



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD



**“Evaluación del efecto de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en la reducción de los niveles de colesterol libre en sistemas *in vitro* y en ratones con hipercolesterolemia inducida”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**KARINA JAZMÍN PAZ ALFARO**

Director de Tesis:

**DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES**

San Agustín Tlaxiaca, Hgo.

Enero de 2017



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Health Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

18/enero/2017

AAM/MCBS/003/2017

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Karina Jazmín Paz Alfaro**

**Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación del efecto de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en la reducción de los niveles de colesterol libre en sistemas *in vitro* y en ratones con hipercolesterolemia inducida" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

|              |  |
|--------------|--|
| PRESIDENTE   | DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS              |
| PRIMER VOCAL | DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES      |
| SECRETARIO   | M EN C. JOSÉ RAMÓN MONTEJANO RODRÍGUEZ |
| SUPLENTE     | DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ         |
| SUPLENTE     | DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA           |

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"



M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL

DIRECTOR

DRA. ARACELI ORTIZ POLO  
COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Instituto de Ciencias de la Salud  
Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuautla.  
San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160  
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308  
mtria\_bio\_sal@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

*La investigación para la elaboración de la presente tesis se realizó en el laboratorio de investigación anexo al laboratorio de Histología y en el bioterio, pertenecientes al Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Becerril Flores.*

*Así mismo, durante el desarrollo de este estudio, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de CVU: 552414.*

## *Agradecimientos*

*A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por darme la oportunidad de ser parte de esta máxima casa de estudios.*

*Al CONACyT, por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.*

*A mi director de tesis, Dr. Marco Antonio Becerril Flores, por transmitirme sus conocimientos, por creer en mí. Gracias Doctor por su sencillez y humildad en el trato; con usted aprendí, entre otras cosas, que la ciencia va de la mano del ingenio y la creatividad.*

*A mis sinodales, que contribuyeron con sus conocimientos en el mejoramiento de esta tesis. Gracias a todos y cada uno por sus aportaciones.*

*A Rosario, mi querida compañera de laboratorio, gracias por tu compañerismo, por tu apoyo y por todos los momentos agradables, y no tan agradables, que pasamos durante nuestra estancia en el laboratorio.*

*A Paty, por su gran apoyo durante mi trabajo en el laboratorio, que me permitió culminar con éxito esta tesis. Gracias por tu compañerismo y por el gusto de ayudar siempre a los demás.*

*A cada uno de mis maestros de posgrado, que contribuyeron, con sus conocimientos, a mi formación académica.*

*“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”*

*Isaac Newton*

## *Dedicatorías*

### *A Dios*

*Por darme la fortaleza espiritual para salir adelante en todos los momentos difíciles que he tenido en la vida y por su infinita sabiduría, que me hace tener la certeza que sus tiempos son perfectos.*

*“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo, tiene su hora”*

*Eclesiastés 3:1*

### *A mi madre*

*Por el invaluable apoyo que siempre me has brindado, por ser una madre ejemplar, por todos los momentos que hemos compartido juntas, tanto los buenos como los malos. Gracias por haber sembrado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.*

### *A mi padre †*

*Hace ya varios años que partiste y sigues estando presente en mi mente y mi corazón. En mi mente, guardo los momentos felices que vivimos, cada uno de tus consejos y el ejemplo que me diste, que me han servido para ser la persona que ahora soy; y en mi corazón, el deseo de volver a encontrarme contigo y la esperanza en Dios que, algún día, nos volverá a reunir y estaremos juntos nuevamente.*

### *A mis hijos*

*A los dos grandes amores de mi vida, Ángel Gabriel y Víctor Manuel, por ser el motor que me impulsa a superarme y dar lo mejor de mí. Son dos pedacitos de cielo que Dios me dio para hacerlos felices y ser feliz. Que el Señor proteja y guíe siempre su camino.*

### *A mi esposo Gabriel*

*Gracias amor por estar en todo momento conmigo, apoyándome en lo académico y personal y, sobre todo, por todos los momentos que hemos compartido juntos, buenos y malos, que sin duda, han hecho que sigamos unidos. Dios bendiga siempre la hermosa familia que hemos construido.*

*“La familia es como la música, algunas notas altas, otras bajas, pero siempre es una hermosa canción”*

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| INDICE .....   | I  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | V  |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS.....  | V  |
| ÍNDICE DE ANEXOS .....   | V  |
| ABREVIATURAS.....  | VI |
| RESUMEN.....   | 1  |
| ABSTRACT .....   | 2  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 3  |
| 2. MARCO TEÓRICO .....   | 6  |
| 2.1 COLESTEROL .....   | 6  |
| 2.1.1 <i>Metabolismo del colesterol en el organismo humano</i> .....                                   | 7  |
| 2.1.2 <i>Absorción intestinal de colesterol</i> .....  | 8  |
| 2.1.3 <i>Transporte del colesterol en el organismo humano: papel de las lipoproteínas</i> .....        | 10 |
| 2.1.4 <i>Homeostasis del colesterol</i> .....  | 13 |
| 2.1.5 <i>Funciones del colesterol en el organismo humano</i> .....                                     | 14 |
| 2.1.6 <i>Efectos de la hipercolesterolemia en el organismo</i> .....                                   | 16 |
| 2.2 <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> .....   | 17 |
| 2.2.1 <i>Aplicaciones biotecnológicas de K. marxianus</i> .....  | 18 |
| 2.3 PROBIÓTICOS.....   | 19 |
| 2.3.1 <i>Criterios establecidos para determinar la capacidad probiótica de un microorganismo</i> ..... | 20 |
| 2.3.2 <i>Mecanismos de acción de los probióticos</i> .....   | 22 |
| 2.3.3 <i>Efectos benéficos de los probióticos en la salud humana</i> .....                             | 25 |
| 2.3.4 <i>Efectos probióticos encontrados en las levaduras</i> .....                                    | 27 |
| 3. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA .....   | 30 |
| 3.1 EFECTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL.....                | 31 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2 EFECTO DE ALGUNAS ESPECIES DE LEVADURAS EN LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL .....   | 33        |
| <b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>5. HIPÓTESIS .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>6. OBJETIVOS.....</b>   | <b>36</b> |
| 6.1 OBJETIVO GENERAL.....  | 36        |
| 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 36        |
| <b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>36</b> |
| 7.1 TIPO DE ESTUDIO .....  | 36        |
| 7.2 DIAGRAMA DE FLUJO DE DISEÑO EXPERIMENTAL .....   | 37        |
| 7.3 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO: .....  | 38        |
| 7.3.1 Obtención y conservación de la cepa de la levadura <i>K. marxianus</i> para los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....   | 38        |
| 7.3.2 Preparación de medios de cultivo .....   | 38        |
| 7.3.3 Obtención del inóculo .....  | 38        |
| 7.3.4 Obtención de la curva de crecimiento de <i>K. marxianus</i> .....  | 39        |
| 7.3.5 Evaluación de formación de biopelícula por <i>K. marxianus</i> .....   | 39        |
| 7.3.6 Evaluación <i>in vitro</i> de la reducción de colesterol por <i>K. marxianus</i> .....   | 39        |
| 7.3.6.1 Prueba de solubilización de colesterol utilizando etanol y caldo YPD .....   | 40        |
| 7.3.6.2 Valoración del crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) con colesterol solubilizado en diferentes concentraciones de etanol .... | 40        |
| 7.3.6.3 Determinación del crecimiento de <i>K. marxianus</i> en medios modificados con diferentes nutrientes.....  | 40        |
| 7.3.6.4 Determinación de la concentración de colesterol en medios de cultivo en ausencia y presencia de <i>K. marxianus</i> .....  | 41        |
| 7.3.6.5 Determinación de la concentración de colesterol en sueros humanos en presencia y ausencia de <i>K. marxianus</i> .....   | 42        |
| 7.3.7 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de <i>K. marxianus</i> en la disminución de colesterol libre ...  | 43        |
| 7.3.7.1 Tratamiento de los animales .....  | 43        |
| 7.3.7.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la colonización <i>K. marxianus</i> en intestino de ratón .....  | 44        |
| 7.3.7.3 Evaluación <i>in vivo</i> de la colonización de <i>K. marxianus</i> en ratones CD1.....  | 44        |



|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 7.3.7.4    | <i>Determinación de colesterol libre en ratones inoculados con K. marxianus</i> .....                                    | 45        |
| 7.4        | ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 46        |
| <b>8.</b>  | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>47</b> |
| 8.1        | OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA DE LA LEVADURA <i>K. MARXIANUS</i> .....   | 47        |
| 8.2        | CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>K. MARXIANUS</i> .....  | 48        |
| 8.3        | EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA REDUCCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL POR LA LEVADURA <i>K. MARXIANUS</i> .....   | 49        |
| 8.3.1      | <i>Solubilización de colesterol en etanol y caldo YPD</i> .....  | 49        |
| 8.3.2      | <i>Crecimiento de K. marxianus en medio YPD con colesterol solubilizado a diferentes concentraciones de etanol</i> ..... | 50        |
| 8.3.3      | <i>Crecimiento de K. marxianus en medios con modificación de nutrientes</i> .....  | 51        |
| 8.3.4      | <i>Concentración de colesterol en medios de cultivo con y sin K. marxianus</i> .....                                     | 52        |
| 8.3.5      | <i>Concentración de colesterol en sueros humanos con y sin K. marxianus</i> .....  | 55        |
| 8.4        | FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA POR <i>K. MARXIANUS</i> .....   | 56        |
| 8.5        | COLONIZACIÓN DE <i>K. MARXIANUS</i> EN INTESTINOS EXTRAÍDOS DE RATONES CD1 .....   | 57        |
| 8.6        | COLONIZACIÓN DE <i>K. MARXIANUS</i> EN RATONES CD1 INOCULADOS VÍA ORAL CON LA LEVADURA.....                              | 58        |
| 8.7        | REDUCCIÓN DEL COLESTEROL TOTAL EN SUERO DE RATONES CD1 INOCULADOS CON LA LEVADURA <i>K. MARXIANUS</i> .....              | 60        |
| <b>9.</b>  | <b>DISCUSIÓN .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>10.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>11.</b> | <b>RECOMENDACIONES .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>12.</b> | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>13.</b> | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>83</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Estructura del colesterol _____  | <b>6</b>  |
| <b>Figura 2.</b> Vía de biosíntesis del colesterol _____  | <b>8</b>  |
| <b>Figura 3.</b> Homeostasis general del colesterol en el organismo _____   | <b>13</b> |
| <b>Figura 4.</b> Principales mecanismos mediante los cuales los probióticos ejercen sus beneficios  | <b>24</b> |
| <b>Figura 5.</b> Observación macroscópica del crecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i> en medio YPD con antibiótico _____   | <b>47</b> |
| <b>Figura 6.</b> Observación microscópica de cultivo axénico de <i>K. marxianus</i> utilizando tinción de Gram _____  | <b>48</b> |
| <b>Figura 7.</b> Solubilización del colesterol en caldo YPD utilizando etanol como disolvente, a diferentes concentraciones _____   | <b>50</b> |
| <b>Figura 8.</b> Crecimiento de <i>K. marxianus</i> en los medios de cultivo con colesterol solubilizado a diferentes concentraciones de etanol _____                                       | <b>51</b> |
| <b>Figura 9.</b> Formación de biopelícula por <i>K. marxianus</i> sembrada en agar BHI y rojo congo _   | <b>57</b> |
| <b>Figura 10.</b> <i>K. marxianus</i> en intestino delgado y grueso extraídos de ratón CD1 _____  | <b>57</b> |
| <b>Figura 11.</b> <i>K. marxianus</i> en intestino delgado de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días _____   | <b>58</b> |
| <b>Figura 12.</b> <i>K. marxianus</i> en intestino grueso de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días _____  | <b>59</b> |
| <b>Figura 13.</b> <i>K. marxianus</i> en heces de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días   | <b>59</b> |
| <b>Figura 14.</b> <i>K. marxianus</i> en heces frescas de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días _____   | <b>59</b> |
| <b>Figura 15.</b> <i>K. marxianus</i> presente en intestino delgado, intestino grueso y heces frescas de ratones CD1 hipercolesterolémicos, después de su inoculación con la levadura _____ | <b>63</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Medios de cultivo problema y control utilizados para la determinación de las concentraciones de colesterol con y sin <i>K. marxianus</i> _____                                      | <b>42</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Características de lotes control y de estudio de ratones CD1 hembras utilizados para evaluación del efecto de <i>K. marxianus</i> en los niveles de colesterol total en suero _____ | <b>46</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Concentración media de colesterol de ratones CD1 hembras durante las diferentes fases de experimentación _____  | <b>61</b> |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Gráfico 1.</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i> _____   | <b>49</b> |
| <b>Gráfico 2.</b> Crecimiento de <i>K. marxianus</i> en diferentes medios modificados en nutrientes y a diferentes tiempos de incubación _____  | <b>52</b> |
| <b>Gráfico 3a.</b> Concentración de colesterol del medio YPD con colesterol y <i>K. marxianus</i> y sus respectivos controles, a diferentes tiempos de incubación _____                   | <b>54</b> |
| <b>Gráfico 3b.</b> Concentración de colesterol del medio YP con colesterol y <i>K. marxianus</i> y sus respectivos controles, a diferentes tiempos de incubación _____                    | <b>54</b> |
| <b>Gráfico 3c.</b> Concentración de colesterol del medio Y con colesterol y <i>K. marxianus</i> y sus respectivos controles, a diferentes tiempos de incubación _____                     | <b>55</b> |
| <b>Gráfico 4.</b> Concentración de colesterol en diferentes sueros humanos antes y después de su incubación a 37°C por 6 días, con y sin adición de la levadura <i>K. marxianus</i> _____ | <b>56</b> |
| <b>Gráfico 5.</b> Concentración media de colesterol en suero de los ratones de los 3 lotes, durante las diferentes fases del estudio _____  | <b>62</b> |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Anexo 1.</b> Medios de cultivo problema y control utilizados en ensayos <i>in vitro</i> _____  | <b>83</b> |
| <b>Anexo 2.</b> Técnica de inoculación de la levadura <i>K. marxianus</i> a ratones CD1 por vía intragástrica usando cánula curva de acero inoxidable _____ | <b>84</b> |
| <b>Anexo 3.</b> Lotes de ratones CD1 hembras utilizados para ensayos de efecto de la levadura <i>K. marxianus</i> en los niveles de colesterol sérico _____ | <b>84</b> |
| <b>Anexo 4.</b> Imágenes de la técnica de extracción de sangre empleada en ratones CD1 _____  | <b>85</b> |

