaban el tipo de cepa empleada, mas no así la cantidad de UFC contenidas, González-Martínez, Jiménez-Salas & Gómez-Treviño (2006) reportaron en un estudio realizado en México en 10 productos (entre alimentos y suplementos) que solo 40% los productos declaraban la cantidad de UFC, 20% solo declaraban el género y 20% utilizaban la frase “bacilos lácticos” o “productos lácteos fermentados” para declarar el usos de bacterias probióticas en su formulación. Siendo la apropiada identificación y nomenclatura de los microorganismos uno de los principales puntos al momento de valorar las propiedades de un alimento (van Loveren y colaboradores, 2012).

Por lo descrito anteriormente, cabe señalar que es una amplia área de oportunidad, por lo que se debe de mejorar la legislación en el país para estos productos.

Algunos organismos reguladores ya han incorporado estas disposiciones, como en Sudafrica, ya que desde el 2005 existe un proyecto de regulación de salud y alimentación que estipula que el etiquetado de los alimentos con probióticos deben de indicar el conteo de bacterias viables por gramo después de la vida de anaquel marcada en el producto, así como también el nombre científico completo de las especies de microorganismos presentes en el producto (Theunissen y colaboradores, 2005).

En nuestro país, aun no se incluyen estas disposiciones en la normatividad, Siguen empleándose nombres no correctos de microorganismos que denotan una función y se indican como marca registrada (por ejemplo, “defensis” o “acti-regularis”) violando claramente estas disposiciones internacionales.

8.2. Tolerancia al ácido

La mayoría de los microorganismos caracterizados como probióticos no han sido sometidos a pruebas de resistencia frente a ácidos, las cuales son imprescindibles ya que las respuestas varían de una especie a otra (Chou & Weimer, 1999). El pH del estómago es de 1.5 (Giannella, Broitman, & Zamchech, 1972) y, según Berada y cols. (1991), el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 minutos. Por lo que, según Chou y Weimer (1999), las pruebas *in vitro* de resistencia de microorganismos susceptibles a ser catalogados como probióticos deben verificar que son capaces de resistir ese tiempo y pH sin perder viabilidad (Chou & Weimer, 1999); cabe mencionar que varios estudios han demostrado que la matriz de alimentos consumidos juntamente con los probióticos pueden tener un efecto protector frente a los ácidos del estómago (Gardiner, Stanton, Lynch, Collins, Fitzgerald, & Ross, 2005).

Liong y Shah (2005a) probaron la sobrevivencia al ácido (pH 2) de cepas probióticas, específicamente 4 cepas de *L. acidophillus* y 7 cepas de *L. casei*, todas ellas de referencia, encontrando, en el caso de *L. acidophillus* que después de dos horas de exposición a un medio ácido el crecimiento de la

cepas disminuía de 3-5 ciclos logarítmicos, en este estudio la cepa se aisló de un producto alimenticio, su población se mantiene prácticamente igual a lo largo del tratamiento observando una disminución de 0.20 ciclos después de dos horas de exposición.

Al-Saleh, Metwalli y Abu-Tarboush (2006) trabajaron con tres cepas de *Lactobacillus acidophilus* (DSM 9126, DSM 20079 y DSM 20242), dos cepas de *Bifidobacterium* (*infantis* DSM 20088 y *angulatum* DSM 20098) y una cepa de *Streptococcus thermophilus* DSM 20617, en las cuales probaron entre otras cosas, su tolerancia al ácido (pH 2), encontrando que la viabilidad de los microorganismos, se veía marcadamente afectada después de 1.5 horas de incubación, sin embargo este efecto era diferente entre las cepas y se observó de un 10 – 30% de sobrevivencia, siendo la cepa más tolerante *B. angulatum* DSM 20098, concluyendo de que la tolerancia es cepa-dependiente; en el presente estudio también se observó esta característica, encontrando cepas que no toleran la acidez (*Lactococcus* sp. ATCC7963, *Bacillus coagulans* ATCC7050, *Bifidobacterium longum* ATCC15707 y *Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703 y las bacteria aislada de alimentos *Lactobacillus pentosus*), cepas que toleran parcialmente las condiciones ácidas (*Lactobacillus para paracasei* y *Lactobacillus casei shirota*, también aisladas de alimentos, decreció totalmente su viabilidad después de 30 y 15 minutos de incubación, respectivamente) o cepas que toleraron el medio ácido durante todo el tiempo de exposición, mostrando un 100% de sobrevivencia (*Bifidobacterium* sp. *Bifidobacterium lactis* (aisladas de alimentos) y *Bifidobacterium lactis* DSM10140). La sobrevivencia el resto de las cepas analizadas oscilo entre 42 y 98%.

Junto con estos hallazgos, los investigadores encontraron que al añadir 1% de leche descremada al medio aumentaba hasta un 35% la sobrevivencia de las cepas, lo que sugiere que tanto la matriz de donde fueron asiladas, los tipos de estrés a los que son sometidas las bacterias y los ingredientes del medio influyen en el comportamiento y por ende en la tolerancia de las cepas, y que las propiedades funcionales y tecnológicas de las mismas cepas pueden

variar en presencia de diferentes ingredientes alimenticios (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010).

8.3. Tolerancia a la bilis

Liong y Shah (2005a) observaron en un grupo de cepas de referencia de *L. acidophilus* y *L. casei*, al someterlas por un periodo de 12 horas a diferentes sales biliares (0.3% de ácido cólico, taurocólico u oxgall) éstas eran más tolerantes al ácido cólico que al taurocólico y que su tolerancia al oxgall variaba de cepa a cepa, en este estudio observamos que las cepas analizadas son más tolerantes al oxgall, luego al ácido taurocólico y finalmente al ácido cólico, lo que sugiere que la tolerancia es una característica cepa dependiente.

La tolerancia a la bilis es uno de los requerimientos que debe cumplir un microorganismo para poder ser estudiado como potencial probiótico, convirtiendo esta característica en un filtro para la elección de cepas de estudio, Pereira, McCartney & Gibson (2003) estudiaron 14 diferentes cepas probióticas de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* encontrando que la cepa *L. fermentum* KC5b era la más idónea para ser probada como probiótico debido a su tolerancia, entre otras cosas, a la bilis, hallazgos similares fueron hallados en este trabajo en el cual se inició trabajando con 17 cepas de las cuales se eligieron 12 para posteriores análisis en base a su tolerancia tanto al ácido como a la bilis.

La variación en la tolerancia a las sales biliares también fue demostrada por Shadeva y colaboradores (2011), en una investigación donde se trabajó con 5 diferentes leches fermentadas, de venta en Malasia, las cuales contenían alguno o algunos de los siguientes microorganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei*, y a los cuales se probó su tolerancia a la bilis (en concentraciones de 0%, 0.3% y 2.0%) encontrando que al aumentar la concentración disminuía la viabilidad de la cepa, sin embargo, cada grupo de microorganismos (en base al producto del cual fueron aislados) se comportó de manera diferente, siendo el producto fermentado con *L. casei shirota* el que

mostraba mayor tolerancia en las 3 concentraciones probadas. Lo anterior, al igual que las observaciones realizadas en este trabajo, muestran que la tolerancia a la bilis es cepa dependiente y que estas características particulares de cada microorganismo los hace más idóneos para ser utilizados como probióticos en el desarrollo de alimentos y suplementos funcionales.

8.4. Asimilación de colesterol

Las cepas probióticas deben estar viables y en fase de crecimiento para asimilar el colesterol, esto según los hallazgos reportados por Liong y Shah (2005a) y por Tahri, Crociani, Ballongue & Schneider (1995), estos últimos observaron que cepas de *Bifidobacterium sp.* en fase de crecimiento eran capaces de reducir el colesterol del medio en presencia de oxgall como sal biliar a través de la asimilación de colesterol, lo cual coincide con los hallazgos realizados en este trabajo en el que se encontró que la cepa *Bifidobacterium sp.* era capaz de asimilar colesterol entre 35.73% y 27.89% cuando la concentración de oxgall se era de 0.2% y 0.4% respectivamente.

Gilliland, Nelson y Maxwell (1985) reportan que la asimilación de colesterol ocurre solamente cuando el cultivo crece en presencia de bilis en condiciones anaeróbicas, observando que a medida que se incrementaba la concentración de oxgall (desde 0.1% hasta 0.4%) aumentaba la asimilación de colesterol y que esta asimilación se estabilizaba cuando la concentración de oxgall llegaba a 0.5%; estas observaciones fueron realizadas en la cepa *L. acidophilus* NCFM (de origen humano); resultados similares se encontraron en la presente investigación en las cepas *Lc. lactis lactis*, *L. pentosus*, *L. fermentum*, aisladas de alimentos y en *L. fermentum* y *B. lactis* DSM10140 utilizadas en este trabajo, en las cuales al aumentar la concentración de bilis de 0.2% a 0.4% la asimilación de colesterol aumentó entre 10.42 – 48.21%, sin embargo en las otras 8 cepas analizadas no se observó este comportamiento.

Singhal, Joshi & Chaudhary (2011), encontraron que los probióticos, específicamente cepas de *Lactobacillus*, muestran su mayor asimilación de colesterol cuando la concentración inicial en el medio es de 100 µg/ml, la cual

fue la concentración utilizada en este trabajo, lo que sugiere que las asimilaciones reportadas en este trabajo pueden ser los valores máximos de las cepas analizadas.

Belviso y colaboradores (2009) estudiaron la capacidad de reducir colesterol *in vitro* de 8 *Lactobacillus plantarum* y 5 *Lactobacillus paracasei* aisladas de un queso italiano encontrando que 2 cepas de *L. plantarum* y 3 de *L. paracasei* fueron las más capaces de reducir el colesterol entre un 19.4% y un 6.8% respectivamente, lo cual evidencia, como lo observado en este estudio, que aun cuando las cepas estén cercanamente emparentadas su capacidad de reducir colesterol es cepa dependiente; similares observaciones realizó Dilmi-Bouras (2006) notando una considerable variación tanto entre diferentes especies estudiadas como entre cepas de la misma especie, en la asimilación de colesterol en un medio sintético, en presencia de diferentes concentraciones de sal biliar y en condiciones anaeróbicas.

8.5. Determinación de polisacáridos exocelulares (EPS)

Se ha reportado producción de exopolisacáridos en los siguiente microorganismos: *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus diolivorans*, *Pediococcus parvulus*, *Oenococcus oeni*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum*. Las cepas de bacterias lácticas productoras de EPS se han aislado de numerosos productos lácteos fermentados naturales y aquellas capaces de conferir propiedades sensoriales como viscosidad y textura, se han seleccionado como “cultivos funcionales” en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas, sin embargo, estos mismos microorganismos pueden llegar a desencadenar alteraciones como sabores ácidos, malos olores, cambios de color, formación de gas y caída del pH en productos como la leche, zumos de frutas y bebidas como la sidra, el vino o la cerveza, así como, en productos cárnicos procesados “*ready to eat*”,

como el jamón york y las salchichas tipo Frankfurt lo que hace que estos productos no puedan ser comercializados (Aznar, Dueñas, Jiménez, López, & Ruas-Madiedo, 2012).

Por otro lado los EPS bacterianos pueden incidir beneficiosamente en la salud humana ya sea como agentes prebióticos, inmunomoduladores y en investigaciones recientes se les ha relacionado con efectos positivos como antitumorales, actividad inmunoestimuladora y disminución del colesterol (Tok & Aslim, 2010; Aznar, Dueñas, Jiménez, López, & Ruas-Madiedo, 2012).

En cuanto a la disminución del colesterol, se cree que los EPS actúan interfiriendo en la absorción del colesterol o sobre las sales biliares a nivel del intestino mediante la unión y/o remoción del cuerpo de forma similar como lo hacen los polisacáridos o la fibra dietética, según los hallazgos realizados por Nakajima, Susuki, Kaizu & Hirota (1992); resultados similares fueron encontrados por Tok y Aslim (2010) quienes encontraron que la remoción de colesterol en cepas de *Lactobacillus delbrueckii* sub. *bulgaricus* era directamente proporcional a la producción de exopolisacáridos de la cepa y que cuando había colesterol presente en el medio la producción de EPS aumentaba, contrario a los hallazgos reportados en estas investigaciones, en el presente trabajo se observa que las bacterias analizadas aun y cuando todas producen exopolisacáridos su capacidad de adherir sales biliares a la membrana es inherente a cada cepa, lo que finalmente influirá en su capacidad de disminuir el colesterol y por ende de ser utilizado como parte de algún alimento funcional para este fin.

Kimoto-Nira y colaboradores (2007) sugirieron que el colesterol se unía a la membrana celular de los probióticos debido a las propiedades químicas y estructurales de los peptidoglicanos que se encuentran en la membrana, lo cual facilita la unión del colesterol a la superficie probiótica interviniendo así en el metabolismo de este compuesto, lo cual sugiere que los exopolisacáridos pueden actuar sobre las sales biliares, como se estudió en este trabajo, pero también pueden actuar directamente sobre la molécula de colesterol.

8.6. Perfil de ácidos grasos de las membranas probióticas

El HCl metánolico no es capaz de metilar los ácidos grasos libres, por lo que los ácidos grasos determinados por este método deben de encontrarse como parte de la membrana fosfolípida, sumado a esto se sabe que los lípidos de las bacterias gram positivas se encuentran predominantemente en la membrana (Kimoto y colaboradores., 2002). El colesterol removido *in vitro* puede incorporarse dentro de la membrana celular lo que se evidencia en una alteración en el perfil de ácidos grasos (Liong & Shah, 2005a). Lye, Rusul y Liong observaron cambios en los ácidos grasos celulares de bacterias probióticas (15 microorganismos entre lactobacilos y bifidobacterias), especialmente en los ácidos grasos totales y ácidos grasos saturados e insaturados cuando estos se encontraban en presencia de colesterol, pero que el cambio también se veía influenciado por la presencia o ausencia de sal biliar en el medio, así como el tipo de sal biliar; observaciones que también fueron realizadas en esta investigación al encontrar que la producción de diferentes ácidos grasos al cultivarlos en presencia de sales biliares, así como el incremento en ácidos grasos insaturados y ácidos grasos trans.

Los cambios en los ácidos grasos de la membrana debido a la incorporación de colesterol se ve evidenciada por las alteraciones de los perfiles que los ácidos grasos tienen en presencia de colesterol Remagni y colaboradores (2012) trabajaron con *L. plantarum* 885 y *L. acidophilus* LA-5® quienes encontraron que ambas cepas mostraron diferencias en el perfil de ácidos grasos independientemente de la presencia del colesterol y que *L. plantarum* 885 tiene mayor porcentaje de AG saturados en comparación de *L. acidophilus* LA-5®, similitudes pueden observarse en este trabajo, donde aún y que todas las cepas presentaron cambios en sus membrana, estos cambios fueron particulares de cada microorganismo.

8.7. Desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa (SBH)

Diversas investigaciones han reportado que la capacidad de desconjugar sales biliares dependen de la cepa y del tipo de sal biliar conjugada, así como

de variaciones en las condiciones de crecimiento (bajo potencial de oxidoreducción y un pH óptimo de 6) y de los procedimientos del ensayo (Gilliland y Speck, 1977). Se ha reportado que *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. johnsonii* son SBH activas (Yildiz, Öztürk, & Aslim, 2011).