## ABREVIATURAS

| <i>Abreviatura</i>         | <i>Significado</i>  |
|----------------------------|---|
| <b>ACC</b>                 | Colegio Americano de Cardiología (American College of Cardiology).  |
| <b>ACAT</b>                | Enzima acil-CoA: colesterol aciltransferasa (acyl-coenzyme A:acyltransferase cholesterol).  |
| <b>AHA</b>                 | Asociación Americana del Corazón (American Heart Association).  |
| <b>apo</b>                 | Apolipoproteína   |
| <b>BHI</b>                 | Agar infusión cerebro corazón   |
| <b>BSH</b>                 | Hidrolasa de sales biliares   |
| <b>° C</b>                 | Grados Celsius  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>      | Dióxido de carbono  |
| <b>dL</b>                  | Decilitros  |
| <b>EC</b>                  | Ésteres de colesterol   |
| <b>FAO</b>                 | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agricultura Organization of the United Nations) |
| <b>FDA</b>                 | Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration).  |
| <b>g</b>                   | Gramos  |
| <b>GALT</b>                | Tejido linfoide asociado al intestino (gut-associated lymphoid tissue).   |
| <b>GRAS</b>                | Generalmente reconocido como seguro (Generally Recognised As Safe).   |
| <b>h</b>                   | Horas   |
| <b>HDL</b>                 | Lipoproteínas de alta densidad (high density lipoprotein).  |
| <b>HMG-CoAR</b>            | 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa.   |
| <b>IDL</b>                 | Lipoproteínas de densidad intermedia (intermediate-Density Lipoprotein).  |
| <b><i>K. marxianus</i></b> | <i>Kluyveromyces marxianus</i>  |
| <b>LAB</b>                 | Bacterias ácido lácticas  |
| <b>LCAT</b>                | Lecitina- colesterol aciltransferasa (lecithin cholesterol acyltransferase).  |
| <b>LDL</b>                 | Lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein).  |
| <b>Lp(a)</b>               | Lipoproteína (a)  |

## **ABREVIATURAS (*continuación*)**

| <b><i>Abreviatura</i></b> | <b><i>Significado</i></b>   |
|---------------------------|---|
| <b>μL</b>                 | Microlitros   |
| <b>mg</b>                 | Miligramos  |
| <b>mL</b>                 | Mililitros  |
| <b>CAN</b>                | Células asesinas naturales  |
| <b>nm</b>                 | Nanómetros  |
| <b>OMS</b>                | Organización Mundial de la Salud                                  |
| <b>PCR</b>                | Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)   |
| <b>pH</b>                 | Potencial de hidrógeno  |
| <b>QM</b>                 | Quilomicrones   |
| <b>rpm</b>                | Revoluciones por minuto   |
| <b>TG</b>                 | Triglicéridos   |
| <b>UFC</b>                | Unidades formadoras de colonias                                   |
| <b>VLDL</b>               | Lipoproteínas de muy baja densidad (very low-density lipoprotein) |
| <b>YPD</b>                | Extracto de levadura, peptona y dextrosa (yeast peptone dextrose) |
| <b>YPG</b>                | Extracto de levadura, peptona y glucosa (yeast peptone glucose)   |

## RESUMEN

El colesterol elevado en la sangre es un factor de riesgo importante asociado con las enfermedades cardiovasculares y otras discapacidades que, en la actualidad, ocasionan una alta morbi-mortalidad en México y a nivel mundial. Y aunque las dietas bajas en grasas, en condiciones experimentales, han demostrado ser eficaces en la reducción de los niveles de colesterol en sangre, éstas pierden su eficacia a largo plazo, debido a su baja palatabilidad y falta de adhesión del paciente a la dieta. Ante este panorama, se han estudiado nuevas alternativas que contribuyan a la prevención y control de estos padecimientos. Una de estas estrategias es el uso de algunos microorganismos probióticos como las bacterias ácido-lácticas, bifidobacterias y levaduras, que han demostrado reducir los niveles de colesterol sérico en individuos que los consumen habitualmente. Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, aislada del pulque, en la reducción de los niveles de colesterol libre, lo cual se realizó mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Primero, la levadura se sembró en medios de cultivo en presencia de colesterol y en sueros humanos *in vitro*; y posteriormente, se inoculó a ratones CD-1 hembras con hipercolesterolemia inducida por dieta. Los resultados obtenidos con los medios de cultivo inoculados con *K. marxianus* e incubados a 37°C por 10 días, mostraron una disminución en las concentraciones de colesterol significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que los medios de cultivo control sometidos a las mismas condiciones. Así mismo, en los sueros adicionados con la levadura, después de su incubación a 37°C durante 6 días, se observó una disminución en los niveles de colesterol significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación con los sueros sin la levadura bajo las mismas condiciones de ensayo. En el estudio con los ratones CD1 hembras alimentados con dieta alta en colesterol e inoculados con *K. marxianus* por 10 días, se observó una reducción en los niveles de colesterol sérico significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que en los ratones mantenidos sólo con dieta alta en colesterol y con dieta normal. Estos resultados sugieren que *K. marxianus* puede tener un potencial terapéutico para disminuir el colesterol en suero en la hipercolesterolemia inducida por la dieta.

**Palabras clave:** Levadura, *Kluyveromyces marxianus*, probiótico, reducción de colesterol, ratones CD-1 hembras.

## ABSTRACT

High levels of cholesterol in blood are a major risk factor associated with cardiovascular disease and other disabilities that currently cause high morbidity and mortality in Mexico and worldwide. Although low-fat diets, under experimental conditions, have been effective in reducing cholesterol levels in the blood, these lose their long-term effectiveness, due to its low palatability and poor adherence of the patient to diet. Because of this, new alternatives have been studied to contribute to the prevention and control of these diseases. One possibility is the use of some probiotic microorganisms such as lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts, which have been shown to reduce serum cholesterol levels in individuals who regularly consumed. Considering the above, the aim of this study was to evaluate the effect of the yeast *Kluyveromyces marxianus*, isolated pulque, in reducing the levels of free cholesterol, which was carried through *in vitro* and *in vivo* assays. Firstly, yeast was seeded in cultures in presence of cholesterol and human serum, *in vitro*, and thereafter, yeast was inoculated to CD-1 female mice with diet-induced hypercholesterolemia. The results obtained with the cultures inoculated with *K. marxianus* and incubated at 37 ° C for 10 days, showed a decrease in cholesterol concentration significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the control cultures under the same conditions. Also, in the serums added with yeast, after incubation at 37°C for 6 days, was observed a decrease in cholesterol levels significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared with serums without yeast under the same assay conditions. In the study with CD-1 female mice fed high-cholesterol diet and inoculated with *K. marxianus* for 10 days was observed a reduction of serum cholesterol levels significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in mice maintained only high cholesterol diet and normal diet. These results suggest that *K. marxianus* may have therapeutic potential to lower serum cholesterol in diet induced hypercholesterolemia.

**Keywords:** Yeast, *Kluyveromyces marxianus*, probiotics, cholesterol lowering, CD-1 female mice.

## 1. INTRODUCCIÓN

A pesar de la importancia biológica del colesterol en el organismo, es bien sabido que concentraciones séricas elevadas, ocasionan alteraciones con un daño potencial a la salud, debido a que se ha observado que un nivel elevado de colesterol en el suero juega un papel crítico en la aterogénesis y desarrollo de la placa coronaria <sup>(1)</sup>, lo que contribuye a la disfunción endotelial causada por la aterosclerosis, la cual representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de patologías sistémicas <sup>(2)</sup>.

Entre las principales enfermedades que afectan a los seres humanos hoy en día y en las que, el colesterol elevado en sangre es uno de los factores de riesgo más importantes, están las enfermedades cardiovasculares, como la patología cardiovascular aterosclerótica, que actualmente, es una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo, principalmente en países industrializados <sup>(3,4)</sup>. A nivel mundial representa 17.3 millones de muertes al año <sup>(1)</sup>, además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pronosticado que en el año 2030, las enfermedades cardiovasculares seguirán siendo las principales causas de muerte, afectando aproximadamente a 23,6 millones de personas en todo el mundo <sup>(1)</sup>.

En México, de acuerdo a las estadísticas obtenidos por la Secretaría de Salud en 2008, dentro de las diez principales causas de mortalidad se encontraron las enfermedades isquémicas del corazón, enfermedad cerebrovascular y la hipertensión <sup>(5)</sup>, las cuales se sabe, tienen como uno de los principales factores de riesgo el exceso en el consumo de colesterol en la alimentación habitual.

Por lo tanto, la hipercolesterolemia, es un problema grave de salud pública que requiere estrategias de intervención efectivas. En este sentido, se ha comprobado que una reducción de 1% de colesterol disminuye el riesgo de cardiopatía coronaria en un 2-3 % <sup>(3,6)</sup>.

A nivel preventivo y de control, una de las estrategias para el tratamiento de estas enfermedades crónico-degenerativas, es la regulación de los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre, a través de la dieta y terapias con fármacos, sin embargo, este último recurso, además de provocar efectos secundarios, han ocasionado un gasto excesivo en salud a nivel mundial, en el sector público y privado; y en México no ha sido la excepción.



Ante esta situación actual, se hace necesario desarrollar alternativas más sanas para la población que coadyuven al tratamiento y prevención de estos padecimientos y con esto se contribuya a la disminución en el consumo de medicamentos y del gasto excesivo que han generado estas enfermedades en México.

Dentro de las terapias alternativas, que se han ido adoptando cada vez más a nivel mundial, para disminuir los niveles de colesterol en sangre, se encuentra el consumo de los llamados alimentos funcionales, en los cuales se ha observado que no sólo cumplen una función de nutrición, sino que contienen sustancias bioactivas tales como ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6; compuestos fitoquímicos como polifenoles, fitoesteroles, lignanos y licopeno, proteína de soja, fibras solubles, y los llamados prebióticos, simbióticos y probióticos, que aportan beneficios a la salud de quien los consume de manera habitual (3,7,8).

En particular, dentro de los componentes bioactivos que han sido adicionados en estos alimentos funcionales y que han recibido mayor atención en la actualidad por sus beneficios a la salud son los probióticos, los cuales se definen como microorganismos vivos que confieren beneficios para la salud cuando se administran en cantidades adecuadas <sup>(9)</sup>. Dentro de los beneficios encontrados destacan: mejora de la digestión y de la intolerancia a la lactosa, el aumento de la resistencia natural a las enfermedades infecciosas en el tracto gastrointestinal <sup>(10)</sup>, la supresión del cáncer, control de la glucemia y reducción del nivel de colesterol en suero <sup>(11-13)</sup>.

En este sentido, las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias, son los microorganismos que más se han estudiado, se les ha considerado como comensales humanos por lo que han sido aplicados desde hace mucho tiempo de forma segura en la fermentación de alimentos y, en diversos estudios realizados, se les ha encontrado numerosas propiedades probióticas (14,15).

Así mismo, en la actualidad, hay un particular interés en el estudio de las propiedades probióticas de las levaduras que, aunque hay muy pocos estudios al respecto, se han tenido resultados interesantes, entre los que sobresalen: la capacidad de mejorar la biodisponibilidad de los minerales a través de la hidrólisis de fitato y la desintoxicación de micotoxinas <sup>(16,17)</sup>, así como la disminución de la intolerancia a la lactosa <sup>(18)</sup> y disminución de los niveles de colesterol en sangre <sup>(19)</sup>.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus*, la cual se ha encontrado en bebidas lácteas fermentadas como el kumis <sup>(18)</sup> y el Kéfir <sup>(20)</sup> además del pulque <sup>(21)</sup>. Estas dos últimas, consideradas bebidas de consumo tradicional en México y en las cuales también se han hallado un gran número de bacterias con propiedades probióticas, al igual que otras especies de levaduras <sup>(22,23)</sup>.

Se evaluó el efecto probiótico de esta levadura en la disminución de los niveles de colesterol, en ensayos *in vitro* mediante la incorporación de la levadura en medios de cultivo ricos en colesterol y en experimentos *in vivo*, mediante la evaluación del efecto de la inoculación de la levadura en la disminución de los niveles séricos de esta molécula en ratones con hipercolesterolemia inducida, todo esto, con la finalidad de conocer sus propiedades probióticas específicas y así contribuir a su posible aplicación en alimentos funcionales.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Colesterol

El colesterol fue descrito por el francés Poulletier de la Salle en 1770, quien lo aisló de los cálculos biliares, por lo que en un principio fue llamado colestiramina (grasa biliar) y posteriormente lo renombraron colessterina (choles= bilis y estéreos= sólido). Al final se denominó colesterol al encontrar en su molécula la presencia de un  $\text{-OH}$  <sup>(24)</sup>.

El colesterol es un alcohol que pertenece al grupo de los esteroides (esterol), está compuesto por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno que se disponen formando 4 anillos unidos entre sí y con una cadena lateral, como se observa en la figura 1. Al ser un esteroide, es considerado un lípido, por lo que no se puede disolver en agua, solo en disolventes orgánicos como el alcohol, el éter, la acetona y el cloroformo. En la naturaleza se encuentra en dos formas: como colesterol libre y como éster de colesterol, que surge de la combinación de la molécula de colesterol con diferentes ácidos grasos <sup>(25)</sup>.

Los valores normales de colesterol total para la población deben ser menor o igual a 200 mg/dL, mientras que evidencia científica revela que valores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) entre 30 y 70 mg/dL deberían considerarse como realmente saludables para los seres humanos <sup>(26)</sup>.

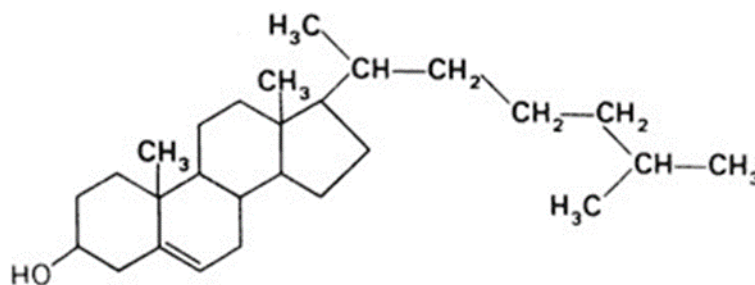


Figura 1. Estructura del colesterol: compuesto por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno que se disponen formando 4 anillos unidos entre sí y con una cadena lateral. Su grupo hidroxilo (OH) es su grupo activo (hidrófilo), en donde se une un ácido graso para formar un éster de colesterol (tomado de Tudela <sup>(25)</sup>, 2008).

### 2.1.1 Metabolismo del colesterol en el organismo humano

El colesterol de nuestro organismo se obtiene de dos fuentes principales: de la dieta (colesterol exógeno) y el que se sintetiza dentro del cuerpo (colesterol endógeno) <sup>(26)</sup>. El colesterol endógeno se produce principalmente en el hígado, se sintetiza en las mitocondrias y en la fracción microsómica (retículo endoplásmico) del citosol. Prácticamente todos los tejidos que contienen células nucleadas pueden sintetizar colesterol <sup>(2)</sup>. El colesterol endógeno representa el 70% del colesterol corporal, mientras que el colesterol exógeno representa el 30% restante <sup>(27)</sup>.

La síntesis de colesterol es regulada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoAR) y es el producto de varias reacciones químicas controladas por enzimas (figura 2). La actividad de la enzima, es controlada por el flujo de colesterol intestinal hacia el hígado <sup>(26)</sup>.