Gökce, Öztürk, & Aslim (2011), encontraron que *L. plantarum* GD2 puede desconjugar hasta 0.50 μM , mientras que tres cepas de *L. rhamnosus* o bien no presentan la capacidad o desconjugar hasta 0.61 μM de ácido cólico a partir de ácido taurocólico, lo que evidencia que la propiedad de desconjugar sales biliares es cepa dependiente, sobre todo en el caso de *L. rhamnosus* que tiene un amplio rango de desconjugación según la cepa utilizada, en este estudio las cepas que presentaron mayor capacidad de desconjugar sales biliares fueron *L. casei shirota* y *L. fermentum*, ambas aisladas de alimentos, llegando a desconjugar hasta 0.446 $\mu\text{M}/\text{ml}$, en el caso específico de *L. rhamnosus* nosotros encontramos que desconjuga 0.444 $\mu\text{M}/\text{ml}$ cantidad que se encuentra dentro del rango del autor citado anteriormente.

Lima-Santos, Fortes-Ferreira, Brunoro-Costa & Terra-Santos (2013) demostraron que las cepas *L. acidophilus*, *L. casei shirota* y *L. acidophilus* NCFM, tienen la capacidad de desconjugar ácido taurocólico *in vitro*, lo que sugiere que estas cepas pueden ser utilizadas para tratar la hipercolesterolemia, pero al incluir estos probióticos como parte de la dieta de ratas utilizadas como organismos modelos, sus niveles de colesterol y triglicéridos no se vieron afectados, y la excreción de ácidos biliares en suero tampoco mostraron diferencias, sin embargo Usman y Hosono (2000) demostraron en un grupo de ratas a las cuales se les suplementó la dieta con *L. gasseri* observaron una reducción en la concentración de ácidos biliares en suero cuando aumentaba su excreción en las heces, lo anterior demuestra la importancia de corroborar los hallazgos de las pruebas *in vitro* en organismos modelos e incluso en humanos antes de utilizar un probiótico como coadyuvante de un tratamiento farmacológico.

Todo lo anterior sugiere que los microorganismos probióticos analizados en el presente trabajo poseen diferentes mecanismos hipotetizados para disminuir el colesterol como lo son: la asimilación de colesterol, la producción de exopolisacáridos, cambios en el perfil lipídico de la membrana en presencia de colesterol y desconjugación de sales biliares por acción de la enzima sal biliar hidrolasa.

Sin embargo se requiere de más investigación para dilucidar el mecanismo o la sinergia entre mecanismos encargados de disminuir el colesterol, así como las condiciones idóneas (pH, concentración de bilis, sales biliares, enzimas, etcétera) que intervienen en el efecto reductor.

También es importante caracterizar cada uno de los mecanismos estudiados, para conocer exactamente su acción directa o indirecta sobre el colesterol.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La capacidad de tolerar el ácido y bilis y mantener la viabilidad son características particulares de cada cepa y son requisitos indispensable que deben de tomarse en cuenta al momento de elegir un microorganismos para su uso como probiótico, ya que estas características nos aseguran la sobrevivencia de estas cepas hasta el colon que es finalmente el lugar donde realizan la mayoría de funciones documentadas.

Todas las cepas fueron capaces de asimilar colesterol, sin embargo, el porcentaje de asimilación se ve influenciado por el tipo de cepa y por la concentración de sales biliares a las que están se encuentran expuestas.

Aun y cuando todas las cepas fueron capaces de producir exopolisacáridos no todas fueron capaces de unir sales biliares a la membrana, lo cual sugiere que aquellas que no tienen esta propiedad, no pueden reducir los niveles de colesterol por este mecanismo, sin embargo, es importante probar otros tipos de sales biliares o incluso concentraciones para ver la diferencia e interacción con ellas y así descartar si son o no propensas a utilizar este mecanismo. Cabe agregar que otras investigaciones sugieren que los EPS actúan directamente sobre la molécula del colesterol, uniéndose a la superficie celular por lo que sería importante probar como las los EPS producidos por las bacterias utilizadas en este trabajo interactúan con el colesterol.

Las alteraciones en el perfil de ácidos grasos se ven influenciado por los componentes del medio, en particular por el tipo de sal biliar presente, aun y cuando en todas las bacterias analizadas se observaron estas modificaciones. Igualmente se observa que la incorporación del colesterol incrementa la formación de ácidos grasos insaturados en la membrana de la célula, además el contenido de ácidos grasos trans se incrementó en algunas cepas, principalmente con adición de ácido cólico, como en el caso de *L. rhamnosus* y *B.lactis*.

Todas las cepas analizadas fueron capaces de desconjugar ácido taurocólico a ácido cólico libre, lo que sugiere la presencia y actividad de la enzima sal biliar hidrolasa, es importante probar diferentes tipos de sales biliares para ver cómo se comportan los microorganismos ante estas, así como analizar la actividad de la enzima, ya que aunque ésta se encuentre presente, podría ser que su actividad no sea suficiente y el efecto final no sea el esperado para una reducción significativa de colesterol.

Las características y propiedades de los microorganismos probióticos son cepa- dependiente, por lo que es necesario conocerlos, así como estudiar su interacción con otros microorganismos y con las diferentes matrices en las que pueden ser administrados, para de esta forma asegurar la viabilidad y efecto deseado al momento de utilizarlos para el desarrollo de suplementos y alimentos funcionales, sin embargo, cabe destacar que las características de cada consumidor (lugar de residencia, hábitos alimenticios, entre otros) también pueden influir en el efecto final por lo que estos productos pueden y deben ser utilizados junto con un tratamiento adecuado para el padecimiento para el que son desarrollados más nunca sustituirlo por completo.

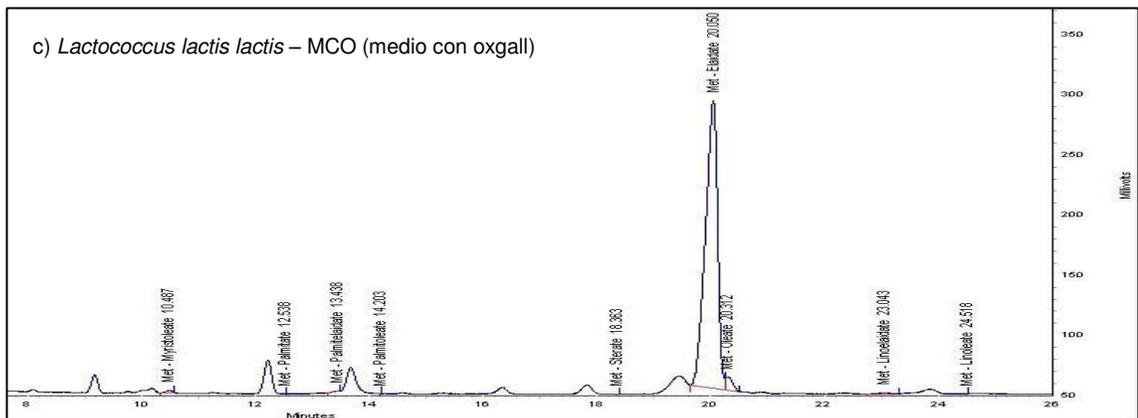
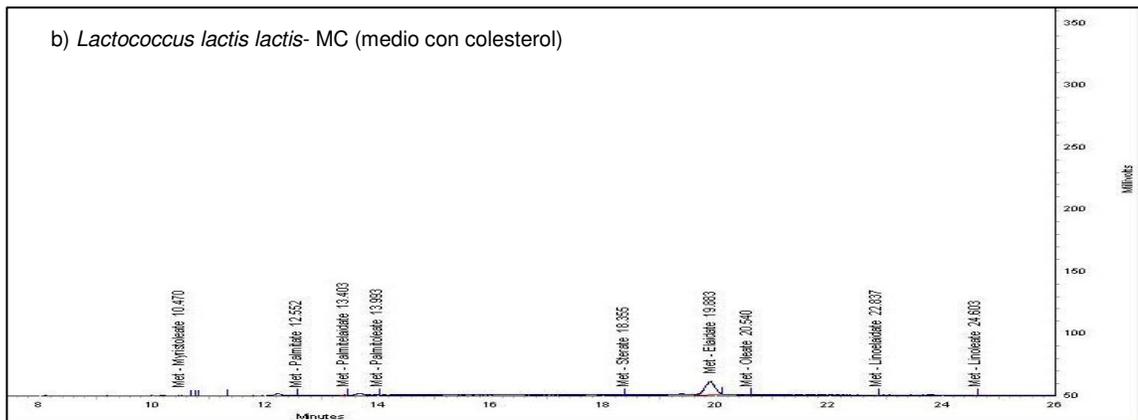
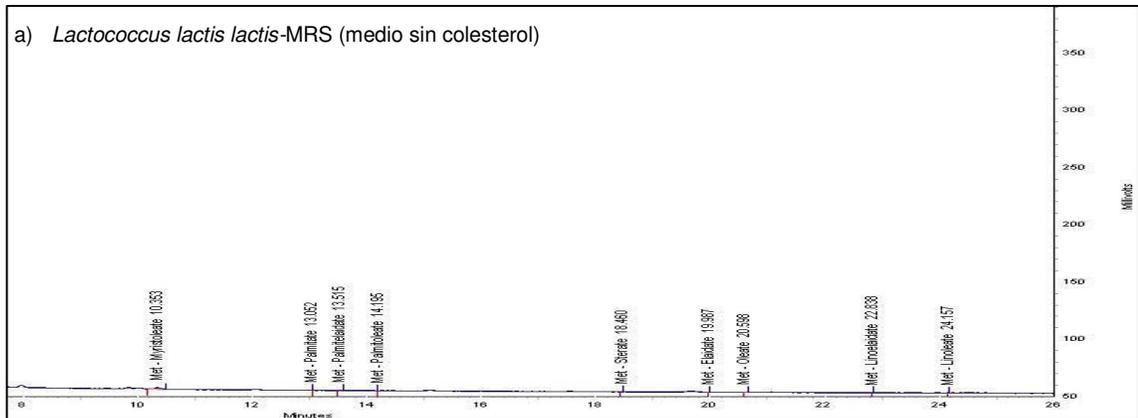
9.1. Recomendaciones

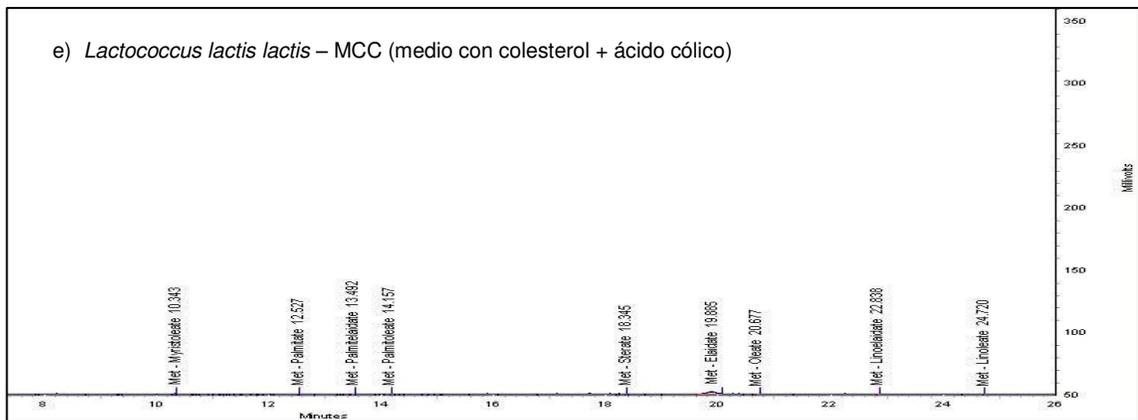
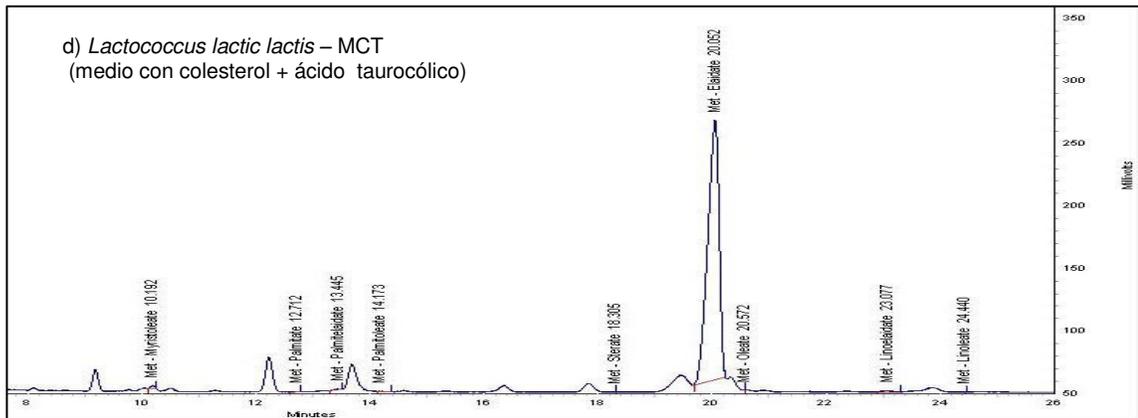
1. Asegurar que los productos con uso de probióticos cumplan con la normatividad internacional.
2. Reglamentar el uso de microorganismos probióticos mediante el desarrollo de reglamentación específica para estos productos.
3. Continuar con las investigaciones en asimilación de colesterol, producción de exopolisacáridos, cambios en la membrana lipídica por presencia de colesterol, desconjugación de sales biliares por la acción de la enzima sal biliar hidrolasa.
4. Utilizar con reserva los probióticos para el tratamiento exclusivo de enfermedades, ya que aun no se conoce la participación de muchos factores que pueden influir en la generación de los efectos benéficos.

10. ANEXOS

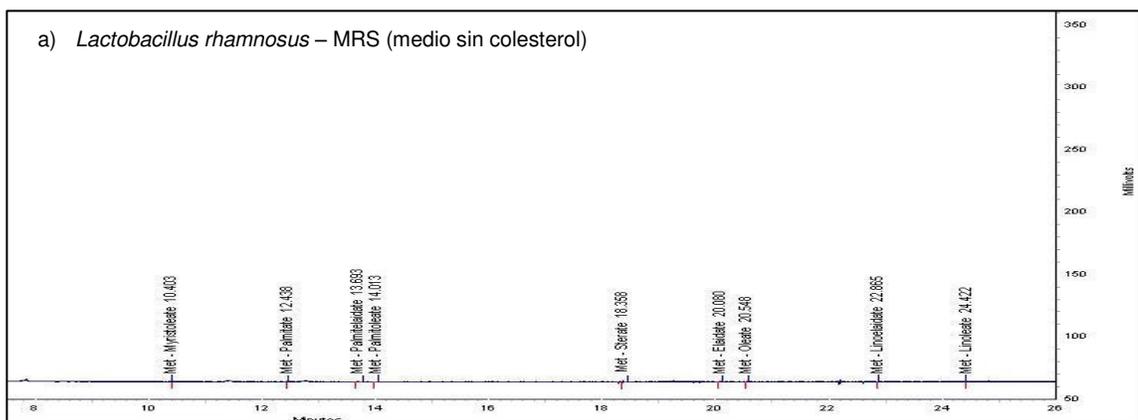
ANEXO 1. Cromatogramas del perfil de lípidos de las cepas analizadas en presencia de colesterol y sales biliares.