La acetil-CoA proporciona todos los átomos de carbono para la síntesis del colesterol, la cual puede dividirse en cinco etapas <sup>(2)</sup>:

1. Síntesis de mevalonato, compuesto de seis carbonos, a partir de acetil-CoA.
2. Formación de unidades isoprenoides por pérdida de CO<sub>2</sub> del mevalonato.
3. Condensación de seis unidades isoprenoides para formar el intermediario, escualeno.
4. Cierre del escualeno para la formación cíclica del esteroide precursor, lanosterol.
5. El colesterol se forma del lanosterol después de varios pasos posteriores que incluyen la pérdida de tres grupos metilo.

El intestino junto con el hígado son los dos órganos principales para la síntesis de colesterol en mamíferos <sup>(24)</sup>.

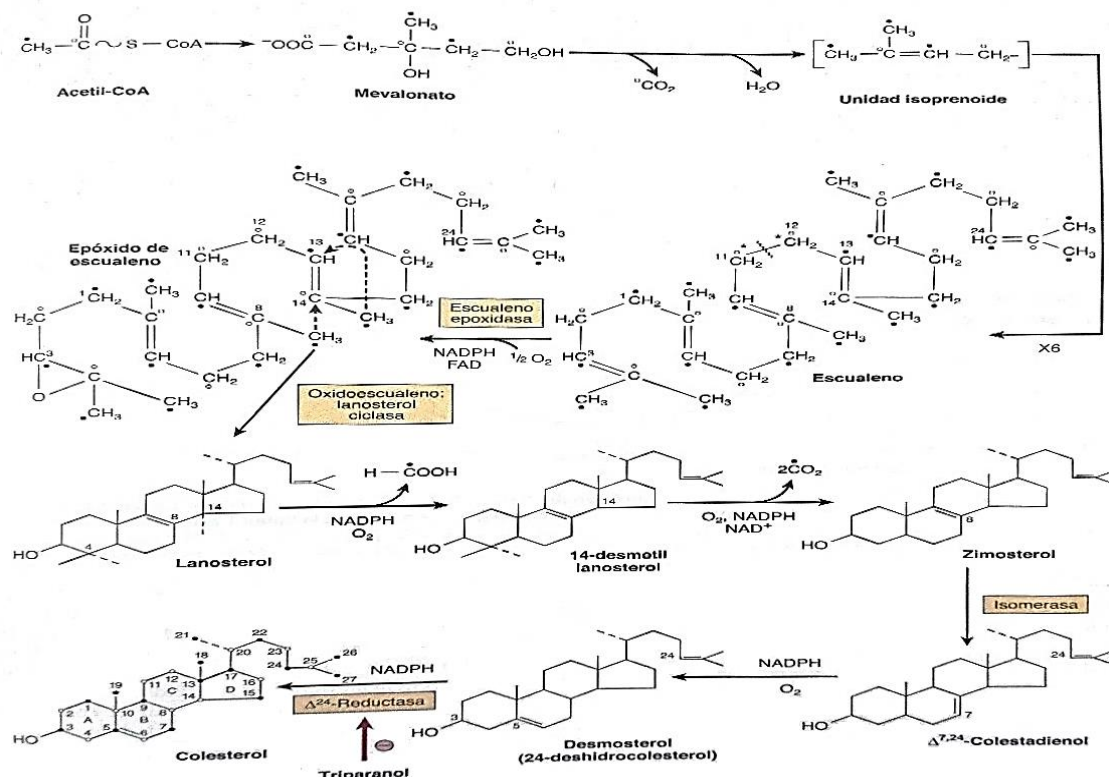


Figura 2. Vía de biosíntesis del colesterol. Se observan las diferentes fases en la síntesis de colesterol, destacando los siguientes pasos para la formación de colesterol: síntesis de mevalonato a partir de acetil-CoA, formación de unidades isoprenoideas a partir del mevalonato, condensación de 6 unidades isoprenoideas para formar escualeno, cierre del escualeno para la formación cíclica de lanosterol y la formación del colesterol a partir del lanosterol, después de varios pasos que incluyen la pérdida de tres grupos metilo. (Tomado de Murray *et al* <sup>(28)</sup>, 2013).

### 2.1.2 Absorción intestinal de colesterol

El colesterol que está en la luz intestinal deriva principalmente de la secreción biliar, la dieta y en menor cantidad de la descamación del epitelio intestinal <sup>(2)</sup>.

En una dieta occidental, en promedio, se consumen de 300 a 500 mg de colesterol, la bilis proporciona entre 800 y 1,200 mg al día a la poza intraluminal, y las células de descamación del epitelio aportan casi 300 mg diarios. El duodeno y el yeyuno proximal son los sitios más importantes de absorción de colesterol <sup>(29)</sup>.

La absorción del colesterol intestinal es un proceso complejo, que tiene al menos 3 fases <sup>(2)</sup>:

1. Intraluminal: solubilización micelar
2. Mucosa: transporte a través de la membrana apical para la absorción en los enterocitos.
3. Intracelular: movilización de los quilomicrones y su secreción a la linfa y sangre a través de la membrana basolateral de los enterocitos.

Para la absorción del colesterol esterificado que entra en el lumen intestinal, es necesario su hidrólisis por la esterasa de colesterol pancreática y la acción de las sales biliares, las cuales están formadas, entre otras sustancias, de ácidos biliares que son ácidos esteroides sintetizados a partir de colesterol en el hígado. Después de su síntesis, los ácidos biliares se secretan junto con otros constituyentes biliares en el intestino delgado proximal <sup>(30)</sup>. Las sales biliares son detergentes anfipáticos, que solubilizan lípidos formando micelas, actúan englobando los monoglicéridos y ácidos grasos, junto con el colesterol no esterificado, manteniéndolos en suspensión <sup>(24)</sup>. Una porción variable de colesterol proveniente de la dieta es esterificado a ácidos grasos <sup>(29)</sup>.

Después de la acción de las enzimas pancreáticas y las sales biliares, el colesterol es absorbido por el intestino en forma de monómeros (colesterol libre). Aquí, las micelas lo transportan del lumen hacia las células del borde en cepillo del intestino, donde es absorbido por los enterocitos. Ya dentro del enterocito, aproximadamente la mitad de las moléculas de colesterol se mueven hacia el retículo endoplásmico, donde es esterificado nuevamente por la acción de la enzima acil-CoA: colesterol aciltransferasa intestinal (ACAT), colesterol esterasa (CE) y colesterol éster-sintetasa (CES), antes de su incorporación a las partículas de quilomicrones <sup>(24,29)</sup>.

Por último, las sales biliares que participaron en la digestión y absorción de los lípidos, llegan al ileon terminal para ser absorbidas, después son transportados en la circulación portal al hígado para su absorción y resecretión en la bilis. Aproximadamente el 95% de los ácidos biliares secretados en el intestino delgado se recupera <sup>(30)</sup>.

Las sales biliares que no se reabsorben en el intestino delgado, pasan al colon y son eliminados en las heces como esteroides neutros; ésta es la vía más importante de eliminación de esteroides del organismo <sup>(29)</sup>.

### **2.1.3 Transporte del colesterol en el organismo humano: papel de las lipoproteínas**

Los lípidos plasmáticos como los triglicéridos (TG), ésteres del colesterol (EC), fosfolípidos y colesterol libre, son insolubles en medios acuosos como la sangre, de tal forma que deben ser empaquetados en partículas de lipoproteína para su transporte. Cerca del 70% del colesterol se encuentra unido a lipoproteínas plasmáticas en forma de ésteres de colesterol <sup>(31)</sup>. Las lipoproteínas son complejos de lípidos y proteínas específicas, llamadas apolipoproteínas (apo). Tienen como función el transporte de lípidos en un medio acuoso como es la sangre ya que poseen la capacidad de solubilizar los lípidos en la misma. Los principales lípidos transportados por las lipoproteínas incluyen como elementos mayoritarios el colesterol no esterificado, el colesterol esterificado, los TG y los fosfolípidos <sup>(32)</sup>.

Estructuralmente, una lipoproteína es como una esfera que tiene un núcleo no polar formado de TG y colesterol esterificado y que está rodeada por una capa superficial única de lípidos anfipáticos tales como los fosfolípidos y colesterol no esterificado, con su parte polar hacia la parte exterior de la partícula. Las apolipoproteínas pueden hallarse en la superficie de la partícula o tener una parte en la superficie y otra parte sumergida dentro de la partícula <sup>(33)</sup>. Las apolipoproteínas, aportan estabilidad estructural, además de servir como ligandos para receptores celulares que determinan el destino metabólico de partículas individuales o actúan como cofactores para enzimas comprendidas en el metabolismo de las lipoproteínas <sup>(34)</sup>.

Las lipoproteínas tienen distintas densidades, esto es debido a la proporción relativa de lípidos y proteínas que posee cada partícula. Así, las lipoproteínas menos densas son las más grandes y con mayor contenido de lípidos y menor cantidad de proteínas <sup>(32)</sup>.

Dentro de las lipoproteínas de mayor importancia clínica encontramos las siguientes:

- 1. Quilomicrones (QM):** son las partículas lipoproteicas más grandes y menos densas ( $d < 1,000$  g/ml), con menos proporción proteica y con un gran componente lipídico <sup>(32)</sup>. Están formadas por 90% de TG, 7% de fosfolípidos, 1% colesterol, y un 2% de proteínas especializadas, mayoritariamente apo B-48. La apo B-48 se sintetiza en el intestino delgado, le confiere soporte estructural a los QM y permite su secreción desde el hígado. Los QM se sintetizan en los enterocitos <sup>(2)</sup>. La principal función de los QM es aportar a los tejidos, principalmente al músculo esquelético y al tejido adiposo, los lípidos obtenidos de la ingesta, principalmente TG <sup>(33)</sup>.
- 2. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés, Very Low-Density Lipoprotein):** Son también partículas grandes, poco densas ( $d < 1,006$  g/ml) y muy ricas en triglicéridos de origen endógeno, se sintetizan en el hígado <sup>(32)</sup>. Contienen entre 10 y 15% del colesterol plasmático, fosfolípidos y un conjunto característico de apolipoproteínas: Apo B-100, apo C-I, apo C-II, apo C-III y apo E <sup>(2)</sup>. El principal estímulo para la síntesis de VLDL parece ser la captación y el catabolismo de QM residuales por parte del hígado. La principal función de las VLDL es, de forma análoga a la de los QM, el transporte de triglicéridos y su suministro (en forma de ácidos grasos) a los tejidos muscular y adiposo <sup>(32)</sup>.
- 3. Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, del inglés, Intermediate-Density Lipoprotein):** Estas lipoproteínas son menos densas que las VLDL ( $d < 1,019$  g/ml,  $> 1,006$  g/ml) <sup>(32)</sup>, tienen altas concentraciones de colesterol y fosfolípidos, pues provienen del proceso de degradación de las VLDL <sup>(2)</sup> y tienen una composición apolipoproteica similar a éstas <sup>(32)</sup>. La hidrólisis de los TG libera ácidos grasos y las partículas resultantes de IDL contienen menor porcentaje de TG y fosfolípidos y la misma magnitud de colesterol. Por lo tanto, son partículas más heterogéneas <sup>(2)</sup>.



- 4. Lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés, Low-Density Lipoprotein):** Las LDL ( $d < 1,063 \text{ g/ml}$ ,  $> 1,019 \text{ g/ml}$ ) contienen apo B-100 y como componente lipídico mayoritario ésteres de colesterol y moderada de fosfolípidos, no contienen TG. Son sintetizadas en el hígado. La función de las LDL es el transporte y entrega de colesterol a las células, incluyendo tejidos periféricos e hígado <sup>(32)</sup>. Debido a su alta aterogenicidad, es de gran interés clínico, ya que representa entre 60-70% del colesterol sérico total y su función es transportar el colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos <sup>(2)</sup>.
- 5. Lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés, High-Density Lipoprotein):** Las HDL son las más densas ( $d < 1,21 \text{ g/ml}$ ,  $> 1,063 \text{ g/ml}$ ), se caracterizan por su contenido en apo A-I (constituye más del 70% del contenido proteínico del total de la partícula de HDL) y en apoA-II que es su segunda apolipoproteína más abundante, además de contener ésteres de colesterol. Su síntesis depende del catabolismo de las partículas ricas en TG (QM y VLDL) y de la síntesis de apo A-I, en un principio no asociada a lípidos, por parte del hígado y del intestino <sup>(32)</sup>. Son producidas por el hígado (30%) y el intestino (70%). Su función principal es extraer el colesterol sobrante de los tejidos periféricos y de ateroma en las arterias, llevan aproximadamente el 30% del colesterol sérico, y transportarlo al hígado para su eliminación en forma de ácidos biliares y colesterol en las heces, proceso conocido como transporte inverso de colesterol <sup>(33)</sup>. En el plasma, las HDL se convierten en un éster de colesterol por acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) <sup>(2)</sup>. Otras funciones relevantes de estas lipoproteínas es la inhibición de la modificación oxidativa de las LDL y su capacidad antiinflamatoria y antitrombótica. La función de las HDL depende en gran parte de su contenido en apo A-I <sup>(32)</sup>. La HDL es conocida por ser protector contra las enfermedades cardiovasculares <sup>(33)</sup>.

**6. Lipoproteína (a) [Lp(a)]:** es el único tipo de lipoproteínas que no es definido por su densidad (similar a las LDL) sino por la presencia de una apolipoproteína específica, la apo(a), que se une a la apo B-100 por diversos tipos de enlaces químicos, entre ellos un puente disulfuro, además contiene una gran cantidad de ésteres de colesterol y fosfolípidos, su composición es muy similar a la LDL. Es sintetizada y secretada por el hígado <sup>(33)</sup>. Estructuralmente es parecida al plasminógeno, esta similitud estructural le confiere la capacidad de unirse con la fibrina y a las proteínas de las membranas celulares. La Lp(a) puede interferir con la fibrinólisis, así como contribuir a los depósitos de lípidos y estimular el crecimiento de células musculares lisas, lo cual favorece la aterogénesis, por lo que constituye un factor genético de riesgo para la aterosclerosis <sup>(2)</sup>. Su función no es bien conocida, sin embargo, se cree que podría regular a la baja la fibrinólisis al competir por la activación del plasminógeno y su concentración se correlaciona de forma directa con el riesgo de aterotrombosis <sup>(32)</sup>.

#### 2.1.4 Homeostasis del colesterol

El hígado y el intestino son los órganos encargados de la homeostasis del colesterol en el cuerpo, la Figura 3 muestra las interacciones entre los tejidos periféricos, el hígado y el intestino en el mantenimiento del equilibrio del colesterol <sup>(2)</sup>.