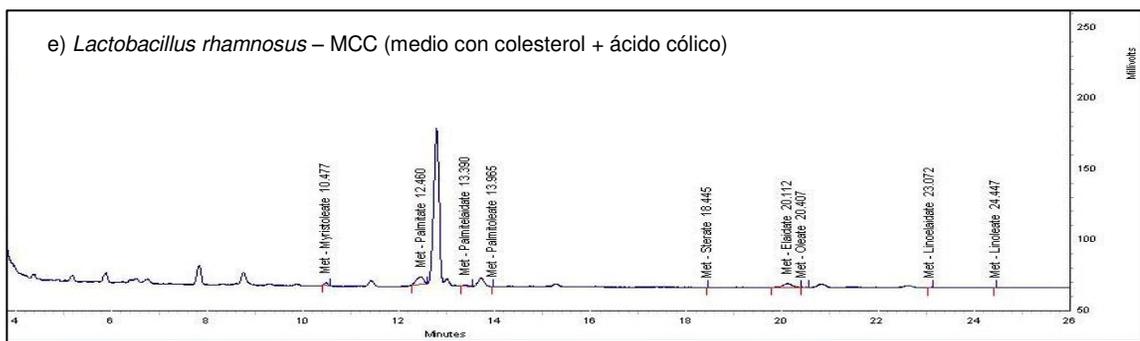
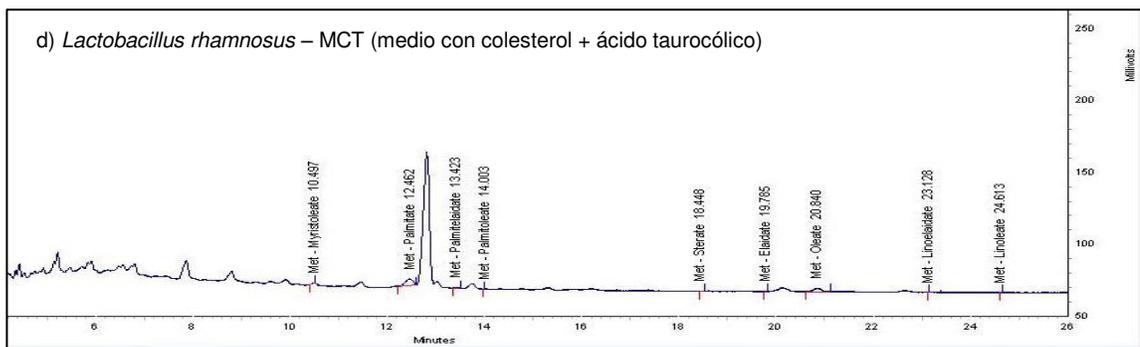
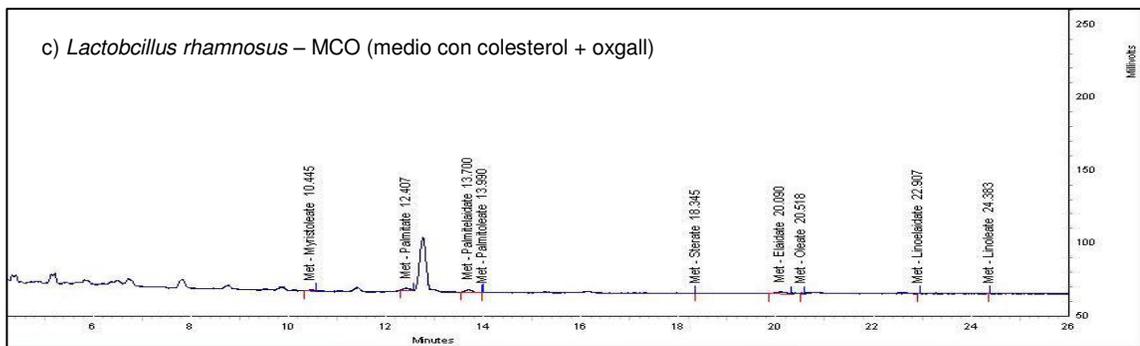
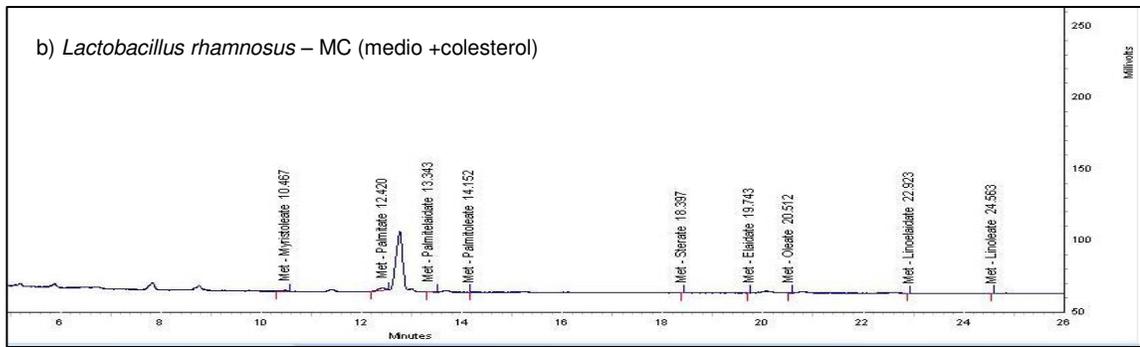
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactococcus lactis lactis*.





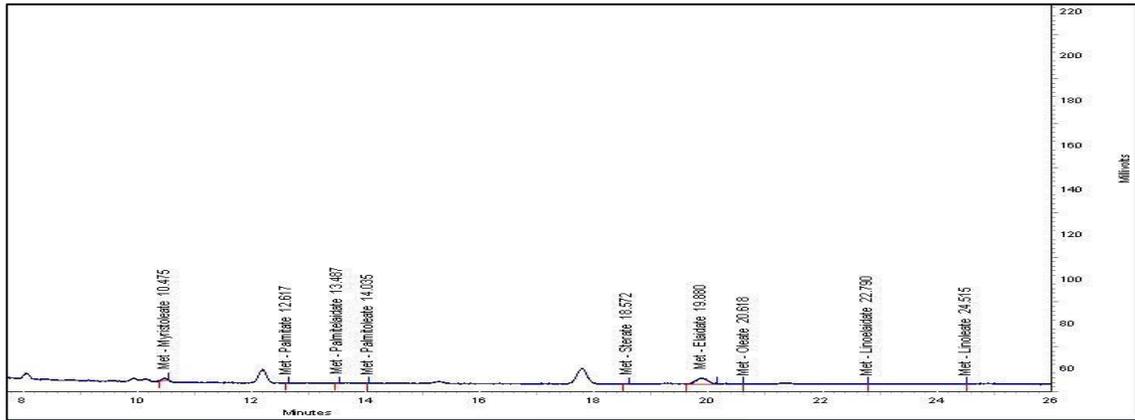
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus rhamnosus*.



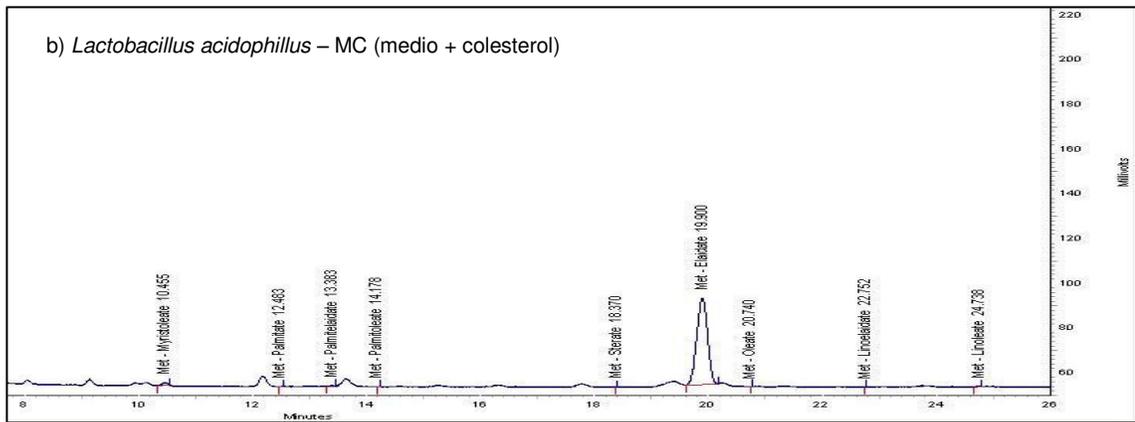


Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus acidophilus*.

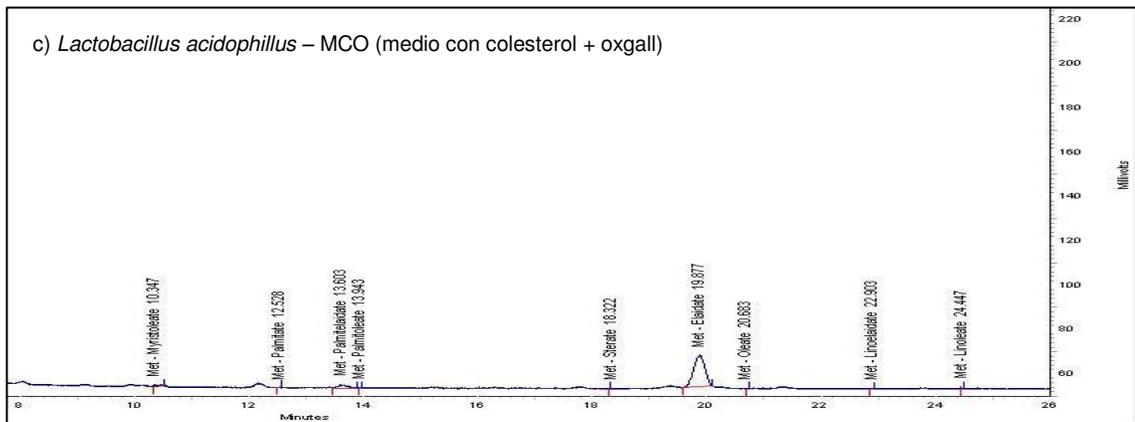
a) *Lactobacillus acidophilus* – MRS (medio sin colesterol)

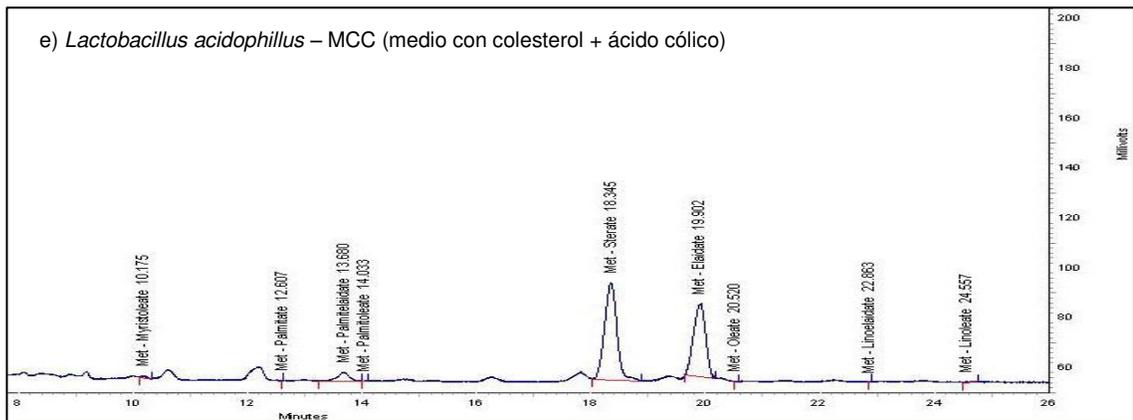
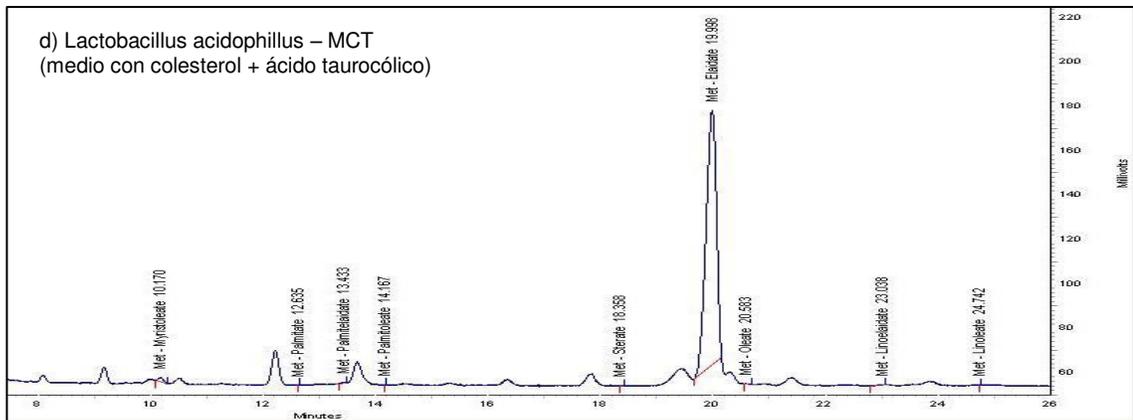


b) *Lactobacillus acidophilus* – MC (medio + colesterol)