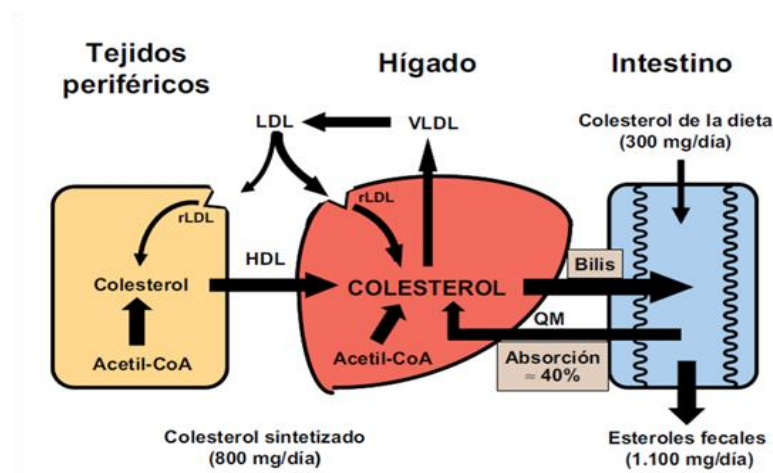


Figura 3. Homeostasis general del colesterol en el organismo. HDL: Lipoproteínas de alta densidad; rLDL: Receptor para las lipoproteínas de baja densidad (LDL); QM: Quilomicrones; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (tomado de Maldonado *et al* <sup>(2)</sup>, 2012).

La homeostasis del colesterol en el cuerpo está gobernada por la interacción entre la absorción, síntesis, y la excreción o la conversión de colesterol en ácidos biliares. Sin embargo, hay varios factores que influyen en el metabolismo del colesterol y por lo tanto en su equilibrio en el cuerpo y que es inherente a cada individuo, estos son las interacciones gen-gen, los efectos de genes-medio ambiente, la edad, la cantidad y la composición de los ácidos biliares, los factores dietéticos, además de la composición y densidad bacteriana que existe en la flora intestinal <sup>(2,35)</sup>.

En situaciones de equilibrio homeostático, la cantidad de colesterol excretada diariamente en las heces (aproximadamente 1100 mg procedentes de la dieta, la bilis y la descamación epitelial intestinal) es igual a la suma del sintetizado por los tejidos (800 mg en promedio) y del aportado por las comidas (300 mg en promedio) <sup>(2)</sup>.

Así mismo, la mucosa intestinal es importante en la regulación del metabolismo del colesterol en el organismo ya que, en la mucosa intestinal ocurre la absorción de colesterol de la dieta y el endógeno (colesterol biliar), además, el enterocito secreta colesterol al sistema circulatorio en forma de lipoproteínas (quilomicrones) <sup>(24)</sup>.

El "pool" de colesterol en el enterocito debe mantenerse constante para cumplir eficazmente dos funciones importantes: 1) mantener el aporte de colesterol necesario para la síntesis y diferenciación de membranas celulares, ya que la superficie mucosa está continuamente en renovación y 2) facilitar colesterol para la incorporación a lipoproteínas durante la absorción de TG <sup>(24)</sup>.

### **2.1.5 Funciones del colesterol en el organismo humano**

El colesterol forma parte de las membranas de muchas células animales. En los animales superiores está en todos los tejidos, sin embargo, las concentraciones más elevadas se presentan en el cerebro, el hígado, la piel y las glándulas adrenales. El cuerpo humano adulto contiene aproximadamente 100 gramos de colesterol, gran parte se encuentra como componente estructural de las membranas de las células; es esencial para reparar la membrana o formar membrana nueva cuando una célula animal se divide o se rompe <sup>(25)</sup>.

Además de estas importantes funciones en la célula, el colesterol es una molécula de la cual se fabrican otros esteroides biológicamente activos tales como:

1. **Vitamina D3 (colecalfiferol):** es la forma normalmente encontrada en los mamíferos, se forma con la irradiación ultravioleta del 7-dehidrocolesterol, producto intermedio en la cadena de reacciones de la síntesis del colesterol. Esta vitamina contribuye a la absorción del calcio en el estómago y el intestino, y ayuda a mantener niveles adecuados de este mineral en la sangre <sup>(25)</sup>.
2. **Ácidos biliares:** son ácidos esteroides que se forman a partir del catabolismo del colesterol libre, fosfolípidos y del mismo colesterol, entre otros, y son los principales solutos de la bilis <sup>(29,30)</sup>. Cuando los ácidos biliares se combinan con los aminoácidos glicina y taurina se forman las sales biliares, que son el principal ingrediente activo de la bilis. Son poderosos agentes emulsificantes, ya que ayudan a romper las grasas en partículas pequeñas en el intestino favoreciendo, de este modo, su digestión y absorción <sup>(25)</sup>. El 95% del colesterol utilizado para la producción de bilis proviene del colesterol libre de las lipoproteínas y QM, y el 5% restante se sintetiza en forma endógena <sup>(29)</sup>.
3. **Hormonas esteroideas:** Estas hormonas se clasifican en tres grupos: glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales; todas derivan de la progesterona que a su vez proviene del colesterol. Se fabrican en tejidos especializados como los testículos, los ovarios y la corteza adrenal <sup>(25)</sup>.
  - Los glucocorticoides son parte importante en la regulación del metabolismo de los azúcares y las proteínas; entre ellos está la cortisona o cortisol, que regula la utilización de los carbohidratos. El cortisol también es un importante antiinflamatorio <sup>(25)</sup>.
  - Los mineralocorticoides, de los cuales la más importante es la aldosterona, regulan la cantidad de sodio y otros minerales que contienen los líquidos extracelulares <sup>(25)</sup>.

- Las hormonas sexuales: Son los andrógenos como la androsterona y testosterona, y los estrógenos como el estradiol, estrona y estriol. Estas hormonas son esenciales para el desarrollo de las características sexuales masculinas y femeninas del cuerpo en crecimiento, en el hombre adulto los andrógenos son esenciales para la producción del esperma y el funcionamiento de las glándulas accesorias del tracto genital, estimulan la fabricación de proteínas y el crecimiento de los huesos, y favorecen la retención de nitrógeno. Los estrógenos, que se producen en el ovario, en la placenta durante el embarazo y en menor cantidad en los testículos, son parte esencial en el metabolismo de sustancias como el calcio, grasas y proteínas, y confieren las características sexuales femeninas <sup>(25)</sup>.

#### **2.1.6 Efectos de la hipercolesterolemia en el organismo**

La hipercolesterolemia es una dislipidemia que prevalece como una enfermedad asintomática, solamente detectada mediante concentraciones sanguíneas anormales de colesterol total y colesterol HDL a través de estudios de laboratorio. Su aterogenicidad se debe, principalmente, a dos mecanismos: primero, al acúmulo en el plasma de lipoproteínas que contienen la apoproteína B principalmente LDL, que alteran la función de la pared endotelial y se depositan en las placas de ateroma; y segundo, a una disminución de la concentración de HDL que protege contra esta acumulación de LDL en el endotelio <sup>(26,36)</sup>.

Esta acumulación excesiva de colesterol en los tejidos es un factor de riesgo importante para el desarrollo de aterosclerosis, que daña el endotelio de forma crónica, lo que aumenta el riesgo de enfermedades sistémicas tales como el accidente vascular cerebral, el infarto agudo de miocardio, la insuficiencia cardíaca y la hipertensión arterial <sup>(36,37)</sup>.

Al respecto, se ha visto que el riesgo de ataque al corazón es tres veces mayor en los pacientes con hipercolesterolemia, en comparación con aquellos que tienen perfiles normales de lípidos en sangre <sup>(38)</sup>, esto debido a que se ha comprobado que elevadas concentraciones de lipoproteínas que contienen apolipoproteína-B son esenciales en el desarrollo de la placa coronaria <sup>(1)</sup>.

Por el contrario, como ya se ha mencionado, los niveles de HDL tienen un efecto protector contra la enfermedad cardiovascular. En un meta-análisis que incluyó 4 estudios prospectivos se llegó a la conclusión que por cada aumento de 1 mg/dL de HDL, se disminuye el riesgo de padecer eventos coronarios un 2% en los hombres y un 3% en las mujeres <sup>(39)</sup>.

Adicionalmente, se ha observado una mayor prevalencia de hipertensión arterial en sujetos afro-americanos, y de síndrome metabólico en las poblaciones latinoamericanas, ambas patologías favorecidas por concentraciones plasmáticas elevadas de colesterol total y LDL <sup>(36,40)</sup>.

Por último, en recientes estudios, se ha observado que la hipercolesterolemia juega un papel importante en el desarrollo de varias otras enfermedades como la diabetes, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, trastornos de la respuesta inmune y cánceres <sup>(41-43)</sup>.

Ante este panorama, se han investigado alternativas más inocuas para el ser humano, que contribuyan al tratamiento de estas enfermedades, una de ellas son los microorganismos probióticos, entre ellos, algunas especies de levaduras, que han demostrado ser eficaces en el tratamiento de las dislipidemias.

## **2.2 *Kluyveromyces marxianus***

La levadura *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) pertenece a la división Ascomycota, se reproduce por gemación multilateral y mediante ascosporas. Sus esporas son esféricas <sup>(44)</sup>, liberándose al llegar a su madurez <sup>(18,45)</sup>.

Aunque esta levadura se encuentra predominantemente en productos lácteos <sup>(45)</sup>, se ha aislado de una gran variedad de hábitats, lo que habla de su gran diversidad metabólica <sup>(46)</sup>. No obstante, dentro de las generalidades de esta especie, cabe destacar que tiene un metabolismo aeróbico y fermenta diversos azúcares <sup>(47)</sup>, incluso a altas temperaturas, produciendo a partir de éstos, muy bajas cantidades de alcohol <sup>(44,48)</sup>; aunque con el exceso de azúcar hay ausencia de metabolismo fermentativo <sup>(46)</sup>.

*K. marxianus* produce una variedad de enzimas de gran importancia biotecnológica, tales como la inulinasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, y endopoligalacturonasas. Además de algunas enzimas menos destacadas, pero con potencial aplicación en la industria, como fosfatasas, carboxipeptidasas y aminopeptidasas <sup>(46)</sup>.

La enzima  $\beta$ -galactosidasa o lactasa que produce la levadura, es una enzima intracelular inducible por carbohidratos como la lactosa, la que hidroliza en glucosa y galactosa <sup>(18)</sup>, mientras que la inulinasa o  $\beta$ -1,2-fructan-fructanohidrolasa, es una enzima encargada de hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,2 fructano de la inulina. La hidrólisis completa de la inulina lleva a la formación de fructosa y glucosa <sup>(49,50)</sup>. Cabe destacar que, por su capacidad de hidrolizar la lactosa, se le ha relacionado con la fermentación natural de productos lácteos fermentados como el kéfir y kumis <sup>(51,52)</sup>.

Aunado a esto, se ha observado que produce otros compuestos importantes como oligonucleótidos, oligosacáridos y oligopéptidos también de gran importancia biotecnológica <sup>(46)</sup>.

Finalmente, cabe mencionar otras características relevantes de *K. marxianus* como la presencia de un solo tipo de esterol, el ergosterol, además de que, puede crecer en una variedad amplia de sustratos, tiene altas tasas de crecimiento y es una levadura termotolerante <sup>(47)</sup>, ya que se ha observado que es capaz de crecer dentro de un amplio intervalo de temperaturas, que van desde los 4 hasta los 45 °C <sup>(53)</sup>, incluso, en algunos estudios realizados, se ha observado su crecimiento a una temperatura de hasta 50 °C <sup>(46,54)</sup>.

### **2.2.1 Aplicaciones biotecnológicas de *K. marxianus***

La lactasa producida por *K. marxianus* se ha establecido como una enzima generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos <sup>(55)</sup>, por lo que se considera una enzima segura para su aplicación en la industria alimentaria.

Así, se ha utilizado la lactasa producida por esta levadura, para producir jarabes que sirven como sustituto del jarabe de maíz o sacarosa en las industrias de heladerías, reposterías y panaderías; además su adición a productos lácteos como leche, yogurt, crema agria y mantequilla mejora el sabor sin que se incremente el contenido calórico, favoreciendo además, el consumo en personas con intolerancia a la lactosa <sup>(55)</sup>. Igualmente, se ha utilizado en la industria láctea para hidrolizar la lactosa del suero de leche, lo que permite el aprovechamiento de este abundante subproducto, que de forma habitual es desechado en aguas residuales, lo que representa un gran problema de contaminación <sup>(56)</sup>.

También *K. marxianus* se ha usado para la obtención de concentrados proteicos a partir de la biomasa producida por la levadura, que es cultivada en suero lácteo desproteinizado <sup>(57)</sup>, así como para la obtención de inulinasa <sup>(50,58)</sup>, la cual se utiliza para la producción de fructosa a partir de la hidrólisis de la inulina y para la producción de fructo-oligosacáridos que se pueden utilizar como prebióticos en alimentos funcionales <sup>(50)</sup>.

En adición, los oligonucleótidos producidos por la levadura, son usados como potenciadores del sabor en productos alimenticios y los oligopéptidos, como estimuladores inmunológicos, añadidos a los productos lácteos que se liberan en el mosto después de la proteólisis de proteínas del suero de leche <sup>(46)</sup>.

Por último, es de destacar la utilización *K. marxianus* para el desarrollo del aroma fino del grano de cacao <sup>(59)</sup>.

### **2.3 Probióticos**

El término probiótico significa “pro vida”, es decir que favorecen la vida y fue adoptado en 1960, para distinguir las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos <sup>(60)</sup>, sin embargo, Fuller <sup>(61)</sup> en 1989 con el propósito de destacar el carácter microbiano de los probióticos, los definió como:

“suplemento dietético a base de microorganismos vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”.



Actualmente, la definición más aceptada y por lo tanto, más utilizada es la propuesta por Guarner y Schaafsma <sup>(62)</sup> en 1998:

“los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables”.

Actualmente, los microorganismos probióticos son considerados dentro los subgrupos más importantes de los llamados alimentos funcionales, los cuales se han definido como alimentos que, además de cumplir una función de nutrición, tienen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad <sup>(11,63)</sup>, así, los alimentos funcionales del tipo probiótico, son productos que contienen microorganismos definidos y viables en cantidad suficiente para modificar la microflora del huésped, provocando un efecto beneficioso sobre la salud de éste <sup>(64)</sup>.

### **2.3.1 Criterios establecidos para determinar la capacidad probiótica de un microorganismo**

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, y la Organización Mundial de la Salud <sup>(65)</sup> (FAO y OMS, por sus siglas en inglés) han establecido algunas directrices con la finalidad de evaluar las propiedades de los probióticos que, aunque se enfocan al uso de bacterias, pueden ser considerados para el estudio de las propiedades probióticas de las levaduras.

Estos criterios son los siguientes:

- 1. Identificación del género, la especie y la cepa probiótica:** los efectos benéficos no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que dependen de la cepa. Por eso, es necesario realizar su identificación por métodos de caracterización fenotípica y genotípica. La nomenclatura aplicada debe establecerse por criterios científicos, y se recomienda preservar las cepas en una colección de cultivos reconocida internacionalmente.

- 2. Pruebas *in vitro* para la selección de probióticos de uso en humanos:** aquí se incluyen: a) resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, ya que son condiciones de estrés que crean una barrera limitante para su supervivencia en este ecosistema; b) adherencia al *mucus* y las células epiteliales, esto debido a que se consideran propiedades que los probióticos deben tener para ejercer efectos inmunomoduladores y limitar la adhesión de patógenos; c) habilidad para reducir la adhesión de la flora competitiva y actividad antimicrobiana que favorezca el desplazamiento de patógenos y; d) capacidad para hidrolizar las sales biliares.
- 3. Seguridad de los probióticos:** es importante evaluar los efectos colaterales de las cepas utilizadas como son: implicación en infecciones sistémicas, actividades metabólicas nocivas, estimulación excesiva del sistema inmune y transferencia de genes, con el fin de garantizar su inocuidad. Para ello se recomienda que sean sometidas a las siguientes pruebas de caracterización:
- a) Resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles.
  - b) Actividades metabólicas perjudiciales (p. ej., producción de ácido D-láctico).
  - c) Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores.
  - d) Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora de estas.
  - e) Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.
- 4. Estudios *in vivo* utilizando animales y humanos:** el objetivo es demostrar las propiedades atribuidas a los probióticos en relación con la mejoría de una condición clínica, síntoma, bienestar y calidad de vida, reducción del riesgo de enfermedad y rapidez en la recuperación de una enfermedad, entre otros.

### 2.3.2 Mecanismos de acción de los probióticos

Se ha observado en diferentes estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, que los probióticos pueden influir en la composición de la microflora intestinal, en la función de barrera de la mucosa y el epitelio y en el sistema inmune de la mucosa, mediante distintos mecanismos, a través de los cuales ejercen sus efectos benéficos <sup>(7,66,67)</sup>. Aquí se detallan los principales mecanismos de acción:

#### 1. *Interacción de los probióticos con la microflora intestinal*

La colonización bacteriana del intestino inicia con el nacimiento, debido a que los recién nacidos están en un ambiente estéril hasta que comienza el parto, y permanece toda la vida con cambios importantes conforme avanza la edad <sup>(68)</sup>. Al respecto, se sabe que más de 400 especies de bacterias habitan normalmente el aparato digestivo <sup>(69)</sup>.

El estómago por lo regular contiene pocas bacterias ( $10^3$  unidades formadoras de colonias por ml de jugo gástrico), sin embargo, la concentración va aumentando a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de  $10^{12}$  bacterias/g <sup>(65)</sup>.

Entre las principales funciones de la microbiota intestinal están: capacidades metabólicas (como la degradación de material no digerible de la dieta y regulación del almacenamiento de energía, biotransformación de xenobióticos, síntesis de vitaminas esenciales y aumento de absorción de minerales), protección contra agentes infecciosos evitando la proliferación de especies microbianas con potencial patógeno, diferenciación del epitelio intestinal y modulación del sistema inmune <sup>(70)</sup>.

La exposición materna prenatal influye en la colonización microbiana postnatal, lo que juega un papel fundamental en el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), en el desarrollo del sistema inmunológico y en la integridad de la barrera de la mucosa. Por lo tanto, el desarrollo de la microbiota intestinal en las primeras etapas de la vida puede estar vinculado a futura susceptibilidad a la enfermedad. Numerosos estudios han asociado enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, el cáncer de colon y algunas alergias con alteraciones en la microbiota intestinal, sobre todo con el aumento de microorganismos patógenos <sup>(37,71)</sup>.

En este sentido, los probióticos pueden producir efectos benéficos en la salud, regulando la composición de la microflora intestinal, ya que se ha demostrado que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos a través de la producción de ácidos orgánicos, de bacteriocinas/defensinas o compitiendo con bacterias patógenas por los sitios de unión epiteliales y por nutrientes, reduciendo el pH luminal y de este modo favoreciendo la presencia y diversidad de microorganismos benéficos dentro del medio ambiente intestinal (7,37,67,70).

## **2. *Incremento de la función de barrera intestinal***

La función de barrera intestinal es importante, ya que constituye un mecanismo protector del epitelio intestinal. La pérdida de la integridad de la barrera epitelial puede ocasionar desórdenes intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones, enfermedad celiaca y algunos tipos de enfermedades autoinmunes. Algunos probióticos han mostrado su capacidad en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, además de prevenir y reparar daños en la mucosa ocasionados por alérgenos presentes en los alimentos, microorganismos patógenos y citoquinas proinflamatorias (72). Los mecanismos de acción implicados en este beneficio incluyen la secreción de mucina, la modulación de la fosforilación de proteínas y el aumento de la resistencia transepitelial (7,72).

## **3. *Modulación de la respuesta inmune***

Las células epiteliales y las células del sistema inmune innato tienen receptores celulares con capacidad de distinguir entre la microbiota comensal y la patógena y de esta forma promueven la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, entre otras, y que son parte de la respuesta adaptativa del sistema inmune contra los patógenos (73).

Los probióticos ejercen sus efectos sobre numerosos tipos de células involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa, tales como células epiteliales, células dendríticas, monocitos / macrófagos, células B, células T, incluyendo las células T con propiedades reguladoras, y células asesinas naturales (CAN) (7,37,74,75) y de este modo se ha observado que protegen al hospedero frente a infecciones y procesos de inflamación intestinal crónica como la enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y colitis ulcerosa, entre otras (73).

Otros efectos importantes observados en los probióticos es que, en situaciones patológicas, pueden estimular la respuesta inmunitaria antígeno-específica en procesos alérgicos <sup>(76)</sup>, además de que, algunas cepas probióticas, pueden actuar sobre receptores opioides y cannabinoides de las células epiteliales, influyendo en funciones analgésicas, lo que podría llegar a ser una alternativa en el tratamiento del dolor abdominal y la enfermedad del colon irritable <sup>(77)</sup>.

La figura 4 resume los principales mecanismos de acción, antes descritos, mediante los cuales los probióticos ejercen sus efectos benéficos a la salud.

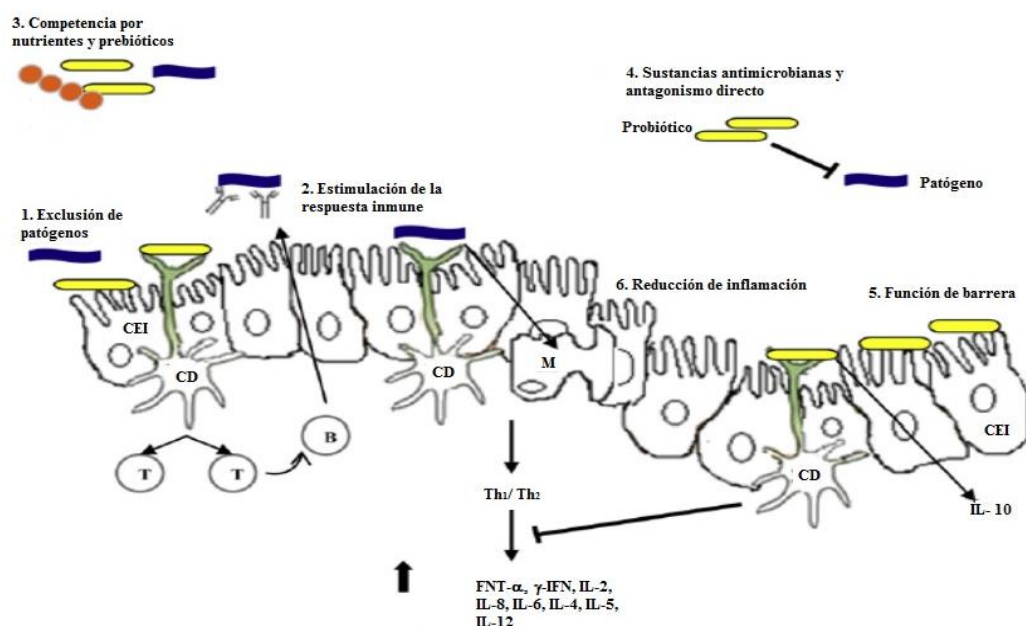


Figura 4. Principales mecanismos mediante los cuales los probióticos ejercen sus beneficios. 1) Exclusión y competencia con patógenos por la adhesión a células epiteliales, 2) estimulación de la respuesta inmune innata, 3) competencia por los nutrientes y prebióticos, 4) producción de sustancias antimicrobianas y por lo tanto antagonismo por patógenos, 5) protección de la integridad de la barrera intestinal y 6) regulación de citocinas anti-inflamatorias e inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatoria. CEI: células del epitelio intestinal, T: células T, Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>: linfocitos T helper 1/ linfocitos T helper 2, B: células B,  $\gamma$ -IFN: interferón gama, FNT- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa, CD: células dendríticas, IL: interleucina; M: célula M intestinal (tomado y modificado de Saad *et al* <sup>(66)</sup>, 2013)

### 2.3.3 Efectos benéficos de los probióticos en la salud humana

El papel de los organismos probióticos en la prevención y tratamiento alternativo o complementario contra un gran número de trastornos, especialmente de tipo gastrointestinal y su capacidad para mejorar la respuesta inmune han atraído mucha atención en todo el mundo.

Así, algunas especies probióticas como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus spp* han demostrado tener capacidad de modular la respuesta inmune del huésped y de este modo ejercer sus efectos benéficos, los cuales han sido observados en el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda causada por rotavirus y la diarrea ocasionada por antibióticos, así como para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y para el tratamiento y prevención de alergias y asma <sup>(66,71,78-81)</sup>, incluso, en un estudio realizado, se observó que la administración oral de *Lactobacillus rhamnosus* GG en pacientes con enfermedad de Crohn promueve un aumento de la respuesta inmune, reduce el dolor y el agravamiento de la enfermedad <sup>(38)</sup>.

Otro estudio con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* GG demostró que estas especies de lactobacilos pueden prevenir el cáncer colorrectal, al inhibir la proliferación de células cancerígenas <sup>(82)</sup>, mientras que otros investigadores concluyeron que *Lactobacillus acidophilus* tiene efectos inmunomoduladores que pueden actuar también contra el cáncer de mama <sup>(83)</sup>.

Algunas especies probióticas como *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus gasseri* demostraron su efecto sinérgico en la reducción de la infección por *Helicobacter pylori*, en pacientes con úlcera gastroduodenal ocasionada por este microorganismo <sup>(84)</sup>, así mismo, en otro estudio, se encontró que *Lactobacillus salivarius* puede inhibir la colonización por *Helicobacter pylori* en ensayos *in vitro*, así como en ratones, esto posiblemente porque produce altas cantidades de ácido láctico, que puede inhibir el crecimiento de esta bacteria patógena <sup>(78)</sup>.

Se ha demostrado también, el alivio del estreñimiento y sus síntomas al usar probióticos como *Lactobacillus plantarum* LP01, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* BR03, y *Bifidobacterium lactis* BS01, tanto en niños como en adultos (71,85).

El *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus acidophilus* se han utilizado como probióticos para mejorar la digestión de la lactosa en sujetos con intolerancia a este azúcar (37,66).

En cuanto a la salud oral, estudios han demostrado que *Streptococcus salivarius* K12 produce bacteriocinas contra patógenos como *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, y evita la faringitis recurrente, otitis media, y amigdalitis, además de disminuir la aparición de la placa dentobacteriana y reducir los niveles de *Streptococcus mutans* en los sujetos de estudio. Especies como *Streptococcus uberis* y *Streptococcus oralis* también evitan la proliferación de patógenos periodontales (37).

Adicionalmente, en investigaciones recientes, se han observado efectos positivos de la mezcla de probióticos en la reducción de síntomas alérgicos en ratones suplementados con leche de soya fermentada con este tipo de microorganismos (86), así como, en algunas cepas del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus reuteri*), en los cuales han probado sus efectos benéficos sobre el metabolismo del folato y selenio (87,88).

Por último, cabe destacar estudios prometedores sobre la acción de especies probióticas en el tratamiento de la obesidad, como el realizado en ratones que fueron alimentados con leche descremada suplementada con *Bifidobacterium breve* B-3, resultando en una supresión de aumento de peso corporal y la mejora de los niveles séricos de colesterol total, glucosa en ayunas y de insulina (89).

#### 2.3.4 Efectos probióticos encontrados en las levaduras

Las levaduras son un grupo grande y heterogéneo de microorganismos, en las cuales aún existen pocos estudios enfocados a conocer sus propiedades probióticas, sin embargo, están atrayendo cada vez mayor atención por parte de los científicos y la industria debido a las propiedades destacables que se han encontrado hasta el momento en estos microorganismos.

Algunas propiedades, mediante las cuales pueden ejercer efectos antagónicos contra microorganismos patógenos son: competencia por nutrientes, cambios de pH en el medio como consecuencia del crecimiento de acoplamiento de intercambio iónico o la producción de ácido orgánico, producción de altas concentraciones de etanol y secreción de compuestos antimicrobianos tales como toxinas asesinas antifúngicas o "micosinas" <sup>(16)</sup>.

Un ejemplo de esto se encuentra en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*, aislada primero de la fruta de lichi en Indochina y descrita en 1984 como una levadura saprófita, la cual se considera una especie probiótica para consumo humano, ha demostrado sus efectos benéficos en el tracto gastrointestinal de animales monogástricos, impidiendo la adherencia de bacterias patógenas al tracto digestivo, inhibiendo las toxinas bacterianas y promoviendo condiciones favorables para el crecimiento y producción de bacterias ácido-lácticas <sup>(90)</sup>. Además, ha sido recomendada para la prevención y el tratamiento de varios tipos de gastroenteritis en niños y adultos, y de diarreas como la diarrea asociada a antibióticos, diarrea asociada a *Clostridium difficile*, diarrea del viajero, diarrea aguda, la diarrea crónica en virus de inmunodeficiencia humana, así como en el trastorno inflamatorio intestinal, ya que tiene efectos en la respuesta inmune al observarse que estimula la inmunidad innata y adaptativa de la célula huésped, en respuesta a las infecciones de patógenos <sup>(16,17,80)</sup>.

Algunas otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado tener propiedades probióticas al observarse la producción de enzimas, vitaminas y aminoácidos, la adherencia a microvellosidades intestinales que por exclusión competitiva desplazan a los microorganismos patógenos, la disminución del potencial redox, la producción de bacteriocinas, la reducción de los niveles de colesterol, así como la estimulación del sistema inmune, entre otros <sup>(90)</sup>.



Ciertas especies de levadura tales como *Phaffia rhodozyma* y *Rhodotorula gracilis* poseen efectos probióticos indirectos, al observarse que tienen la capacidad de sintetizar carotenoides, precursores de la vitamina A, que tiene actividad antioxidante, por lo que pueden impedir la acción de los radicales libres en las células vivas, además de mejorar el sistema inmunológico, ejercer protección contra el cáncer y jugar un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas. Es por esto que estas levaduras han sido utilizadas para la producción intensiva de este precursor de vitamina A <sup>(91)</sup>.