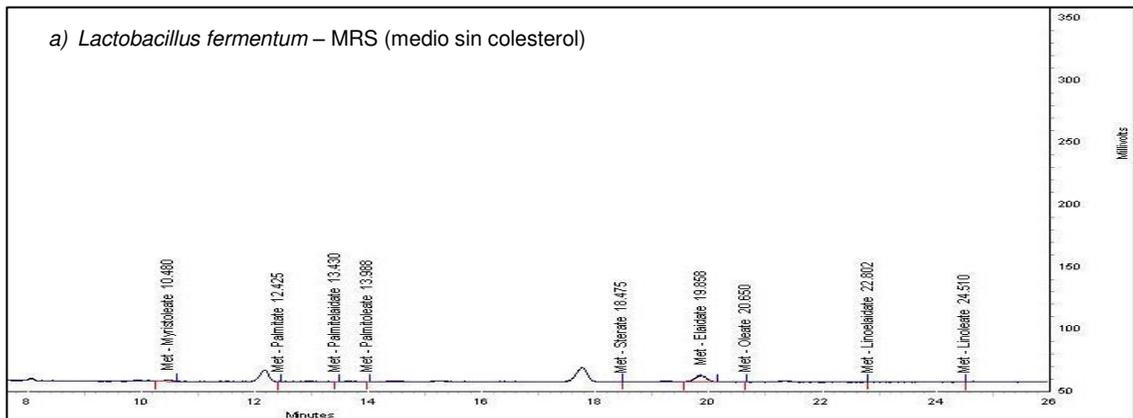


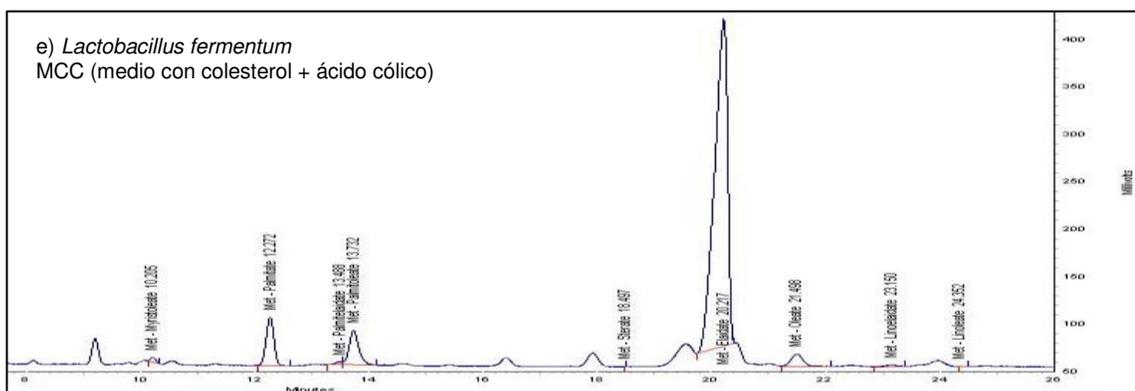
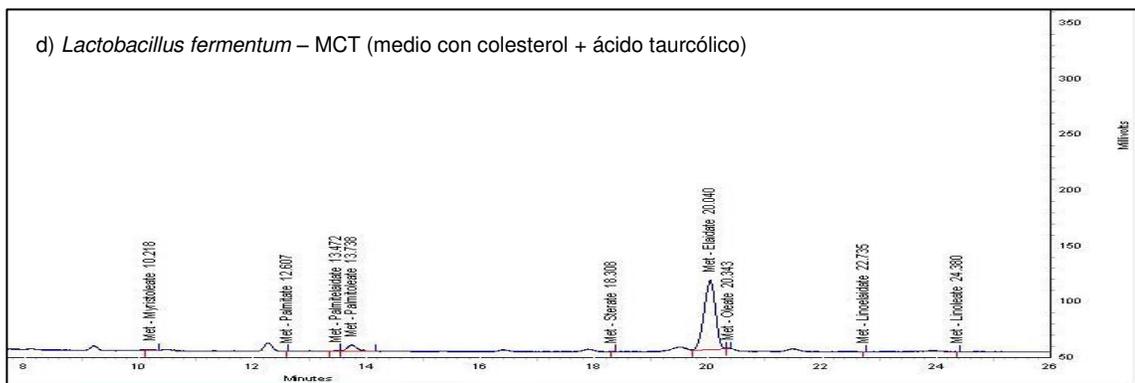
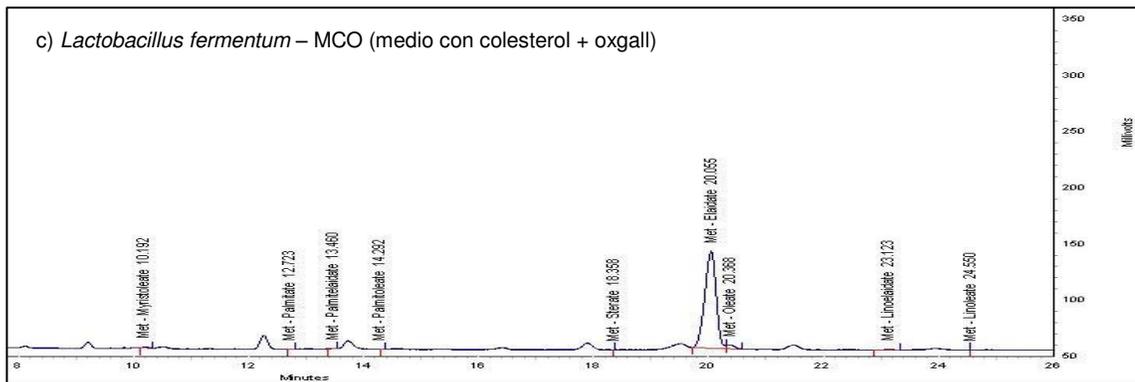
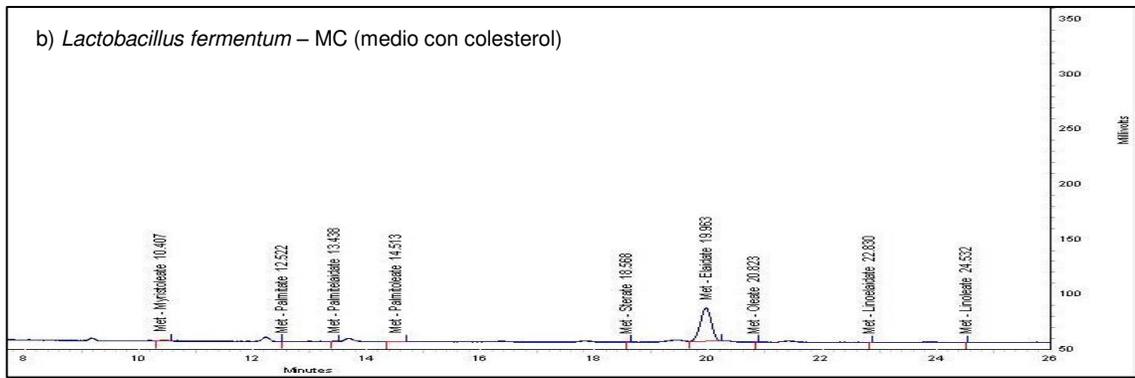
c) *Lactobacillus acidophilus* – MCO (medio con colesterol + oxgall)



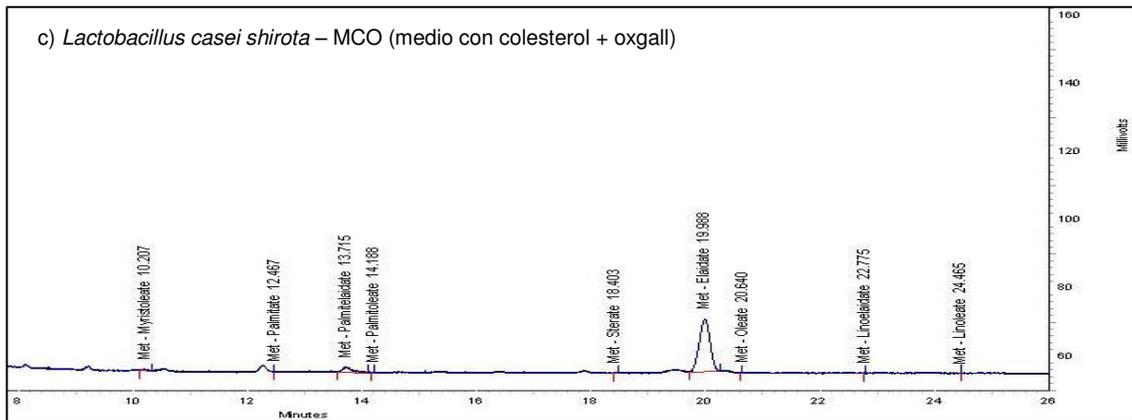
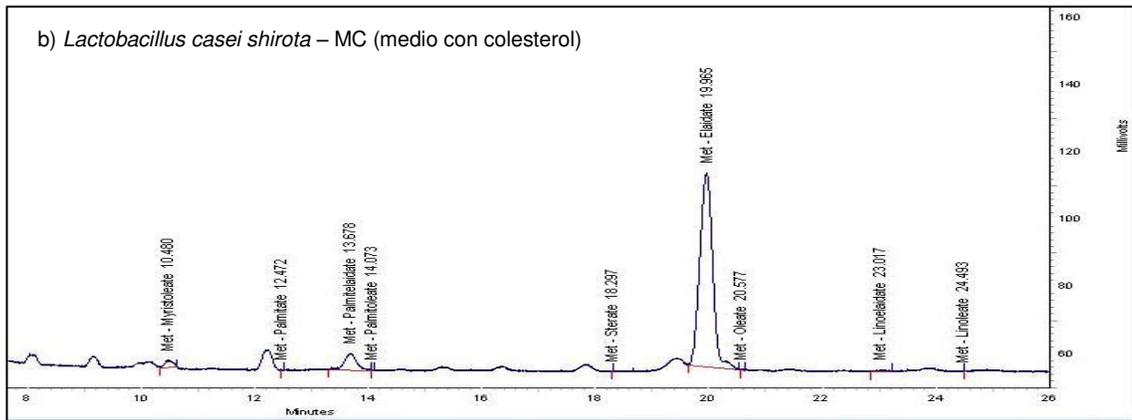
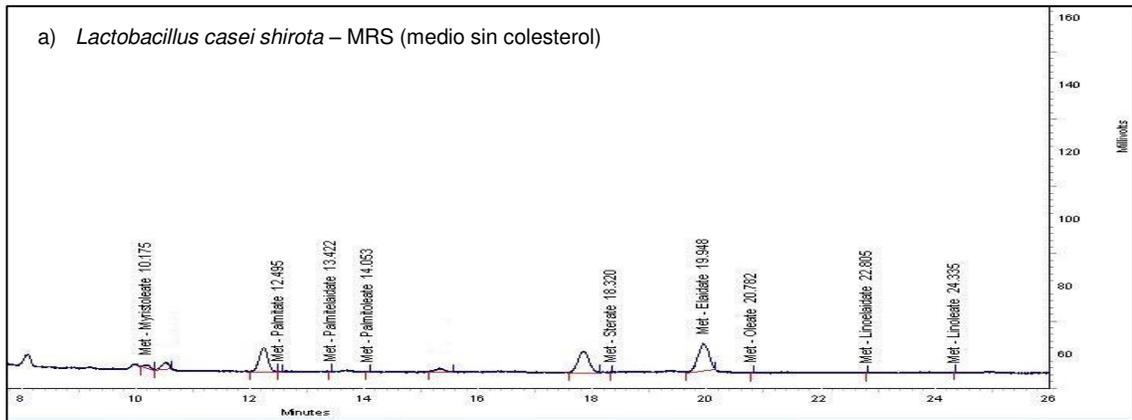


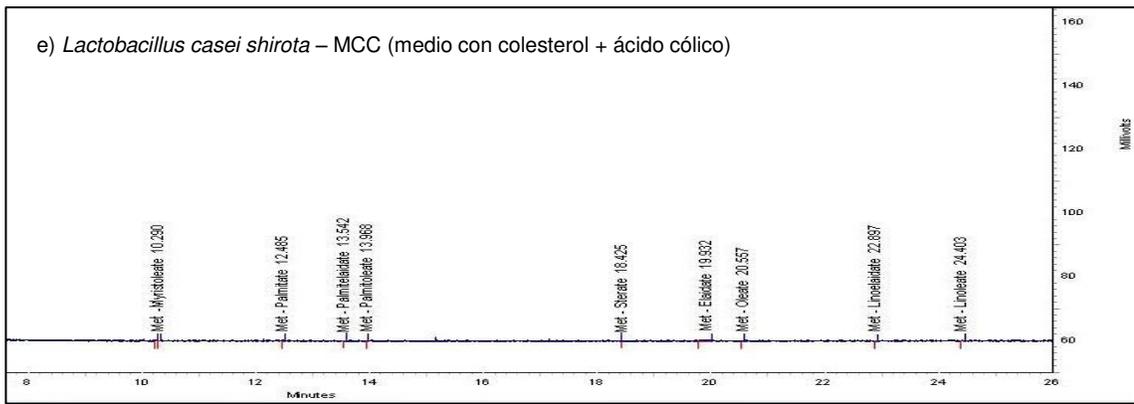
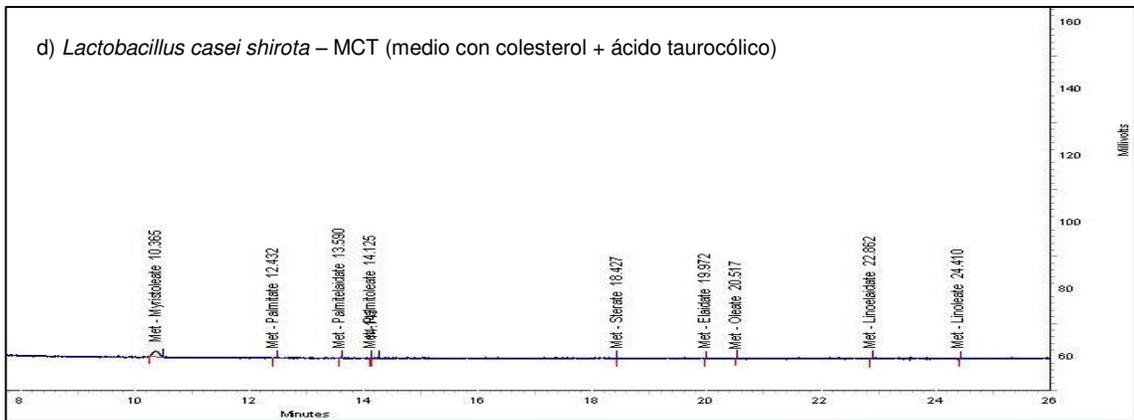
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus fermentum*.



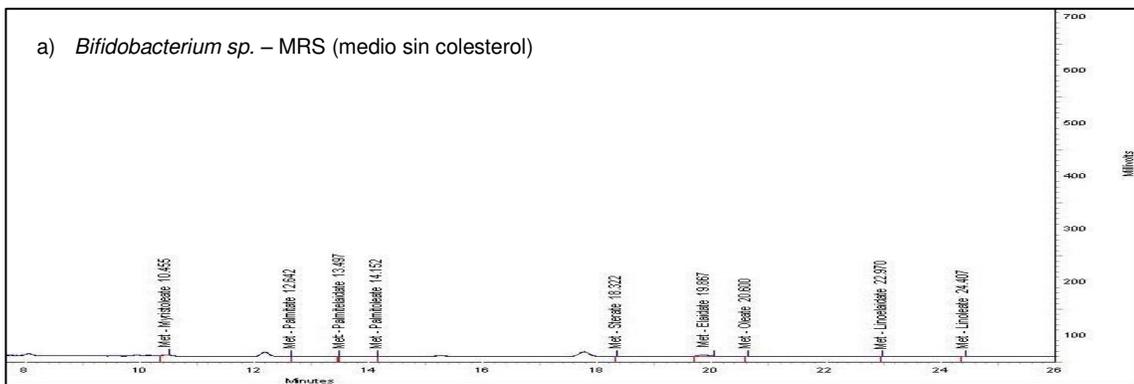


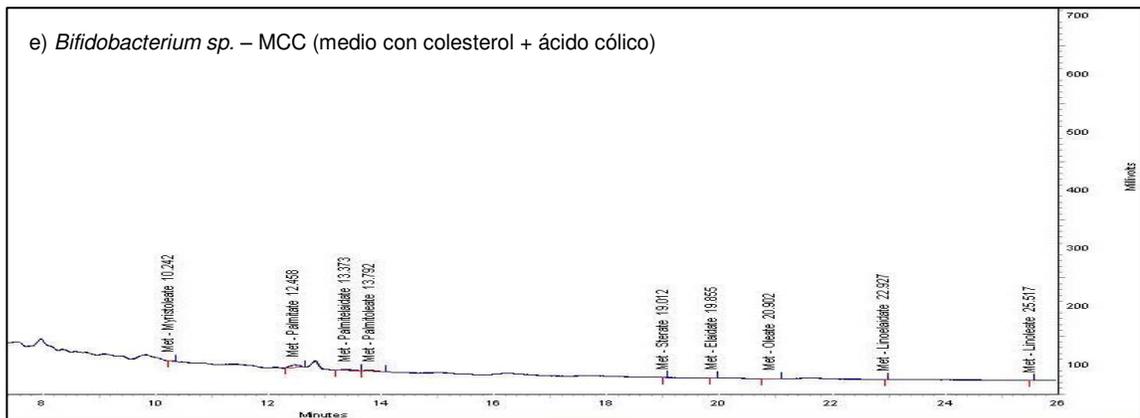
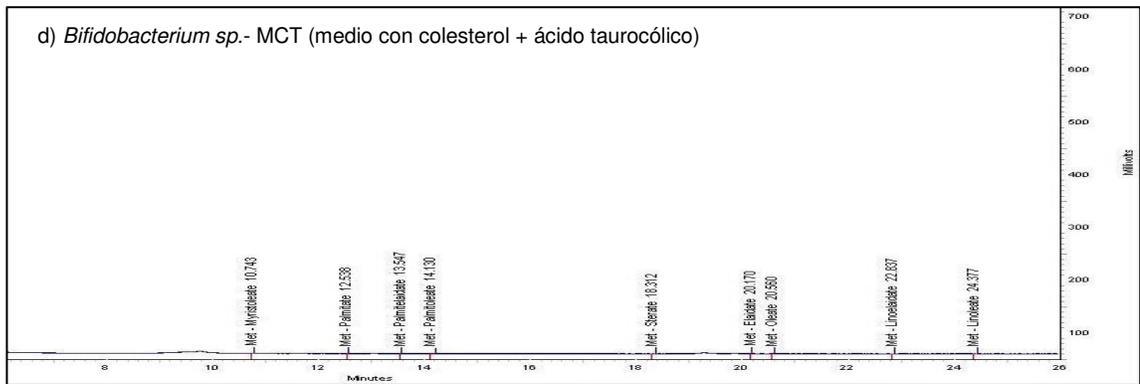
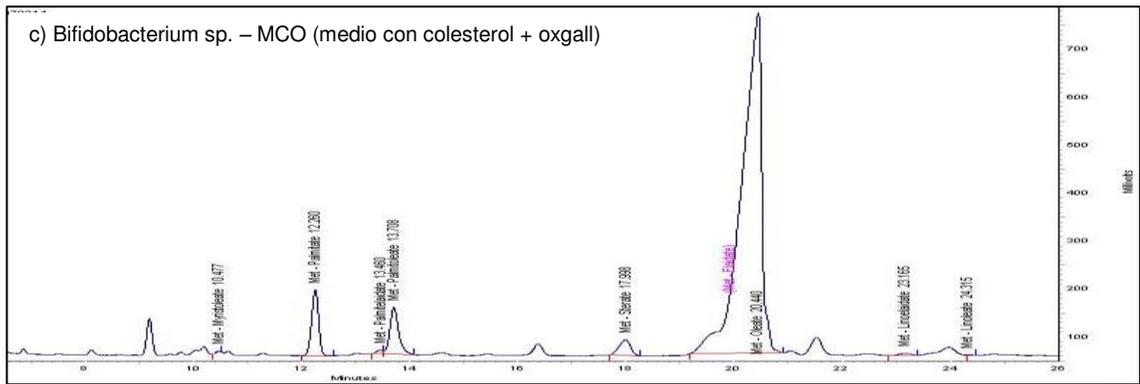
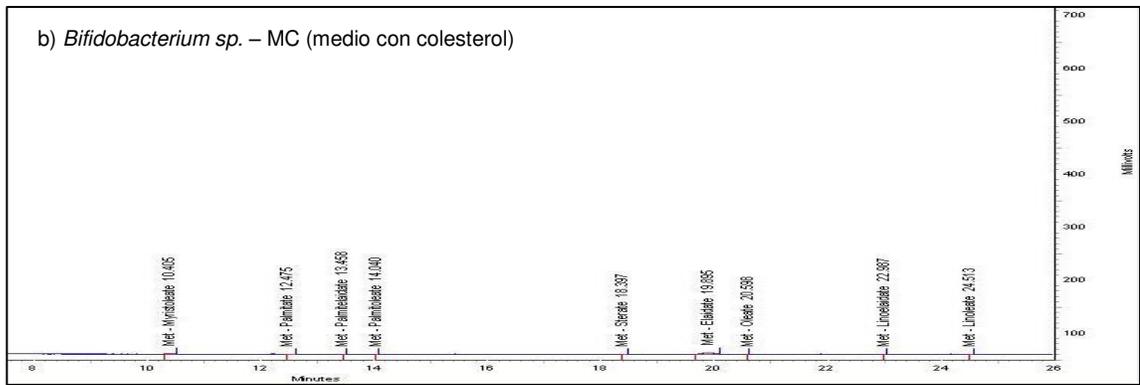
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus casei shirota*.



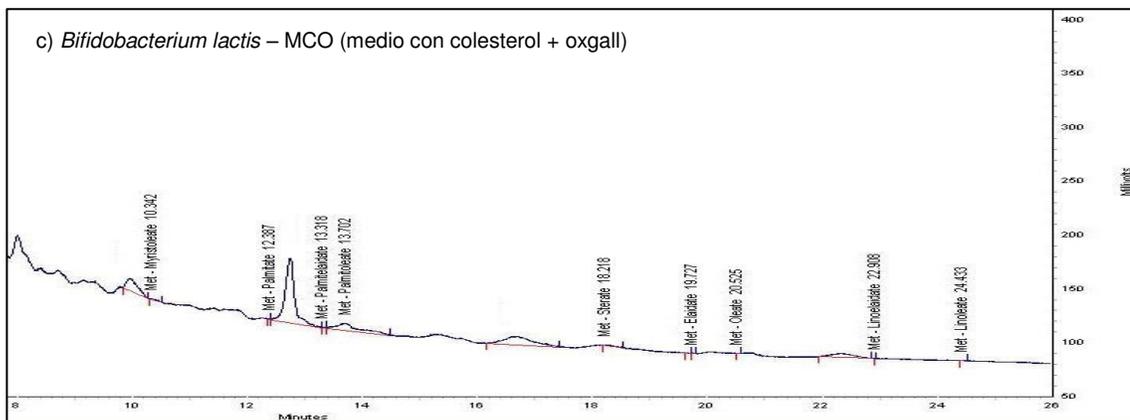
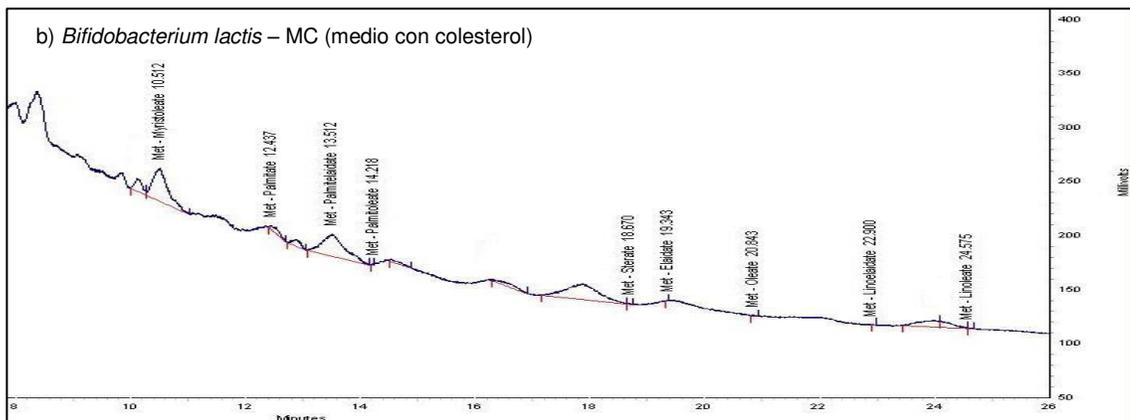
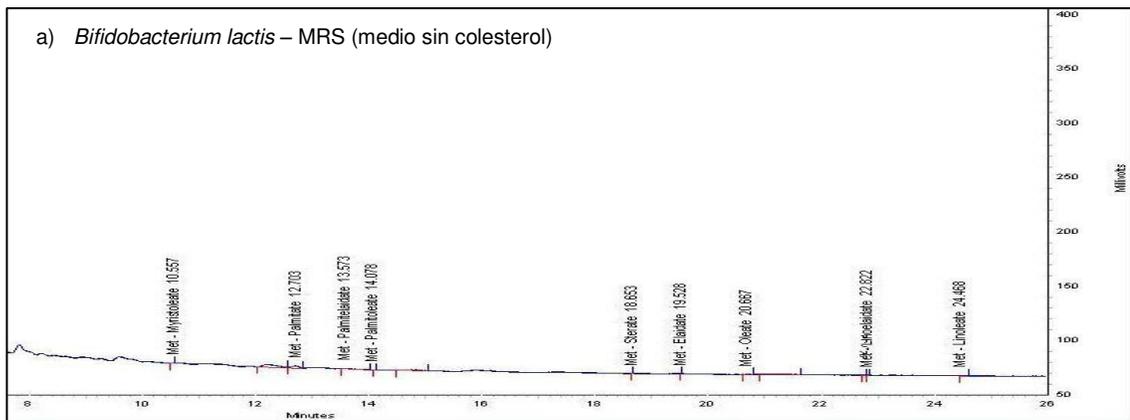


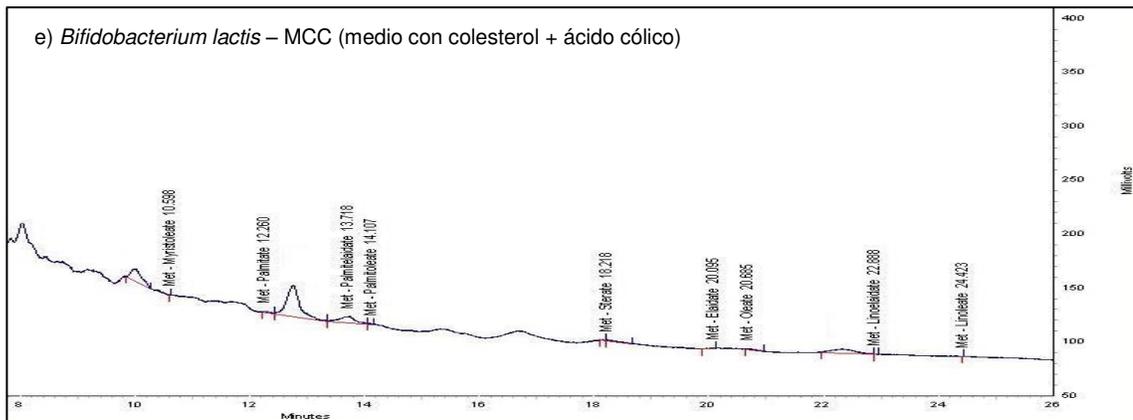
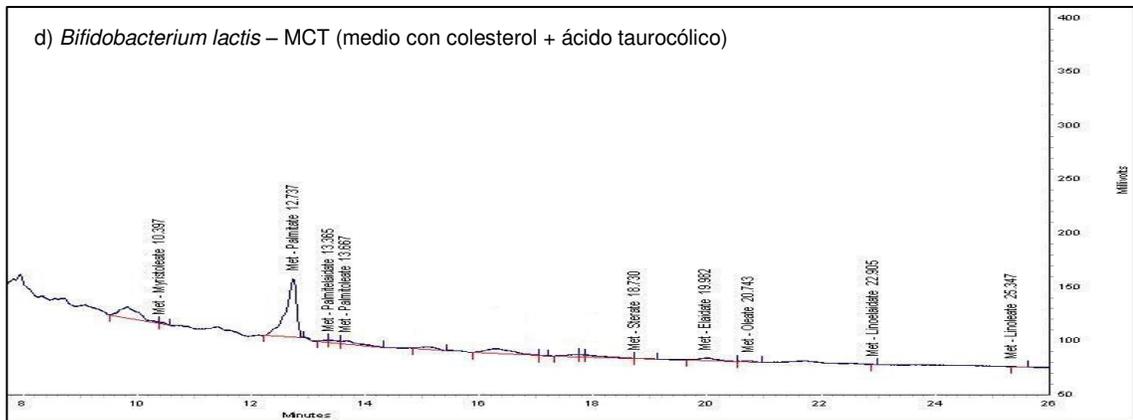
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Bifidobacterium sp.*



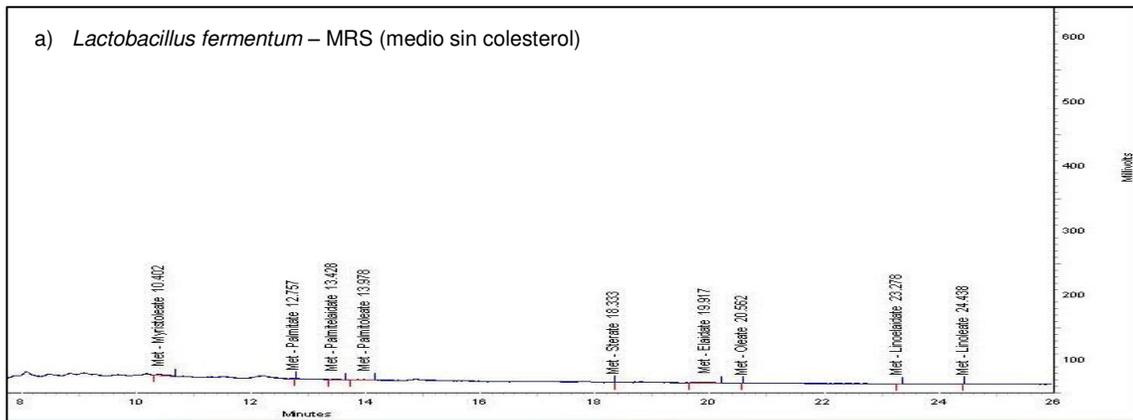


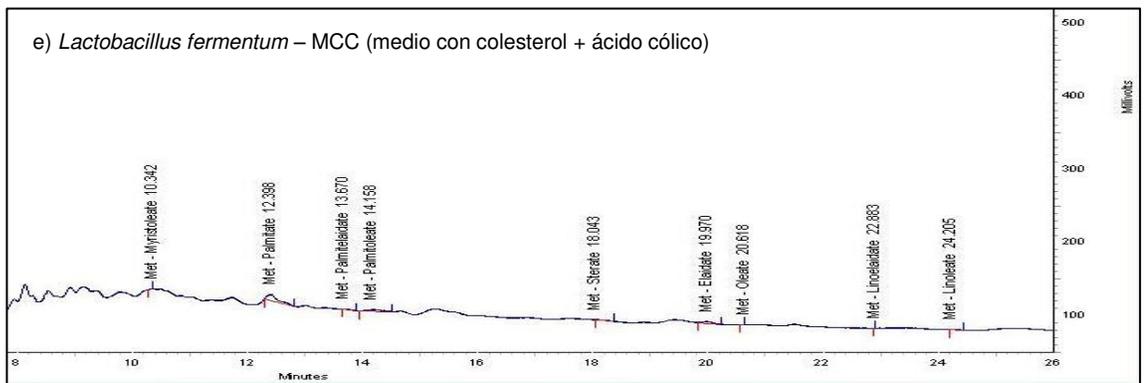
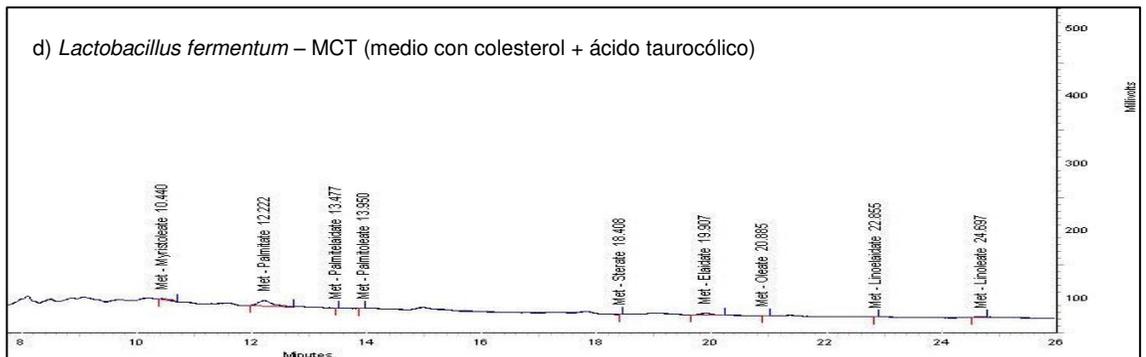
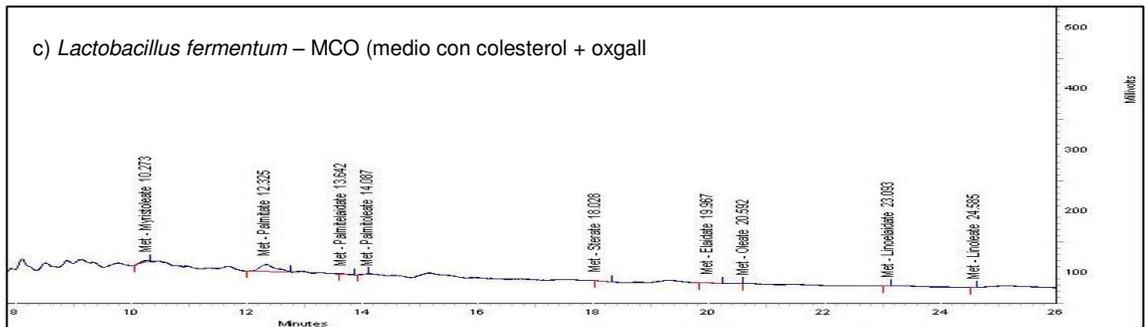
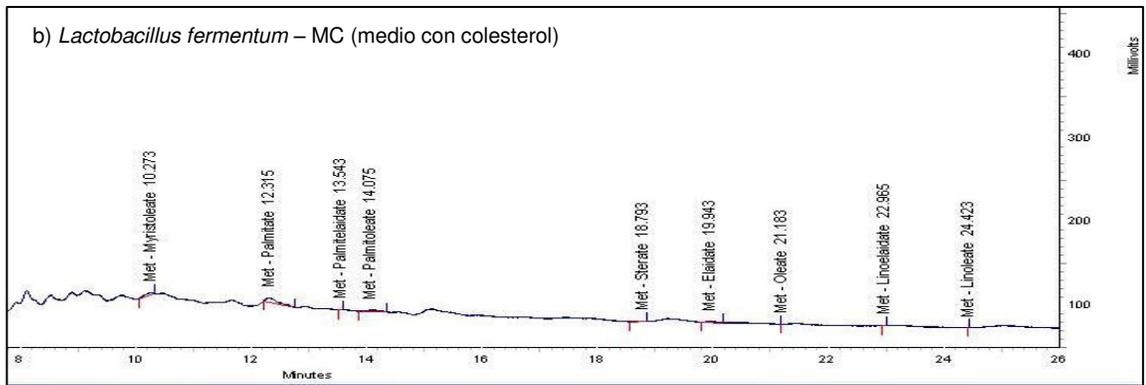
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Bifidobacterium lactis*.