Otros efectos benéficos encontrados en varias especies de levaduras son: la capacidad de biodegradación de fitato (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schwanniomyces castellii*, *Debaryomyces castellii*, *Arxula adeninivorans*, *Pichia anomala*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia spartinae*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula gracilis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces lactis* *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis*) y *Candida* spp.), lo que tiene efectos nutricionales beneficios como una mejor biodisponibilidad de minerales divalentes tales como hierro, zinc, calcio y magnesio; la biosíntesis de folato (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Metschnikowia lochheadii*, *Debaryomyces melissophilus*, *Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia philogaea*, *Kodamaea anthophila*, *Wickerhamiella lipophila*, *Candida cleridarum* y *Candida drosophilae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces marxianus*), que puede tener efectos benéficos como la prevención de los defectos del tubo neural en el feto, la anemia megaloblástica y la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer; además de la degradación y absorción de micotoxinas (*Saccharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*), lo que tiene un efecto antitóxico en el huésped <sup>(17)</sup>.

Recientemente, otras cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Candida* también han demostrado tener un potencial probiótico en términos de su capacidad para sobrevivir a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, y para adherirse a células epiteliales intestinales de diferentes mamíferos <sup>(92)</sup>.

Al respecto, en un estudio realizado en la cepa *K. marxianus* B0399 se observaron varios rasgos potencialmente probióticos como la adhesión al epitelio intestinal, la función inmune, y la modulación de la microbiota colónica, por lo que se concluyó que esta cepa posee una serie de propiedades beneficiosas que la hacen un microorganismo con potencial probiótico <sup>(93)</sup>. En adición, en otra cepa de la levadura *K. marxianus*, aislada del pulque, se observó que cumplía con varios parámetros para identificarla como probiótica como lo son: resistencia a pH ácidos, a jugo gástrico y a bilis, colonización de intestino por más de 5 días y posible productor de antibiosis <sup>(94)</sup>.

### 3. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) <sup>(95)</sup>, las dietas no saludables, como las ricas en grasas saturadas y colesterol, sal y azúcar y baja en hidratos de carbono complejos, frutas y verduras, conducen a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. En este sentido, el manejo actual que se les da a los pacientes para reducir los niveles de colesterol en sangre incluye la terapia farmacológica, modificaciones en la dieta y el ejercicio regular <sup>(39)</sup>.

En cuanto al tratamiento con fármacos, el Colegio Americano de Cardiología y la Asociación Americana del Corazón (ACC y AHA, por sus siglas en inglés) en 2013 publicaron nuevas directrices sobre el tratamiento de los niveles altos de colesterol en sangre para reducir el riesgo cardiovascular aterosclerótico en adultos. Las nuevas directrices hacen hincapié en la terapia con estatinas sobre otros tratamientos hipolipemiantes <sup>(96)</sup>. Se ha observado su eficacia para la reducción del colesterol LDL y su uso continuo reduce la morbi-mortalidad cardiovascular proveniente de la enfermedad arterioesclerótica <sup>(97)</sup>.

El mecanismo por el cual tienen efecto las estatinas se basa en la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, que cataliza un paso clave en la síntesis del colesterol, la conversión de HMG-CoA en mevalonato. La inhibición de esta enzima por las estatinas produce disminución de la síntesis hepática de colesterol y de los niveles de LDL, así como una menor susceptibilidad de las LDL a ser oxidadas, lo cual evita la formación de la nueva placa de ateroma y por lo tanto disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular <sup>(98)</sup>. Sin embargo, se han observado efectos adversos de algunos tipos de estatinas <sup>(95)</sup>, como lo son la miopatía y un incremento asintomático en las transaminasas hepáticas <sup>(98)</sup>.

En el tratamiento dietético destacan el uso de fibra, incluyendo polisacáridos solubles y digeribles tales como pectina de las frutas y alginato de algas pardas ya que tienen un efecto reductor del colesterol <sup>(99)</sup>, así mismo se han observado efectos positivos en la reducción del colesterol de los fitoesteroles, de la proteína de soja, de algunos compuestos prebióticos específicos y de algunos probióticos <sup>(3)</sup>. Algunos de estos agentes nutracéuticos adicionados a alimentos conocidos como funcionales intervienen en el metabolismo del colesterol inhibiendo ciertas vías <sup>(42)</sup>.

Respecto a los probióticos, se ha informado de la capacidad de algunas cepas de bacterias y levaduras en la reducción de los niveles de colesterol, lo cual es de particular interés en este estudio.

### **3.1 Efecto de bacterias probióticas en la disminución de los niveles de colesterol**

Los efectos hipocolesterolémicos de los microorganismos probióticos se han observado en numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Mann y sus colaboradores fueron los primeros en descubrir, a principios de los 70's, los efectos hipocolesterolémicos de la leche fermentada en nativos de la tribu Massai <sup>(100)</sup>, desde entonces la relación entre las bacterias ácido lácticas y la disminución del colesterol sérico ha aumentado aún más el interés por los probióticos, por su potencial efecto benéfico <sup>(101)</sup>.

En este sentido, diversas investigaciones han demostrado el efecto de los productos lácteos fermentados en el colesterol en suero, especialmente con cepas seleccionadas de bacterias ácido-lácticas. Se ha encontrado, por ejemplo, que la cepa de *Lactobacillus fermentum* KC4b, puede eliminar 14,8 mg de colesterol desde el medio de cultivo <sup>(11)</sup>.

En otro estudio realizado con 11 cepas de lactobacilos, en las cuales se analizó su capacidad de asimilación de colesterol en medios de cultivo y en condiciones intestinales simuladas, 2 de ellas, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*, tuvieron una alta asimilación de colesterol, destacando *Lactobacillus reuteri* con una asimilación de colesterol de más del 67% en las condiciones intestinales simuladas del estudio <sup>(102)</sup>.

Otro ensayo *in vitro* en el que se usaron cepas de *Lactobacillus plantarum* cultivadas en caldo MRS que contenía bilis y colesterol, se encontró que estas cepas eran capaces de disminuir el colesterol presente en el medio en un 11 a 61% <sup>(99)</sup>.

Sin embargo, algunos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* muestran diferentes resultados. Por ejemplo, en un ensayo realizado con *Lactobacillus plantarum* A7 se demostró que la reducción de colesterol en medios de cultivo de esta bacteria ácido-láctica no se relaciona con su capacidad de reducir el colesterol del suero <sup>(103)</sup>. Otro estudio realizado en humanos diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2, quienes estuvieron sometidas al consumo de

probióticos y al análisis sanguíneo de glucosa, TG, LDL y HDL, demostró una tendencia no significativa a la baja en el nivel de TG y colesterol LDL, después del consumo de dos cápsula diarias, cada una de 1500 mg de una mezcla de lactobacilos probióticos (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. bifidum*, and *L. casei*), tomadas durante 6 semanas <sup>(12)</sup>.

En otra investigación hecha con 3 cepas de lactobacilos aislados del *koumiss* para determinar y comparar su efecto en la disminución de lípidos *in vitro* y en ratas alimentadas con un alto contenido en lípidos, mostró que las 3 cepas seleccionadas fueron capaces de reducir el colesterol *in vitro*, y reducir el colesterol eficazmente *in vivo* <sup>(104)</sup>.

En adición, en un análisis realizado en la cepa *Lactobacillus plantarum* MA2, aislada del kéfir, cuyo objetivo era evaluar su capacidad de reducir el colesterol en ratas, se observó que este microorganismo fue capaz de reducir el colesterol sérico total, el colesterol LDL, y los niveles de TG, además de mantener los niveles de HDL, al no observarse cambios en los niveles séricos de esta lipoproteína <sup>(105)</sup>. Lo mismo se concluyó en otro ensayo, al evaluar los efectos de *Lactobacillus plantarum* 9-41-A y *Lactobacillus fermentum* M1-16 sobre el peso corporal, el metabolismo de los lípidos y la microflora intestinal de las ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol <sup>(106)</sup>.

En un experimento con 16 ratas macho sometidas a una dieta alta en colesterol durante 14 días, divididas posteriormente al azar en dos grupos, uno tratado con *Lactobacillus plantarum* A7 aislado de muestras de heces de bebés y el otro tratado sólo con dieta alta en colesterol, se observó que este lactobacilo fue eficaz en la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol, TG y LDL, mientras que no se obtuvieron cambios en los niveles de HDL, comparados con el grupo que no recibió el tratamiento con este lactobacilo <sup>(107)</sup>.

En otro ensayo en ratas Wistar machos, las cuales fueron suplementadas, en el agua de consumo, con una cepa de *Lactobacillus casei* F0822 aislada de una muestra fecal humana, se demostró que esta cepa redujo los niveles de colesterol total y LDL en el suero de las ratas en un 39,2% y 63,2%, respectivamente, a una dosis de  $1 \times 10^9$  UFC por ml <sup>(108)</sup>.

Dos cepas de *Lactobacillus plantarum* Lp09 y Lp45 aisladas de granos de kéfir fueron seleccionadas en otro estudio, en el cual se utilizaron ratas Sprague-Dawley. El grupo tratado con *Lactobacillus plantarum* Lp09 logró una reducción máxima de colesterol total del 30,5%, de TG del 23,7% y LDL del 47,9%, mientras que el grupo tratado con *Lactobacillus plantarum* Lp45 logró una reducción de colesterol total del 18,4%, de TG del 12,3% y de LDL del 21,5%, comparados con el grupo sin tratamiento con la cepa <sup>(101)</sup>.

En una investigación realizada con 32 hombres y mujeres con hipercolesterolemia a quienes se les administró una cepa de *lactobacillus acidophilus* CHO-220 y un prebiótico, la inulina, por 12 semanas, se obtuvo una reducción del colesterol plasmático total y de LDL de un 7,84 y 9,27%, respectivamente <sup>(109)</sup>.

En otro estudio que incluyó 14 sujetos con hipercolesterolemia leve a moderada, se pudo observar que el yogur que contenía las cepas de probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* logró una reducción significativa del colesterol plasmático total ( $p=0,038$ ) en comparación con un yogur regular <sup>(110)</sup>.

### **3.2 Efecto de algunas especies de levaduras en la disminución de los niveles de colesterol**

Los estudios en levaduras son más limitados, sin embargo, en la actualidad, han aumentado las investigaciones sobre este género de microorganismos, de los cuales se han descubierto diversas propiedades que los hacen microorganismos prometedores para ser incluidos como probióticos, entre las que destacan su capacidad para disminuir el colesterol plasmático.

Así, en un estudio realizado con la levadura *Saccharomyces boulardii* inoculada dos veces al día a hamsters alimentados con una dieta alta en colesterol, a un primer grupo se le dio un tratamiento oral de la levadura dos veces al día que se inició desde el comienzo de la dieta rica en colesterol y continuó durante 14 días como tratamiento preventivo. En el segundo experimento, *Saccharomyces boulardii* se les administró durante 14 días después del comienzo de la dieta rica en colesterol cuando la hipercolesterolemia se había desarrollado y continuó durante 14 días adicionales, como protocolo curativo. En el protocolo de prevención, la administración de la levadura redujo significativamente la hipercolesterolemia

inducida por la dieta en un 14% en comparación con el grupo que recibió solamente la dieta de colesterol. En el protocolo curativo, *Saccharomyces boulardii* redujo significativamente la hipercolesterolemia en un 12% <sup>(19)</sup>.

En otro estudio con la cepa de levadura *K. marxianus* M3 en ratas Wistar hembra, las cuales fueron alimentadas con una dieta alta en colesterol durante 28 días y posteriormente divididas en 4 grupos al azar, 3 de los cuales se les administró diferentes dosis de la levadura vía oral durante 7 semanas, se observó que efectivamente *K. marxianus* fue capaz de disminuir significativamente ( $p < 0,01$ ), en todos los grupos tratados con diferentes dosis de la levadura, el colesterol total en suero, TG y LDL en comparación con el grupo no tratado, además de observarse un aumento significativo ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) de los niveles séricos de HDL en comparación con el grupo no tratado <sup>(111)</sup>.

En un ensayo en donde se evaluó la actividad hipocolesterolémica de 81 cepas de levadura en ratas Wistar macho alimentadas con una dieta rica en colesterol y suplementadas con las distintas cepas de levadura durante 7 días, se encontró que la cepa *K. marxianus* YIT 8292 tuvo la mayor actividad hipocolesterolémica entre las cepas de levadura que se evaluaron, al disminuir significativamente el colesterol total en plasma e hígado <sup>(112)</sup>.

En otra investigación realizada también por Yoshida *et al* <sup>(113)</sup> en 2015, con la misma cepa de *K. marxianus* YIT 8292, donde se evaluaron los efectos de diferentes extractos celulares de la levadura en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, se encontró que algunos componentes de la pared celular aumentaron la excreción fecal de esteroides y la concentración de ácidos grasos de cadena corta en el ciego de las ratas de experimentación, efectos atribuidos a los polisacáridos no digeribles como el alfa-manano y beta-glucano que se encuentran en gran cantidad en la pared celular, lo que probablemente sea el mecanismo por el cual se disminuyeron los niveles de colesterol en sangre en las ratas.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México, de acuerdo a las estadísticas obtenidas por la Secretaría de Salud en 2008, se han incrementado las enfermedades que tienen como principales factores de riesgo la presencia de altos niveles de triglicéridos, colesterol libre y LDL en sangre, entre ellas están las enfermedades isquémicas del corazón, la enfermedad cerebrovascular y enfermedades hipertensivas, todas ellas con una alta tasa de mortalidad en la población.

Y aunque las estrategias para su prevención y control, que incluyen la promoción de cambios en los hábitos alimenticios y terapias con fármacos se siguen trabajando, se requiere evaluar otras alternativas de intervención para la población que las padece y sin efectos colaterales como los observados con medicamentos.

Ante esto, se han realizado diversos estudios que evidencian la acción de microorganismos probióticos, concretamente, en la disminución de la concentración de colesterol en sangre, sin embargo, estos estudios se han enfocado, en gran medida, en lactobacilos y bifidobacterias, encontrándose en la literatura escasos estudios realizados con levaduras, en las cuales se han descubierto propiedades probióticas, y que actúan de manera sinérgica con otros microorganismos probióticos, observándose esta simbiosis en alimentos fermentados como el kéfir y el pulque.

Es por esto que, en el presente estudio, se seleccionó la levadura *Kluyveromyces marxianus*, cuyo crecimiento se ha comprobado en el pulque, bebida ancestral de consumo tradicional en México, para evaluar el efecto que tiene en la reducción de colesterol libre tanto *in vitro* como en un modelo de ratón CD1 con hipercolesterolemia inducida por dieta, pudiéndola utilizar como microorganismo probiótico en alimentos funcionales, con propiedades hipocolesterolémicas, lo que contribuiría a una menor incidencia de enfermedades asociadas a esta dislipidemia, y en consecuencia, a la disminución de ausentismos, discapacidades y hospitalizaciones, además de la reducción del gasto en el sector salud por los tratamientos farmacológicos de estas patologías. También, cabe destacar que, en la actualidad, no existen estudios *in vitro* y sólo existen pocos estudios realizados en ratas que han evaluado la capacidad de disminuir la concentración de colesterol por algunas cepas de *K. marxianus*.