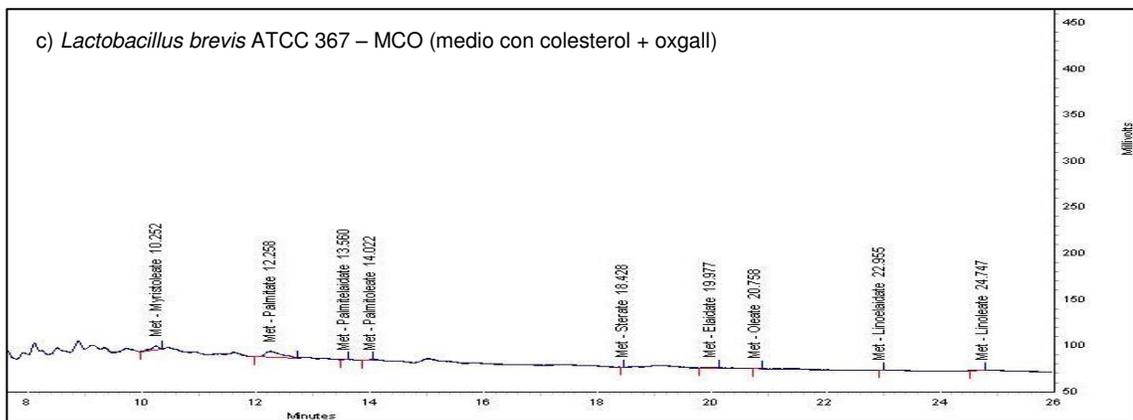
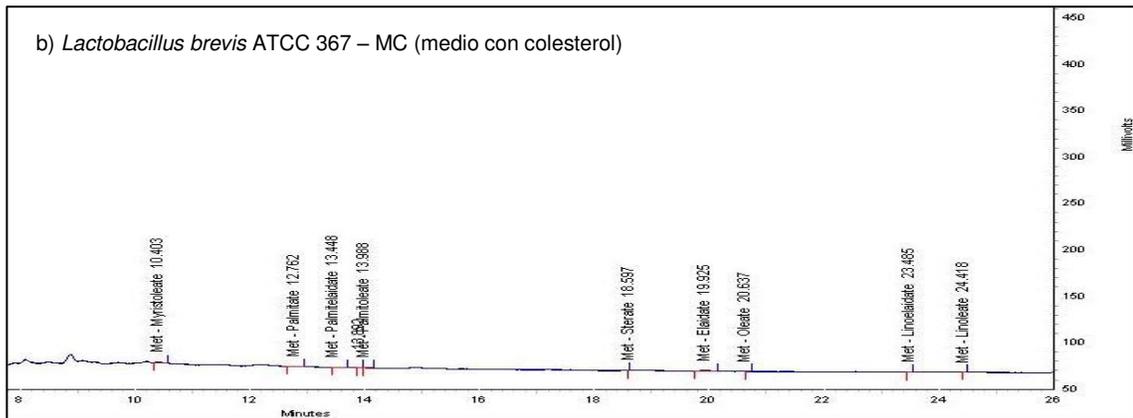
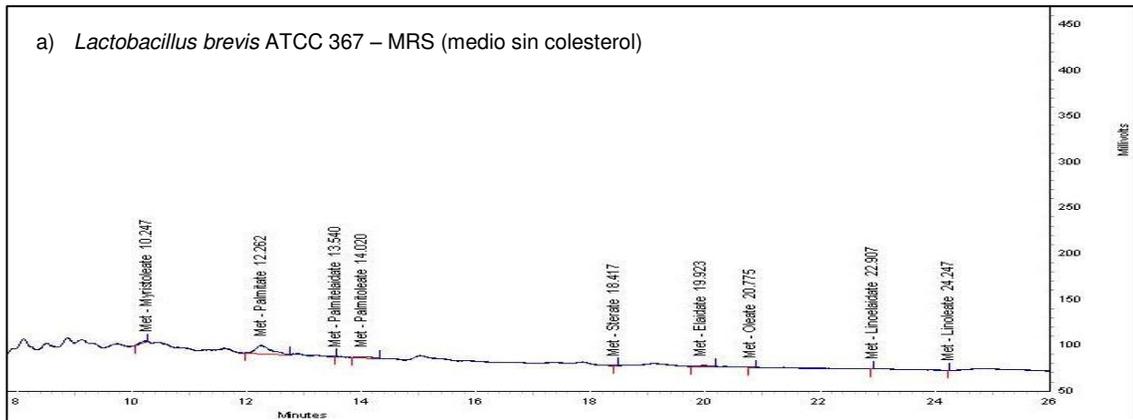


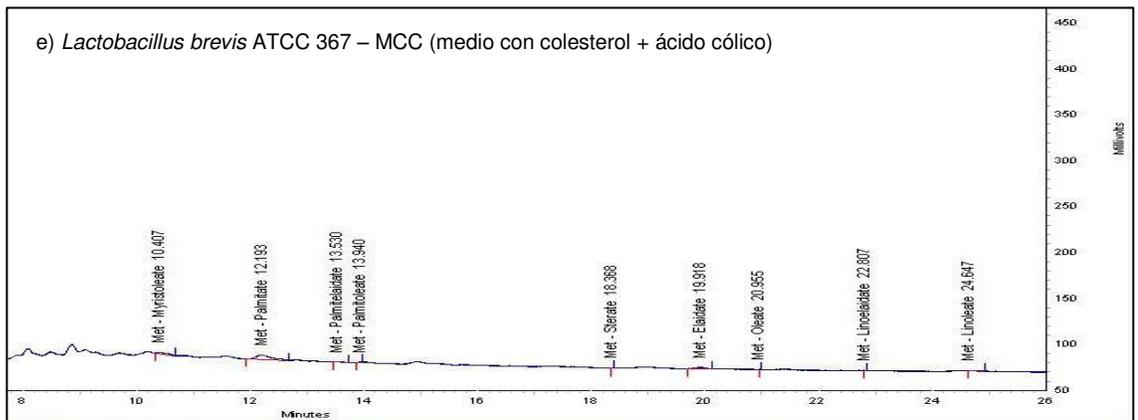
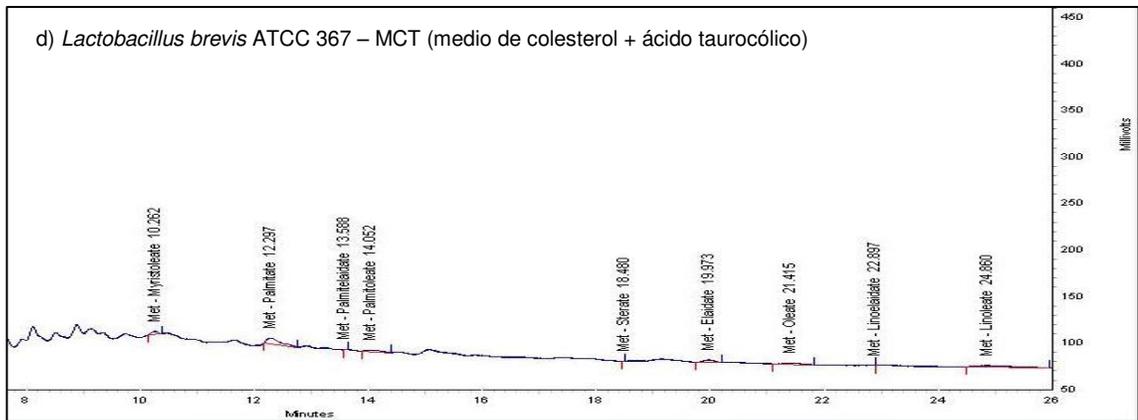
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus fermentum* (cepa de referencia).



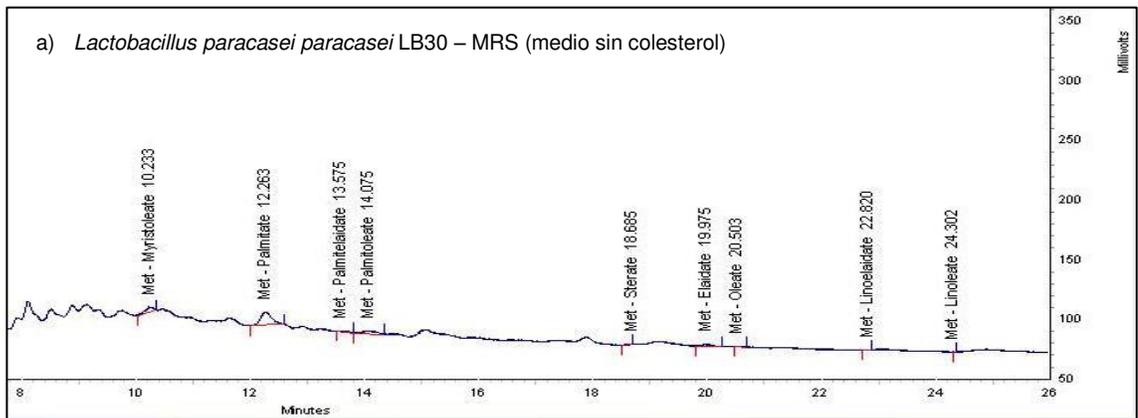


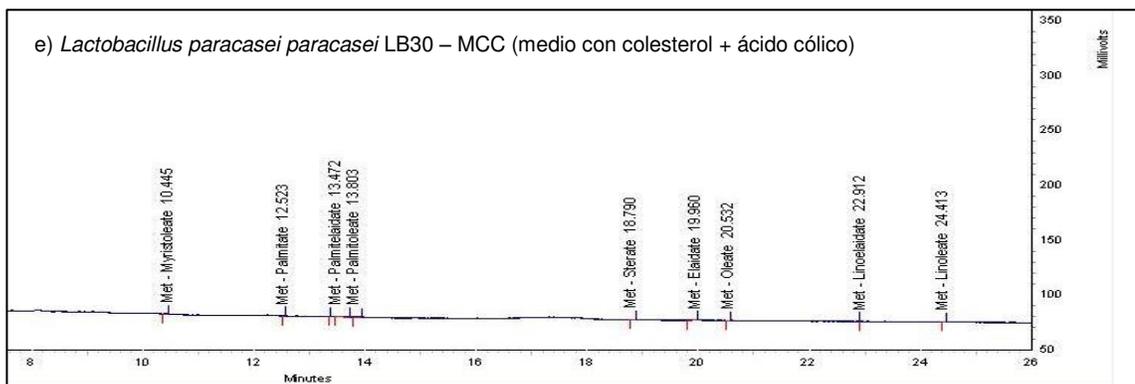
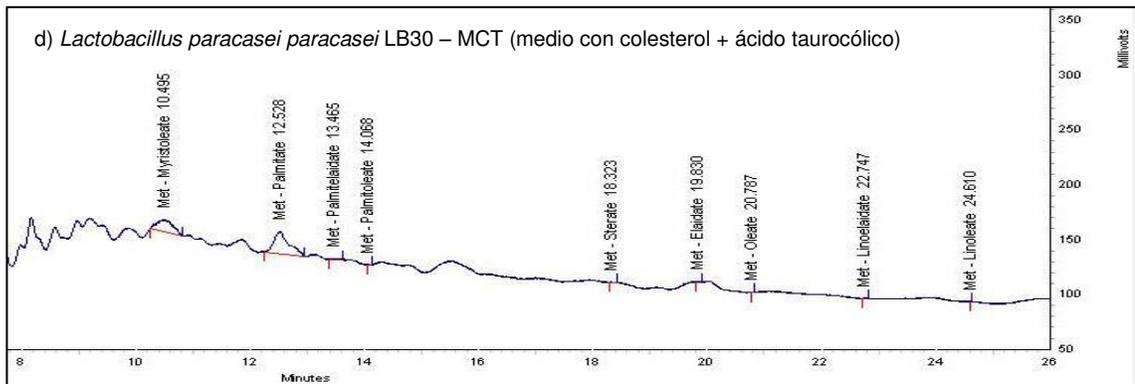
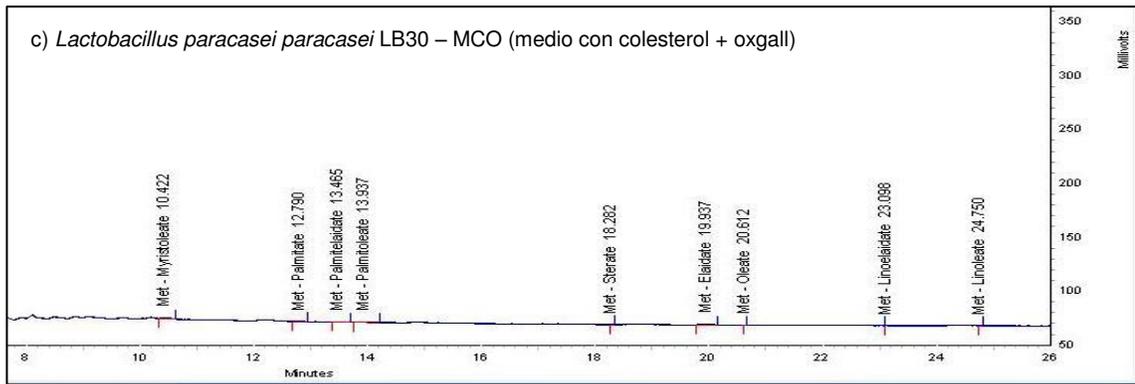
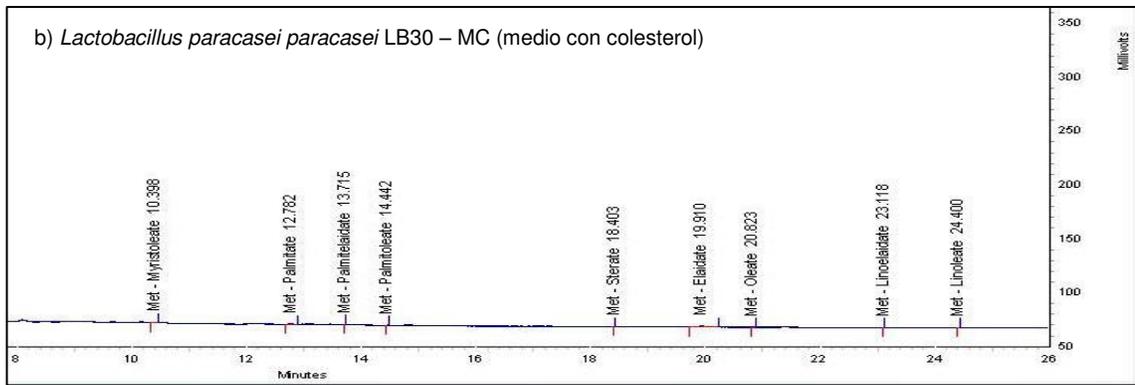
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus brevis* ATCC 367.