## 5. HIPÓTESIS

La levadura *Kluyveromyces marxianus* es capaz de disminuir significativamente el colesterol libre *in vitro* e *in vivo*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en la reducción de los niveles de colesterol libre, *in vitro* y en ratones CD-1 hipercolesterolémicos.

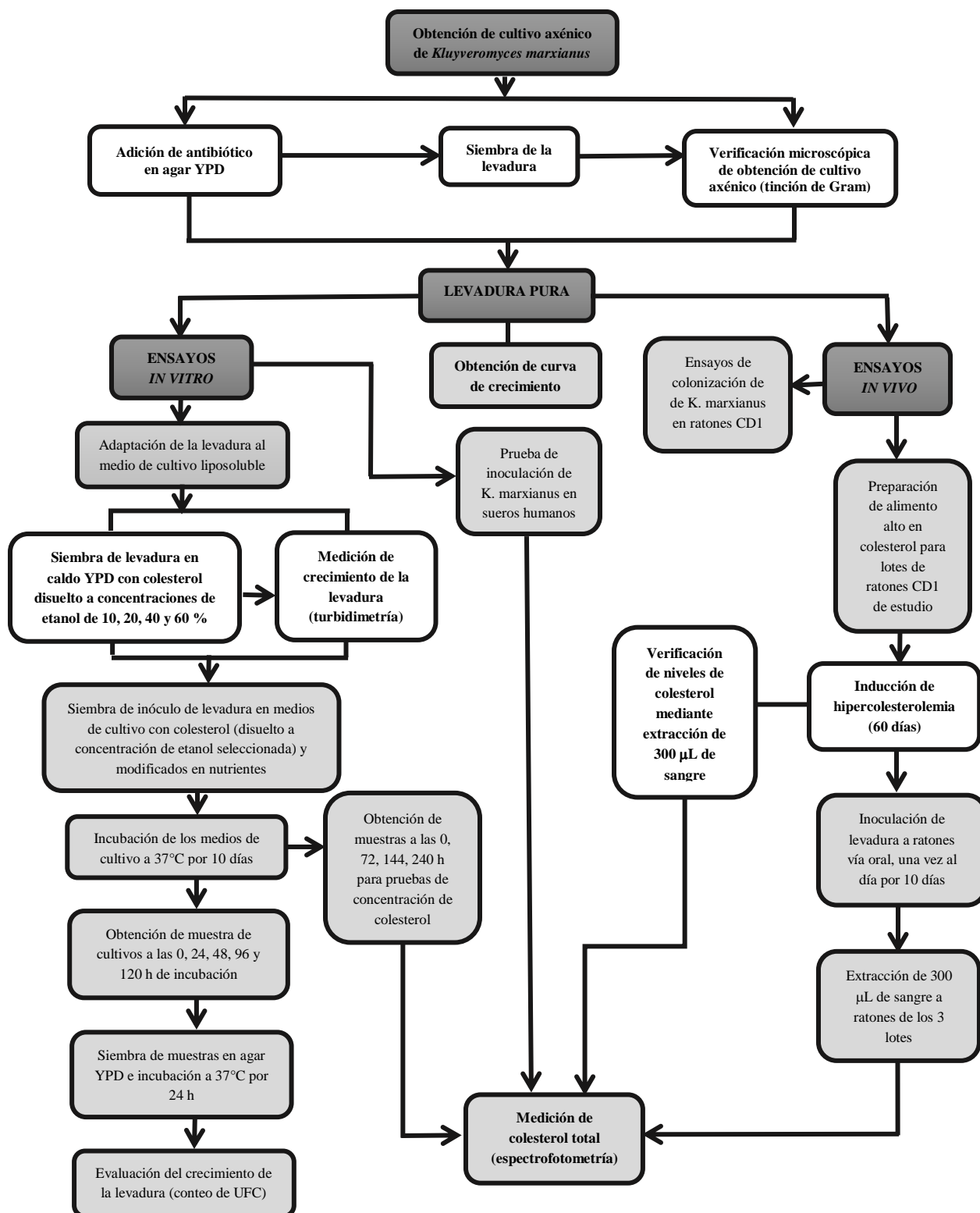
### 6.2 Objetivos específicos:

1. Caracterizar el crecimiento de la levadura *K. marxianus* en medio de cultivo YPD.
2. Determinar *in vitro*, el efecto de *K. marxianus* sobre la concentración de colesterol total.
3. Determinar *in vivo*, el efecto de *K. marxianus* en el nivel de colesterol libre en sangre, mediante la inoculación de la levadura a ratones hembra con hipercolesterolemia inducida.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

- 7.1 Tipo de estudio:** El presente estudio fue de tipo básico, prospectivo, experimental, cuali-cuantitativo y de laboratorio.

## 7.2 Diagrama de flujo de diseño experimental



### **7.3 Descripción del método:**

#### **7.3.1 Obtención y conservación de la cepa de la levadura *K. marxianus* para los ensayos *in vitro* e *in vivo***

La levadura *K. marxianus* se aisló, en una investigación previa, de una muestra de pulque del municipio de Mineral de la Reforma, Hidalgo, la cual se identificó utilizando un kit API 20 C AUX (método estandarizado para la identificación precisa de levaduras que se encuentran más frecuentemente, mediante pruebas bioquímicas) y a través de PCR para su identificación molecular. Una vez identificada, la cepa fue sembrada en cajas Petri con agar YPG y en caldo YPD, ambos esterilizados previamente en autoclave, e incubada a 37°C durante 24 h. Después del tiempo de incubación la cepa se conservó en refrigeración a 4°C.

#### **7.3.2 Preparación de medios de cultivo**

Todos los medios de cultivo, sólidos y líquidos, utilizados para los ensayos subsecuentes, se esterilizaron previamente en autoclave. La adición de antibiótico a los medios de cultivo, se realizó cuando el medio se enfrió y en los medios con agar, antes de su solidificación.

#### **7.3.3 Obtención del inóculo**

Para la obtención de un cultivo axénico de la levadura, de las muestras de la cepa conservada se tomó una colonia y se sembró, mediante estría y agotamiento, en agar YPD con antibiótico (0.01 g/mL de sulfato de estreptomicina), en 5 tubos de ensaye inclinados. Se incubaron a 37°C durante 24 h para su crecimiento. La siembra en diferentes tubos fue con la finalidad de asegurar su inocuidad por más tiempo, al evitar la contaminación por la manipulación continua del medio.

Se verificó la obtención del cultivo axénico, de todos los tubos, mediante una tinción de Gram. Se hicieron resiembras de la levadura periódicamente (cada 3 semanas aproximadamente) en agar YPD y BHI, para mantener su viabilidad y propiedades.

#### **7.3.4 Obtención de la curva de crecimiento de *K. marxianus***

Con la finalidad de tener un patrón de crecimiento de la levadura, además de obtener el número de levaduras que se utilizaron para la inoculación de los diferentes experimentos, se realizó una curva de crecimiento. Para ello, se prepararon 100 mL de caldo YPD y se inoculó una muestra de la levadura, tomada del cultivo axénico obtenido previamente. Se ajustó la absorbancia, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis JENGAY 6405, mediante la adición paulatina de colonias al medio, hasta alcanzar una absorbancia alrededor de 0.1 a 560 nm. Posteriormente, el medio se incubó a 37°C y se tomó 1 mL de muestra a las 0, 6, 24, 30, 48, 96 y 120 h para medir la absorbancia.

Así mismo, se realizaron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-3}$  y  $1 \times 10^{-6}$ ) de las muestras obtenidas en cada tiempo de incubación. Se seleccionó la dilución  $1 \times 10^{-3}$  de cada muestra para su siembra (20  $\mu$ L) en cajas Petri con agar YPD, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 h, para posteriormente realizar el conteo de colonias, las cuales se reportaron como UFC/mL.

#### **7.3.5 Evaluación de formación de biopelícula por *K. marxianus***

Con el fin de verificar si la levadura es capaz de formar biopelícula, característica importante de microorganismos con gran capacidad de colonización, se evaluó cualitativamente su formación mediante la siembra de una colonia de *K. marxianus* en agar BHI y rojo congo, mediante el método de estría y agotamiento, se incubó a 37°C durante 24 h y se observó macroscópicamente la presencia de biopelícula. Se realizó el experimento por duplicado.

#### **7.3.6 Evaluación *in vitro* de la reducción de colesterol por *K. marxianus***

Para evaluar si la levadura es capaz de reducir las concentraciones de colesterol en medios de cultivo controlados en nutrientes que incluyeron esta molécula, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

### **7.3.6.1 Prueba de solubilización de colesterol utilizando etanol y caldo YPD**

Con el propósito de tener colesterol soluble en medio YPD para una mejor disponibilidad de la molécula de colesterol para las levaduras, además de conocer la concentración de etanol en la cual se mantienen viables las mismas, se realizó la siguiente solución: en diferentes tubos de ensaye (10 mL volumen final) se solubilizaron 0.01 g de colesterol (Hycel de México) con etanol al 99.6 % (Química Meyer) a diferentes concentraciones (10, 20, 40 y 60 %) y se ajustó el volumen con medio YPD. Se observó macroscópicamente la hidrosolubilidad del colesterol.

### **7.3.6.2 Valoración del crecimiento de *K. marxianus* en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) con colesterol solubilizado en diferentes concentraciones de etanol**

Para conocer si existe crecimiento de la levadura en presencia de colesterol (0.01 g) solubilizado a diferentes concentraciones de etanol (10, 20, 40, 60 %), a cada tubo de la prueba anterior, se inoculó la levadura (100 µL de una solución stock de *K. marxianus* en medio YPD, la cual tuvo una absorbancia de 0.086 a una longitud de onda de 560 nm) y se incubó durante 24 h a 37° C. Posterior a la incubación, se tomaron, de cada tubo, 10 µL del medio y se sembraron en agar YPD para observar el crecimiento de la levadura mediante observación macroscópica y microscópica.

### **7.3.6.3 Determinación del crecimiento de *K. marxianus* en medios modificados con diferentes nutrientes**

Para saber si *K. marxianus* puede crecer en medios modificados en nutrientes incluyendo medio con colesterol, se realizó este experimento como se describe a continuación. Se prepararon 3 mL de los siguientes medios de cultivo líquidos: Y (extracto de levadura), YP (extracto de levadura y peptona), YPE (extracto de levadura, peptona y etanol), YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) y YPC (extracto de levadura, peptona y 200 mg/dL de colesterol disuelto en 10% de etanol), todos los medios fueron previamente esterilizados y se les adicionó sulfato de estreptomycin (0.01 g/mL de sulfato de estreptomycin) para evitar contaminación por bacterias durante su manipulación.

Posteriormente, a cada medio se le inoculó la levadura (100  $\mu$ L de una solución stock de *K. marxianus* en medio YPD, la cual tuvo una absorbancia de 0.092 a una longitud de onda de 560 nm) y se incubaron a 37°C durante 5 días. Durante el tiempo de incubación, se extrajo una muestra de 250  $\mu$ L de cada cultivo a tiempo 0, 24, 48, 96, y 120 h y se guardaron en refrigeración a 4°C.

De cada muestra tomada a los diferentes tiempos de incubación se realizaron diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Se tomaron 10  $\mu$ L de la dilución  $10^{-3}$  de cada medio para siembra en placa en agar YPD y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posterior a la incubación se hizo conteo de colonias (UFC) y se realizó una curva de crecimiento.

#### **7.3.6.4 Determinación de la concentración de colesterol en medios de cultivo en ausencia y presencia de *K. marxianus***

Con la finalidad de conocer si la levadura puede reducir el colesterol en medios modificados en nutrientes a una concentración de colesterol de 150 mg/dL disuelto en 10% de etanol, se prepararon, por duplicado, 3 mL de los medios de cultivo que se describen en la tabla 1: YC (extracto de levadura y colesterol), YPC (extracto de levadura, peptona y colesterol), y YPDC (extracto de levadura, peptona, dextrosa y colesterol), y sus respectivos controles Y (extracto de levadura), YP (extracto de levadura y peptona) y YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa). Las imágenes de estos medios se muestran en el anexo 1.

Todos los medios e instrumentos utilizados fueron previamente esterilizados para evitar contaminación y a los medios se les adicionó sulfato de estreptomicina (0.01 g/mL de sulfato de estreptomicina), para evitar contaminación por bacterias durante su manipulación.

Posteriormente, a los medios seleccionados se les inoculó *K. marxianus* ( $6 \times 10^7$  células de levadura). Todos los medios se sometieron a agitación constante con incubación a 37° C por 10 días. Durante el tiempo de incubación, se extrajo una muestra de 250  $\mu$ L de cada medio de cultivo a tiempo 0, 72, 144 y 240 h y se guardaron en refrigeración a 4°C.

Al final del tiempo de incubación de cada muestra, se determinó la concentración de colesterol mediante un kit comercial (spinreact), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 1. Medios de cultivo problema y control utilizados para la determinación de las concentraciones de colesterol con y sin *K. marxianus***

| Medios problema con colesterol (150 mg/dL) y adición de <i>K. marxianus</i> | Medios control sin colesterol con adición de <i>K. marxianus</i> | Medios control con colesterol (150 mg/dL) sin adición de <i>K. marxianus</i> |
|---|--|--|
| YC y K.m  | Y y K.m  | YC   |
| YPC y K.m   | YP y K.m   | YPC  |
| YPDC y K.m  | YPD y K.m  | YPDC   |

La determinación de la reducción de la concentración de colesterol en cada medio de cultivo se realizó de la siguiente forma:

Reducción de colesterol (mg/dL)

$$= [\text{concentración de colesterol (mg/dL)}]_{0h} - [\text{concentración de colesterol (mg/dL)}]_{240h}$$

#### **7.3.6.5 Determinación de la concentración de colesterol en sueros humanos en presencia y ausencia de *K. marxianus***

Con la finalidad de saber si *K. marxianus* es capaz de reducir el colesterol en sueros humanos, se utilizaron 10 muestras de sueros, a los cuales se les determinó la concentración de colesterol antes de la inoculación con *K. marxianus*. Posteriormente se extrajo una muestra del suero y se les adicionó *K. marxianus* ( $6 \times 10^7$  células de levadura), se incubaron, con sus respectivos controles (suero sin inoculación de la levadura), a 37°C durante 6 días. Al término de este periodo de incubación, se determinó nuevamente la concentración de colesterol de los sueros con y sin *K. marxianus*. Para este ensayo se utilizó un kit comercial (Spinreact) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

La determinación de la reducción de la concentración de colesterol en cada muestra de suero se realizó de la siguiente forma:

Reducción de colesterol en suero (mg/dL)

$$= [\text{concentración de colesterol (mg/dL)}]_{0h} - [\text{concentración de colesterol (mg/dL)}]_{144h}$$

### **7.3.7 Evaluación *in vivo* del efecto de *K. marxianus* en la disminución de colesterol libre**

Con el fin de comprobar si la levadura es capaz de disminuir las concentraciones de colesterol total en sangre, se llevaron a cabo distintos ensayos en ratones CD1 con hipercolesterolemia inducida, a los cuales se les inoculó la levadura. Los diferentes ensayos se describen a continuación:

#### **7.3.7.1 Tratamiento de los animales**

Para los experimentos se emplearon 17 ratones cepa CD-1, de los cuales 5 fueron machos de 10 semanas de edad y 12 fueron hembras recién destetadas de 3 semanas de edad. Todos fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, entregados con expedición de certificado de salud. Se mantuvieron en todo momento en un ambiente controlado (ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno) y cambio de cama de aserrín cada tercer día.