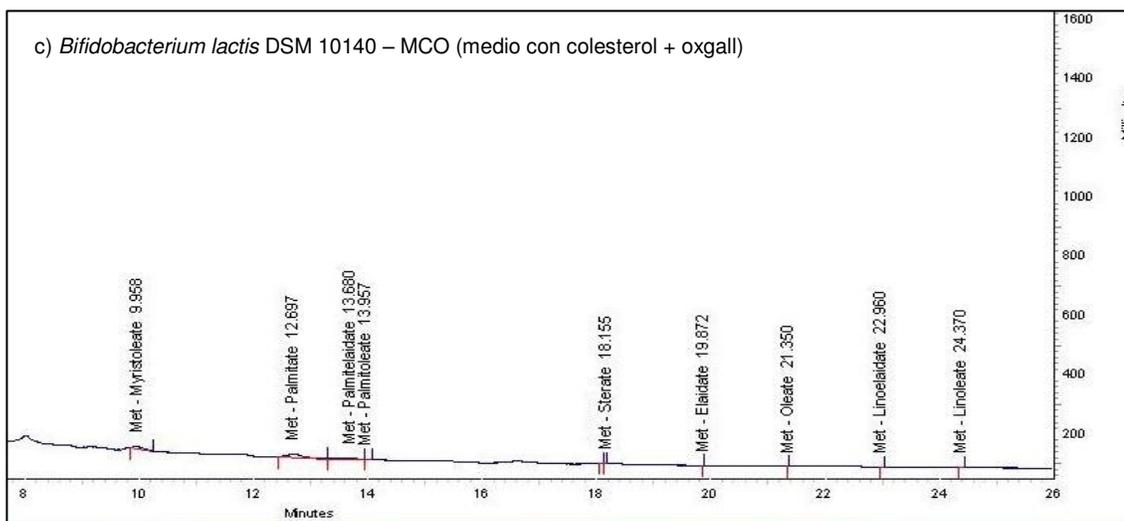
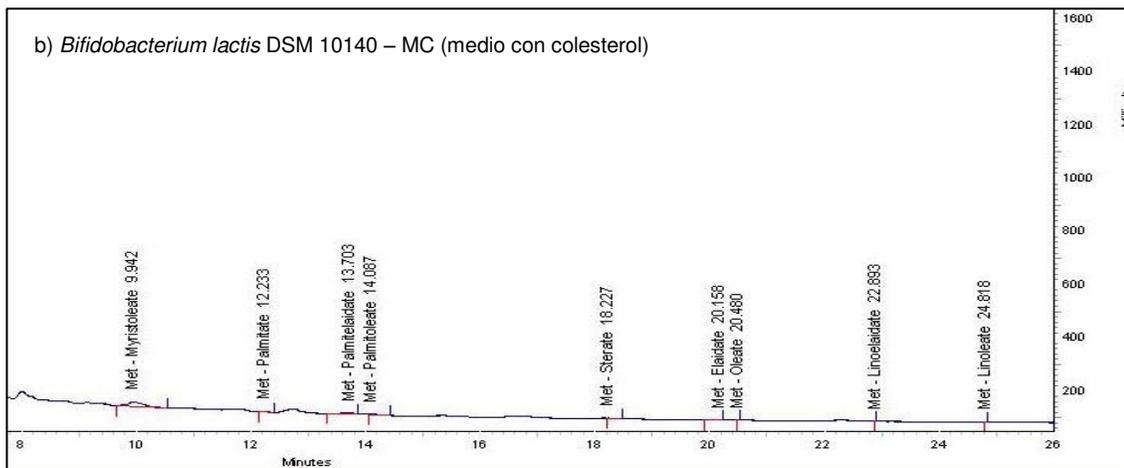
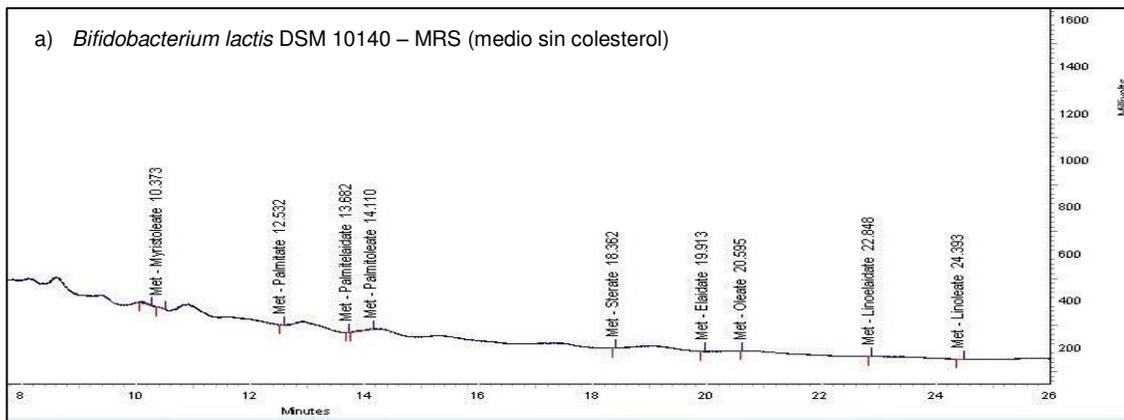


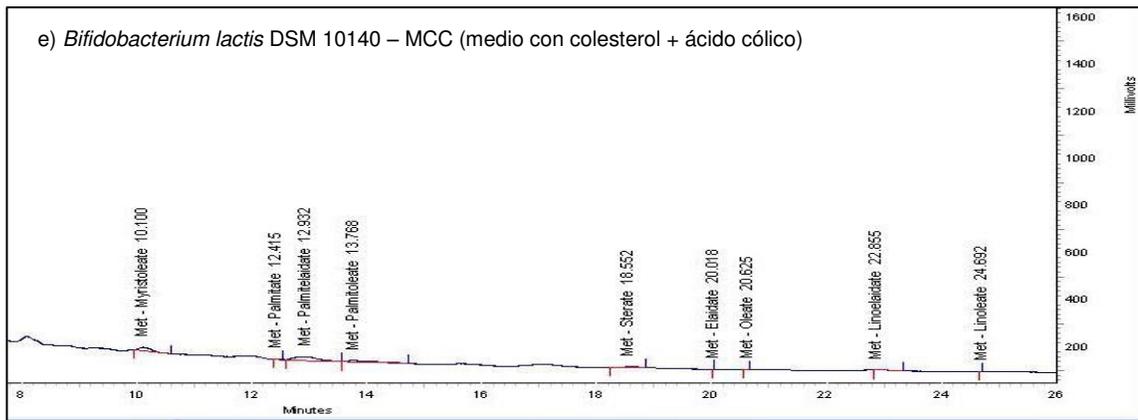
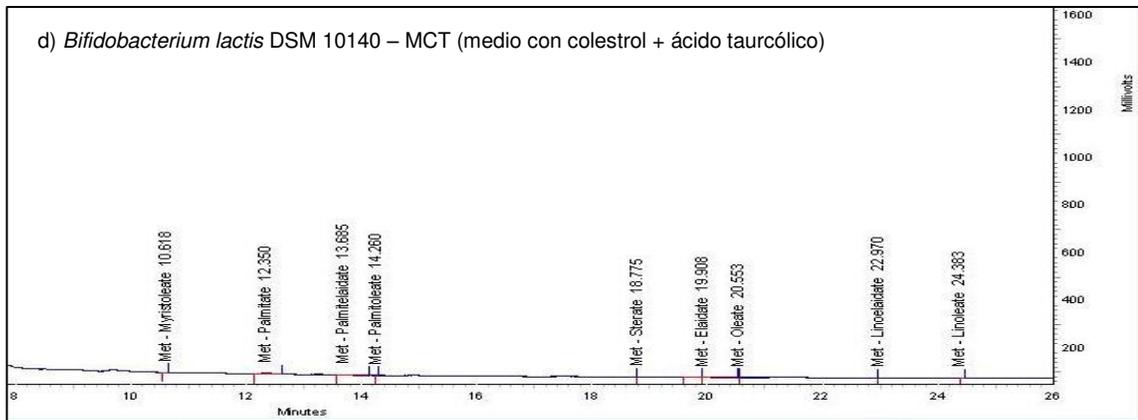
Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Lactobacillus paracasei paracasei* LB30





Cromatogramas del perfil de ácidos grasos en los medios de cultivo en la cepa *Bifidobacterium lactis* DSM 10140.





11. BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson, O., & Meydani, S. R. (2004). Yogurth and gut function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(supplement), 245-256.
- Agerholm-Larsen, L., Bell, L., Grunwald, G., & Astrup, A. (2000). The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: A metha-anaysis of shsort-term intervention studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 856 - 860.
- Ahire, JJ; Bhat, AA; Thakare, JM; Pawar, PB; Zope, DG; Jain, RM & Chaundhari, BL. (2012). Cholesterol assimilation and biotransformation. *Biotechnology Letters*, 34, 103 - 107.
- Ahn, Y., Kim, G., Lim, K., Baek, Y., & Kim, H. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 13, 303 - 311.
- Al-Saleh, A. A., Metwalli, A. A., & Abu-Tarboush, H. M. (2006). Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Saudi Society for Food and Nutrition*, 1(1), 1-17.
- Alvarez - Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (1 de Junio de 2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditioanl therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1567-1576.
- Anderson, J., & Gilliland, S. (1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophillus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(1), 43 - 50.
- Andrade, S., & Borges, N. (2009). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus acidophillus* and *Bifidobacterium longum* on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol. *Journal of Dairy Research*, 76, 469 - 474.
- Aznar, R., Dueñas, M., Jiménez, R., López, P., & Ruas-Madiedo, P. (2012). *Red Española de bacterias lácticas*. Recuperado el 26 de Febrero de 2014, de redbal.iata.csic.es/documentos/sabiasque/Exopolisacaridos%20BAL.pdf

- Begley, M., Hill, C., & Gahan, G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729 - 1738.
- Belviso, S., Giordano, M., Dolci, P., & Zeppa, G. (2009). In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. *Dairy science technology*, 89, 169 - 176.
- Benno, P., Midtvedt, K., Alam, M., Collinder, E., Norin, E., & Midtvedt, T. (2005). Examination of intestinal conversion of cholesterol to coprostanol in 633 healthy subjects reveals an age- and sex-dependent pattern. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 17, 200 - 204.
- Berada, N., Lemeland, J., Laroche, G., Thouvenot, P., & Paia, M. (1991). Bifidobacterium from fermented milks: Survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science*, 74, 409-413.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(supplement), 399S-405S.
- Bhathena, J., Martoni, C., Kulamarva, A., Urbanska, A., Malhorta, M., & Prakash, S. (2009). Orally delivered microencapsulated live probiotic formulation lower serum lipids in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Medicinal Foods*, 12(2), 310 - 319.
- BLAST. (s.f.). *Basic Local Alignment Search Tool*. Recuperado el Febrero de 2013, de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Bosch-Gallego, M., Espadaler-Mazo, J., Méndez-Sánchez, M., Pérez-Carre, M., & Farrán-Codina, A. (2011). El consumo del probiótico *Lactobacillus plantarum* CECT7315/7316 mejora el estado de salud general en personas de edad avanzada. *Nutrición Hospitalaria*, 26(3), 642 - 645.

- Cheeke, P. (2000). Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Journal of Animal Science*, 77, 1 - 10.
- Chenoll, E; Casinos, B; Bateller, E; Astals, P; Echevarría, J; Iglesias...Genovés, S. (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Applied environmental microbiology*, 77(4), 1335-1343.
- Chou, L., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 23-31.
- Clínica Centro Granada. (2011). *Clínica centro Granada*. Recuperado el 13 de Diciembre de 2013, de <http://clinicacentrogranada.blogspot.mx/2012/06/enfermedade-cardiovasculares-y.html>
- Coca, A; Cea-Calvo, L; Lozano, JV; Inaraja, V; Fernández-Pérez, C; Navarro, J; Bonet, A; Redón, J. (2009). Colesterol HDL y enfermedad cardiovascular en mujeres hipertensas de España. Estudio RIMHA. *Revista española de cardiología*, 62(9), 1022-1031.
- Corzo, G., & Gilliland, S. (1999). Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. *Journal of Dairy Science*, 82(3), 466 - 471.
- Cueto, C., & Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol in vitro. *Scientia Agropecuaria*(1), 45 - 50.
- Cullen, P., Rauterberg, J., & Lorkowsky, S. (2005). The pathogenesis of atherosclerosis. *HEP*, 170, 3-70.
- De Luis-Roman, D., Bellido-Guerrero, D., & García-Luna, P. (2010). *Dietoterapia, Nutrición clínica y Metabolismo*. Madrid: Díaz de Santos.

- De Roos, N., & Katan, M. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 405 - 411.
- Dilmi-Bouras, A. (2006). Assimilation (in vitro) of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13, 49-53.
- Diplock, A., Aggette, P., Ashwell, M., Bornet, F., Ferm, E., & Robertfroid, M. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition.*, 81(51).
- D'Souza, A., Rajkumar, C., Cooke, J., & Bulpitt, C. (2002). Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *British Medical Journal*, 83(4), 324-1361.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamillton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determinations of sugars and related substances. *Analytical chemistry.*, 28(3), 350 - 356.
- Ewaschuk, J. B., & Dieleman, L. A. (2006). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37), 5941 - 5950.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada: Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Farnworth, E. (2008). The Evidence to Support Health Claims for Probiotics. *The Journal of Nutrition, Supplement*, 1250S-1254S.
- Farooq, U., Mohsin, M., Liu, X., & Zhang, H. (2013). Enhancement of Short Chain Fatty Acid Production from Millet Fibres by Pure Cultures of Probiotic Fermentation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 189-194.

- Fernández-Murga, M., Cabrera, G., Font de Valdez, G., Disalvo, A., & Seldes, A. (2000). Influence of growth temperature on cryptolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of applied microbiology.*, 88, 342 - 348.
- Forssten, S., Sindelar, C., & Ouwehand, A. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, 17(6), 410 - 413.
- Fukushima, M., & Nakano, M. (1996). Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *British Journal of Nutrition*(76), 857-867.
- Fundación Hipercolesterolemia Familiar. (2007). *Guía para controlar su colesterol*. Madrid: Adalia farma S. L.
- Gardiner, C., Stanton, C., Lynch, P., Collins, J., Fitzgerald, G., & Ross, R. (2005). Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 82, 1379-1387.
- Gene-Bank. (s.f.). *National Center for Biotechnology Information*. Recuperado el Febrero de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Giannella, R., Broitman, S., & Zamchech, N. (1972). Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*, 13, 251-256.
- Gill, H. S., & Guarner, F. (2004). Probiotics and Human Health: A clinical perspective. *Posgraduated Medical Journal*, 80, 516 - 526.
- Gilliland, S., & Speck, M. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(1), 15 - 18.
- Gilliland, S., Nellson, S., & Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 377 - 381.
- Girardin, M., & Seidman, E. (2011). Indications or the use of probiotics in gastrointestinal diseases. *Digestive Diseases*, 29(6), 574 - 587.

- Gökce, G., Öztürk, M., & Aslim, B. (2011). Identification of *Lactobacillus* strains from breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2397–2406.
- González Martínez, B., Jiménez Salas, Z., & Gómez Treviño, M. (2006). Calidad del etiquetado de alimentos y suplementos con probióticos en México. *Public Health Nutrition*, 9.
- Guarner, F; Khan, A G; Garisch, J; Eliakim, R; Gangl, A; Thomson, A; Krabshuis, J; Le-Mair, T. (2008). Probióticos y Prebióticos. (O. M. Gastroenterología, Ed.) *Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología*.
- Guerner, F. (2000). El colon como órgano: habitat de la flora bacteriana. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 7(4), 99 - 106.
- Guo, L., Yang, L., & Huo, G. (2011). Cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* isolated from homemade fermented cream in inner Mongolia of China. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(3), 2019 - 2025.
- Gutiérrez-Abejón, E. (2010). La aterosclerosis como desencadenante de la patología cardiovascular. *Biociencias - Revista de la Facultad de las Ciencias de la Salud.*, 7, 3-28.
- Hamilton, J., Shah, S., & Winkler, J. (1998). Public health issues arising for microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotics microorganism. *Public health nutrition*, 2, 223 – 229.
- Hatakka, K., Mutanen, M., Holma, R., Saxelin, M., & Korpela, R. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii* JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(4), 441 - 447.
- Heyman, M. (2000). Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *Journal of the American College Nutrition.*, 19(2), 137S-146S.

- Hidaka, T., Horie, T., Akao, S., & Tsuno, H. (2010). Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification. *Water Research*, 44(8), 2554-2562.
- Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., & Mikes, Z. (2005). One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratisl Lek Listy*, 106(2), 67 - 72.
- Huazano-García, A., & López, M. G. (2013). Metabolism of Short Chain Fatty Acids in the Colon and Faeces of Mice After a Supplementation of Diets with Agave Fructans. En R. Valenzuela-Baez, *Lipid Metabolism* (págs. 163-182). InTech.
- INEGI. (2010). *INEGI*. Recuperado el 03 de Junio de 2012, de <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
- Ishibashi, N., & Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(supplement), 465S-470S.
- Isolauri, E., Kirjavainen, P., & Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*, 50, 54-59.
- Kapka-Skrzypczak, L., Niedzwiecka, J., Wojtyla, A., & Kruszewski, M. (2012). Probiotics and prebiotics as a bioactive component of functional food. *Pediatric endocrinology and diabetes*, 18(2), 79 - 83.
- Khani, S., Hosseini, H., Taheri, M., Nourani, M., & Imani-Fooladi, A. (2012). Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 11(2), 79 - 89.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., & Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by Lactococci. *Journal of Dairy Science*, 85, 3182 - 3188.
- Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., y otros. (2007). *Lactococcus sp.* as potential probiotic lactic acid bacteria. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 41, 181-189.

- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., y otros. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
- Lasuni3n-Ripa, M. (2006). El colesterol: bios3ntesis, acciones y alteraciones. *Alimentaci3n, Nutrici3n y Salud*, 13(4), 97 - 120.
- Lay - Gaik, O., & Min - Tze, L. (2010). Cholesterol - lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences.*, 11, 2499 - 2522.
- Ledesma Velazco, M. S. (2011). *Las Enfermedades Cardiovasculares en M3xico*. Recuperado el 25 de Febrero de 2012, de ANCAM: www.ancam.org.mx/html/dos/docs/platz/DR%2520MARIANO%2520LEDESMAECV%2520EN%2520MEXICO%2520ZACATECAS%2520JUNIO%25202011.ppt
- Lee, J., Kim, Y., Yun, H., Kim, J., Oh, S., & Kim, S. (2010). Genetic and preotomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4829 - 4835.
- Lewis, S., & Burmeister, S. (2005). A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59, 776 - 780.
- Lima-Santos, F., Fortes-Ferreira, C., Brunoro-Costa, N., & Terra-Santos, N. (2013). Effect of three *Lactobacillus* strains on lipid metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. *African Journal of Microbiology Research*, 7(33), 4291-4296.
- Liong, M., & Shah, N. (2005a). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science.*, 88(1), 55 - 66.
- Liong, M., & Shah, N. (2005b). Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Science*, 15, 391 - 398.

- López-Farre, A., & Macaya-Miguel, C. (2009). *Libro de la salud cardiovascular del Hospital clínico San Carlos y la fundación BBVA*. (1 ed.). Bilbao: Fundación BBVA.
- Lye, H., Rahmat-Ali, R., & Liong, M. (2010). Mechanism of cholesterol removal by Lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 20, 169 - 175.
- Lye, H., Rusul, G., & Liong, M. (2010). Removal of cholesterol by Lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1383 - 1392.
- Macdonald, I., Bokkenheuser, V., Winter, J., McLernon, A., & Mosbach, E. (1983). Degradation of steroids in the human gut. *Journal of Lipid Research*, 24, 675 - 700.
- Mack, D. R. (2005). Probiotics: Mixed Messages. *Canadian Family Physician*, 51, 1455 - 1457.
- Madsen, K; Cornish, A; Soper, P; McKaigney, C; Jijon, H; Yachimec, C...De Simone, C (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121(3), 580-591.
- Mann, G. V., & Spoerry, A. (1974). Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Massai. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 464 - 469.
- Manson, J., Tosteson, H., Ridker, P., Satterfield, S., Hebeert, P., & O'Connor, G. (1992). The primary prevention of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*(326).
- Martínez, I., González, B., Campos, E., Barba, A., & Jiménez, Z. (2008). Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: comparación con métodos bioquímicos. *Revista de salud pública y nutrición*, 9(4), 2705-2710.
- Masana - Marin, L. (2009). *Comprender el colesterol: efectos sobre la salud, alimentación y medicamentos. Preguntas y respuestas*. Barcelona: AMAT.

- Mateos, J. (2002). Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En *Alimentos Funcionales. Probióticos*. En R. Ortega, A. Marcos, J. Aranceta, J. Mateos, A. Requejo, & L. Serra. Editorial Médica Panamericana.
- Mayo, B., & Delgado, S. (2003). Probióticos y Salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10(3), 61-70.
- Meei - Yn, L., & Tseng - Wei, C. (2000). Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophillus* in Culture Broth. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8(2), 97 - 102.
- Metges, C. (2000). Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *Journal of Nutrition*, 130, 1857S-1864S.
- Metges, C; El-Khoury, A; Henneman, L; Petzke, K; Grant, KI; Bedri, S...Young, V. (1999). Availability of intestinal microbial lysine for whole body lysine homeostasis in human subjects. *Endocrinology and Metabolism.*, 277(4), E597-E607.
- NAHH. (2004). *National Alliance for Hispanic Health*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2013, de www.hispanichealth.org
- Nakajima, H., Susuki, Y., Kaizu, H., & Hirota, T. (1992). Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *Journal of food science*, 57, 1327 - 1329.
- Navarro-Santamaría, V., Zabala-Letona, A., Gómez-Sorita, S., & Portillo-Baquedano, M. d. (2009). Metabolismo del colesterol: bases actualizadas. *Revista Española de Obesidad.*, 7(6), 360 - 384.
- NCBI. (s.f.). *National Center for Biotechnology Information* (2013) . Obtenido de Taxonomy of *Bifidobacterium animalis subsp lactis*.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=302911>
- Noh, D., Kim, S., & Gilliland, S. (1997). incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophillus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science.*, 80(12), 3107 - 3113.

- OMS. (2011). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 25 de Febrero de 2012, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
- P. R. Vadémecum. (s.f.). *prvademecum*. Recuperado el 01 de Octubre de 2013, de <http://mx.prvademecum.com>
- Pacoví-Mieras, M. (2004). *El colesterol: una molécula entre la vida y la muerte*. (pág. 50). Zaragoza: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza.
- Pereira, D., & Gibson, G. (2002a). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4689 - 4693.
- Pereira, D., & Gibson, G. (2002b). Effect of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in human. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 902 - 917.
- Pereira, D., McCartney, A., & Gibson, G. (2003). An In vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactibacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4743 - 4752.
- Pigeon, R., Cuesta, E., & Gilliland, S. (2002). Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *Journal of Dairy Science*, 85(11).
- Pineiro, M., & Stanton, C. (2007). Probiotic bacteria: Legislative framework-requirements to evidence basis. *Journal of Nutrition*, 137, 850S-853S.
- Ranadheera, R., Baines, S., & Adams, M. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Ravnskov, U. (2002). Is atherosclerosis caused by high cholesterol? *Quarterly Journal of Medicine*, 95, 397 - 403.

- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M., & McCormick, J. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews.*, 16(4), 658-672.
- Remagni, MC; Paladino, M; Locci, F; Romero, FV; Zago, M; Povo, M; Contarini, G. & Carminati, D. (2013). Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia Microbiologica*, 58(6), 443 - 449.
- Reyes-Gavilán, C., Abelardo, M., Ruas-Madiedo, P., Noriega, L., Sánchez, B., & Cuevas, I. (2004). Modificaciones de propiedades probióticas y tecnológicas en microorganismos del género *Bifidobacterium* como consecuencia de la adquisición de resistencia a sales biliares. *Agroscic*, 30 - 34.
- Rodríguez-Arzave, J. A. (1987). *Manual de prácticas de bioquímica*. (4 ed.). Monterrey, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rolfe, R. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130(supplement.), 396S-402S.
- Roos, N., & Katan, M. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 71(2), 405-411.
- Ros, E. (2003). Prebióticos y probióticos en la regulación del metabolismo de los lípidos. *Gastroenterología y Hepatología*, 1(26), 31 - 36.
- Saavedra, J. (2001). Clinical applications of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 73(supplement), 1147-1151.
- Sahadeva, RPK; Leong, SF; Chua, KH; Tan, CH; Chan, HY; Tong, EV; Wong, SYW & Chan, HK (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 8(4), 1515 - 1522.
- Sanders, ME; Akkermans, LM; Haller, D; Hammerman, C; Heimbach, J; Hörmannspurger, G...Vaughan E. (2010). Safety assesment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164 - 185.

- Sanders, ME; Guarner, F; Guerrant, R; Holt, PR; Quigley, EM; Sartor, RB, Sherman, PM & Mayer, EA. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62, 787-796.
- Scott-Weese, J. (2003). Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. *The Canadian veterinary journal*, 44, 982 – 983.
- Secretaria de Salud. (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994*. Bienes y servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Segarra-Espinoza, E. (2006). *Fisiología de los aparatos y sistemas*. España: Universidad de Cuenca.
- Singhal, K., Joshi, H., & Chaudhary, B. (2011). Influence of Initial Concentrations of Cholesterol on the Uptake of Cholesterol by the Standard Lactobacillus Strains and Lactobacillus Isolates. *IJPI's Journal of Biotechnology and Biotherapeutics*, 1(4), 2-6.
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 502 - 509.
- Sridevi, N., Vishwe, P., & Prabhune, A. (2009). Hypocholesterolemic effect of salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Research International*, 42(4), 516 - 520.
- St-Onge, M., Farnworth, E., & Jones, P. (2000). Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 71(3), 674-681.
- Sullivan, A., & Nord, C. (2002). Probiotics in human infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 625-627.

- Susuki, Y., Kaizu, H., & Yamauchi, Y. (1991). Effect of Cultured Milk on Serum Cholesterol Concentrations in Rats which Fed High-cholesterol Diets. *Animal Science Technology*, 62(6), 565-571.
- Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., & Schneider, F. (1995). Effects of three strains of bifidobacteria on Cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 149-151.
- Taylor, G., & Williams, C. (1998). Effects of probiotic and prebiotics on blood lipids. *British Journal of Nutrition.*, 80, 225 - 230.
- Theunissen J, B. T. (2005). Identification of Probiotic Microorganisms in South African Products using PCR-based DGGE Analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 11-21.
- Tok, E., & Aslim, B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiología and Inmunology*, 54, 257 - 264.
- Torres, M. (2002). *Flora intestinal, probióticos y salud*. D. F., México: Editorial Gráfica Nueva, Editora de las Universidades Iberoamericanas.
- Trautwein, E., Rieckhoff, D., & Erbersdobler, H. (1998). Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. *The Journal of Nutrition.*, 1937 - 1943.
- Universidad de Buenos Aires. (2010). *Facultad de Medicina Virtual - Universidad de Buenos Aires*. Recuperado el 24 de Octubre de 2013, de www.fmv-uba.org.ar:www.fmv-uba.org.ar/grado/.../Sem-16-Metabolismo-Colesterol.pdf
- Usman, K., & Hosono, A. (2000). Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *Journal of Dairy Science*, 83, 1705 - 1711.
- Valenzuela, A., & Morgado, N. (2006). Breve historia de la relación entre el colesterol y las enfermedades cardiovasculares. *Revista Chilena de Nutrición*, 33(2).

- van Loveren, H., Sanz, Y., & Salminen, S. (2012). Health claims in Europe: Probiotics and prebiotics as case examples. *Annual review of food sciences and technology*, 3, 247-261.
- Van Niel, C., Feudtner, C., Garrison, M., & Christakis, D. (2002). Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, 9(4), 678-684.
- Vanderhoof, J., & Young, R. (2002). Probiotics in pediatrics. *Pediatrics.*, 109(5), 956-958.
- Velázquez-Monroy, O; Rosas-Peralta, M; Lara-Esqueda, A; Patelín-Hernández, G; Sánchez-Castillo, C; Attie, F & Tapia-Conyer, R (2003). Prevalencia e interrelación de enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México: Resultados finales de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. *Archivos de Cardiología de México*, 73(1), 62 - 77.
- Ventura, M., Reiner, R., & Zink, R. (2001). Specific Identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex_PCR approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2760 - 2765.
- WHO - FAO. (2001). *Health and nutritioanl properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Argentina.
- Xie, Ning; Cui, Yi; Yin, Ya - Ni; Zhao, Xin; Yang, Jun - Weng; Wang, Zheng – Gen...Lu, Fang - Gen. (2011). Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high - cholesterol diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine.*, 53.
- Xu, L., & Blakesley, R. (1996). Isolation of Bacillus genomic DNA with DNAzol(TM) Reagent. *Focus*, 18(3), 73.
- Yeung, P., Sanders, M., Kitts, C., Cano, R., & Tong, P. (2002). Species – Specific identification of commercial probiotics strains. *Journal of dairy sciences*, 8, 1039 – 1051.

Yildiz, G., Öztürk, M., & Aslim, B. (2011). Identification of Lactobacillus strains of breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2397 - 2406.

RESUMEN CURRICULAR

Martha Montserrat Castorena Alba

Candidata para el Grado de

Maestra en Ciencias en Nutrición

Tesis: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA DE COLESTEROL DE CEPAS PROBIÓTICAS.

Campo de estudio: Alimentos Funcionales

Datos personales: Nacida en Torreón, Coahuila el 24 de Diciembre de 1984 hija de Arturo Castorena Ibarra y Martha Elba Alva Avila.

Formación académica: Licenciatura en Ciencia de los Alimentos en la Universidad Autónoma de Nuevo León 2001 - 2005.

Experiencia profesional: 5 años de experiencia (2006 – 2011) en la industria alimentaria en el área de aseguramiento, control de calidad y microbiología. Profesor de Asignatura A en la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2013.

Participación en congresos: 8

Reconocimientos: Primer lugar en la categoría profesional en la presentación de trabajos libres en formato cartel en el XXIX Congreso AMMFEN con el trabajo titulado: Asimilación de Colesterol *in vitro* de Cepas Probióticas.