Los ratones machos fueron empleados para ensayos de colonización de la levadura, los cuales fueron alimentados con dieta del bioterio (alimento balanceado comercial para roedor Harlam 2018S y agua *ad libitum*).

Los ratones hembras tuvieron un peso de entre 16 y 18 g, y fueron empleadas para los estudios *in vivo* con la levadura *K. marxianus*. Para esto, fueron distribuidas al azar en 3 lotes de 4 ratones hembra cada uno. El lote 1, denominado como ratones tratados con dieta alta en colesterol y sin inoculación de la levadura *K. marxianus* (RC) y el lote 2, el cual se denominó como ratones tratados con dieta alta en colesterol y con inoculación de la levadura *K. marxianus* (RCK) se mantuvieron, durante todo el estudio, con dieta a una concentración de colesterol de 0.1 % y una solución de sacarosa al 10% y el lote 3, el cual se denominó como ratones tratados con dieta normal y sin inoculación de *K. marxianus* (RN) se mantuvieron, durante todo el ensayo, con dieta normal controlada del bioterio (alimento balanceado comercial para roedor Harlam 2018S y agua).



Los animales en todo momento fueron tratados siguiendo las normas éticas que determina el Comité de Bioética del ICSa. Al término de los ensayos, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

#### **7.3.7.2 Evaluación *in vitro* de la colonización *K. marxianus* en intestino de ratón**

Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer si *K. marxianus* tiene la capacidad de colonizar el intestino del ratón. Para ésto, se sacrificaron 2 ratones CD1 machos a los que se les extrajo el intestino delgado y grueso. Cada sección de intestino se abrió haciendo un corte longitudinal y se colocaron en cajas Petri con solución salina isotónica al 0.85% con sulfato de estreptomicina (0.01 g/mL de sulfato de estreptomicina) y 200 µL de inóculo de *K. marxianus* ( $6 \times 10^7$  células de levadura). Se selló la caja y se incubó a 37°C durante 72 h.

Posterior al periodo de incubación, se hicieron 3 lavados de las porciones de intestino delgado y grueso con solución salina isotónica al 0.85%, en cada lavado se incubaron las muestras de intestinos a 37°C durante 24 h. Al final del periodo de incubación se hizo un raspado de cada fragmento de intestino con espátula estéril. El extracto se sembró en agar YPD y se incubó a 37° C por 24 h. Se verificó la presencia de la levadura de manera microscópica, utilizando tinción de Gram.

Como control, se incubó en caja Petri con 20 mL de solución salina isotónica al 0.85% con antibiótico (0.01 g/mL de sulfato de estreptomicina), la misma cantidad de inóculo de levadura (1 mL), a 37°C durante 6 días. Al final de este tiempo de incubación se sembró una muestra del inóculo, en agar YPD, se incubó a 37°C durante 24 h y se observó igualmente al microscopio, mediante tinción de Gram.

#### **7.3.7.3 Evaluación *in vivo* de la colonización de *K. marxianus* en ratones CD1**

A la par que el experimento anterior, se realizó este ensayo con el fin de verificar la presencia de la *K. marxianus* en intestino delgado y grueso y en heces de ratones inoculados con la levadura y así comprobar su colonización. Para este experimento se usaron 3 ratones CD1 machos, a los cuales se les administró, por vía intragástrica mediante cánula curva de acero inoxidable (ver anexo 2), una dosis diaria de  $6 \times 10^7$  células de levadura en 200 µL de solución salina estéril como vehículo, durante 6 días.

Después de este periodo de inoculación se sacrificó un ratón, mediante dislocación cervical, cada tercer día (día 8, 10 y 12 después de la inoculación), para observar la presencia de la levadura tanto en intestino como en heces. Para esto, se sembró en agar YPD con antibiótico (0.01 g/mL de sulfato de estreptomicina), el raspado obtenido de intestino grueso y delgado y 1 g de heces de los ratones sacrificados, se incubaron a 37°C durante 24 h y se observó si hubo crecimiento de colonias. Para verificar la presencia de *K. marxianus*, se realizó tinción de Gram y se observó al microscopio.

Al mismo tiempo, se hizo tinción de Gram de las heces frescas de los ratones y se observó al microscopio para verificar, de igual manera, la presencia de la levadura.

#### **7.3.7.4 Determinación de colesterol libre en ratones inoculados con *K. marxianus***

Con el objetivo de evaluar el efecto que tiene *K. marxianus* en los niveles de colesterol sanguíneo de ratones inoculados con la levadura, se realizó este experimento como se describe a continuación: se usaron 12 ratones CD1 hembras recién destetadas, distribuidas en 3 lotes con 4 ratones cada uno, las características de cada lote se describen en la tabla 2, las imágenes de la distribución de los ratones en los lotes se observan en el anexo 3.

Al lote 1, denominado como ratones tratados con dieta alta en colesterol y sin inoculación de la levadura *K. marxianus* (RC) y lote 2, denominado como ratones tratados con dieta alta en colesterol y con inoculación de la levadura *K. marxianus* (RCK), se les indujo hipercolesterolemia mediante una dieta alta en colesterol y con una solución al 10 % de sacarosa. Al lote 3, denominado como ratones tratados con dieta normal y sin inoculación de *K. marxianus* (RN), se le administró dieta normal del bioterio y agua. En los tres lotes se mantuvo la dieta durante todo el ensayo.

Cuando la hipercolesterolemia estuvo establecida en los ratones, después de un periodo de 60 días de dieta, al lote 2 (RCK) se le administró una dosis diaria de la levadura ( $6 \times 10^7$  células en 200  $\mu$ L de solución salina isotónica estéril al 0.85% como vehículo) durante 10 días, por vía intragástrica mediante cánula curva de acero inoxidable, con la técnica mostrada en el anexo 2.

**Tabla 2. Características de lotes control y de estudio de ratones CD1 hembras utilizados para evaluación del efecto de *K. marxianus* en los niveles de colesterol total en suero**

| LOTE 1 (RC)   | LOTE 2 (RCK)   | LOTE 3 (RN)  |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 ratones CD-1 hembras alimentadas con dieta alta en colesterol y sol. de sacarosa al 10 %</li> <li>- Sin inoculación de levadura</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 ratones CD-1 hembras alimentadas con dieta alta en colesterol y sol. de sacarosa al 10 %</li> <li>- Inoculación de levadura (<math>6 \times 10^7</math> células)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 ratones CD-1 hembras alimentados con dieta normal de bioterio</li> <li>- Sin inoculación de levadura</li> </ul> |

Para saber el efecto de la levadura en los niveles de colesterol sanguíneo, se determinó la concentración de colesterol total en el suero de todos los ratones de los tres lotes, al inicio del estudio, a los 60 días de dieta controlada y a los 10 días de tratamiento con la levadura, mediante un kit comercial (Spinreact) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En cada toma de muestra sanguínea (ver anexo 4), se sometieron a todos los ratones de los 3 lotes a un ayuno de 18 h. Se extrajeron 300  $\mu$ L de sangre mediante goteo por corte de cola, se centrifugó a 1500 xg durante 5 minutos y se separó el suero, para la determinación de la concentración de colesterol con el kit.

Conjuntamente, al término del ensayo, del lote inoculado con la levadura, se analizaron las heces frescas de los ratones, así como el intestino delgado y grueso, para comprobar la presencia de la levadura. Se siguió el método descrito en el experimento anterior.

## **7.4 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se expresan como la media y desviación estándar (DS). Para las pruebas de significancia estadística, se utilizaron prueba estadística T de Student, prueba ANOVA de un factor y pruebas de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Microsoft Excel versión 2013 para Windows (Microsoft Office Excel Software, Washington, EU).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Obtención y conservación de la cepa de la levadura *K. marxianus*

En la figura 5 se muestra el crecimiento macroscópico de la levadura *K. marxianus* sembrada en agar YPD, se observaron colonias redondas, de color blanco, convexas y brillantes, además se detectó el olor característico a levadura y se pudo distinguir el crecimiento de un solo tipo de colonias. Se verificó la obtención del cultivo axénico mediante coloración de Gram, en donde se observó la forma ovoide característica de la levadura, la presencia de algunas levaduras en gemación y la ausencia de contaminación de microorganismos (figura 6).

De los tubos con la levadura se tomaron muestras para la realización de los diferentes experimentos y se realizaron pases periódicos para conservar su viabilidad y propiedades, siguiendo el método anteriormente descrito.

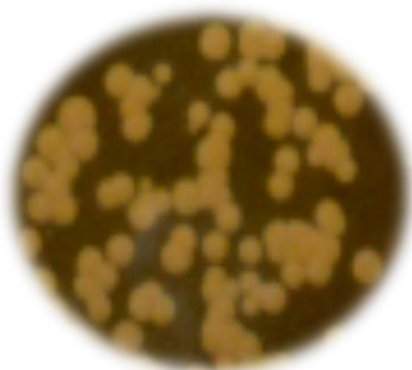


Figura 5. Observación macroscópica del crecimiento de la levadura *K. marxianus* en medio YPD con antibiótico (sulfato de estreptomicina). Se observan colonias redondas, de color blanco, convexas y brillantes.

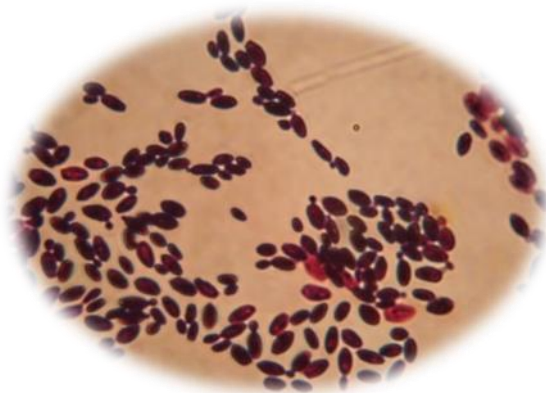


Figura 6. Observación microscópica de cultivo axénico de *K. marxianus* utilizando tinción de Gram. Se observa la forma ovoide característica de la especie y la presencia de levaduras en gemación, además de la ausencia de microorganismos contaminantes.

## 8.2 Curva de crecimiento de *K. marxianus*

Con la finalidad de obtener un patrón de crecimiento de la levadura se realizó una curva de crecimiento que se muestra en el gráfico 1, en la que se contrastó las UFC con la absorbancia obtenida a diferentes tiempos de incubación. Se puede observar en este gráfico que las UFC reflejan la viabilidad de la levadura ya que muestran las levaduras que permanecen vivas a diferentes tiempos de incubación mientras que con la absorbancia sólo se obtiene la masa celular sin diferenciar entre células vivas y muertas. Así mismo, se observó que *K. marxianus* tiene un patrón de crecimiento exponencial, ya que alcanzó su fase logarítmica alrededor de la 2da. hora, su fase estacionaria entre las 20 y 60 horas y su fase de muerte después de las 60 horas.

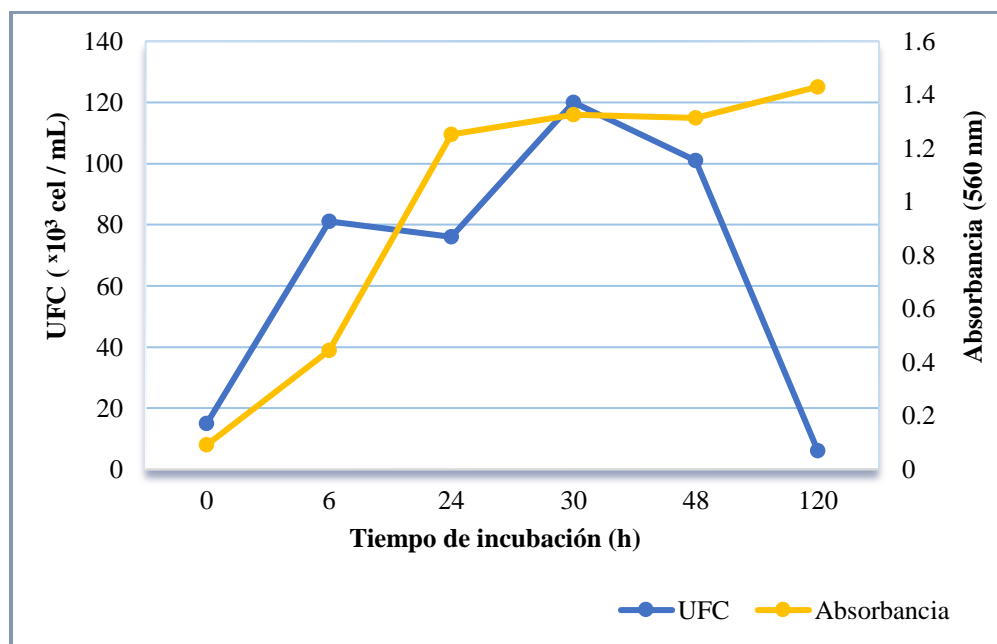


Gráfico 1. Curva de crecimiento de la levadura *K. marxianus*. Se muestra la comparación de la absorbancia obtenida a 560 nm con las unidades formadoras de colonias (UFC) de las muestras tomadas del caldo YPD inoculado con la levadura, en cada tiempo de incubación (0, 6, 24, 30, 48, 96 y 120 h).

### 8.3 Evaluación *in vitro* de la reducción de la concentración de colesterol por la levadura *K. marxianus*

Para conocer si la levadura es capaz de reducir las concentraciones de colesterol en el medio de cultivo y comprobar su adaptabilidad y crecimiento bajo estas condiciones, se realizaron previamente pruebas de solubilización del colesterol utilizando etanol como solvente, así como pruebas de viabilidad de la cepa, a diferentes concentraciones de etanol y con la misma concentración de colesterol en todos los medios. Posteriormente se realizaron los ensayos de crecimiento de la levadura y de su capacidad de reducción de colesterol utilizando medios modificados en nutrientes, teniendo como nutriente base el colesterol. Se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

#### 8.3.1 Solubilización de colesterol en etanol y caldo YPD

Con el propósito de tener colesterol soluble en medio YPD y que las levaduras pudieran estar en contacto con la molécula de colesterol, se solubilizó colesterol (0.01 g) en diferentes concentraciones de etanol (10, 20, 40 y 60 %) y posteriormente se adicionó a caldo YPD.

En los resultados, mostrados en la figura 7, se observó una mayor hidrosolubilidad del colesterol en las soluciones con un 10 y 20 % de etanol.

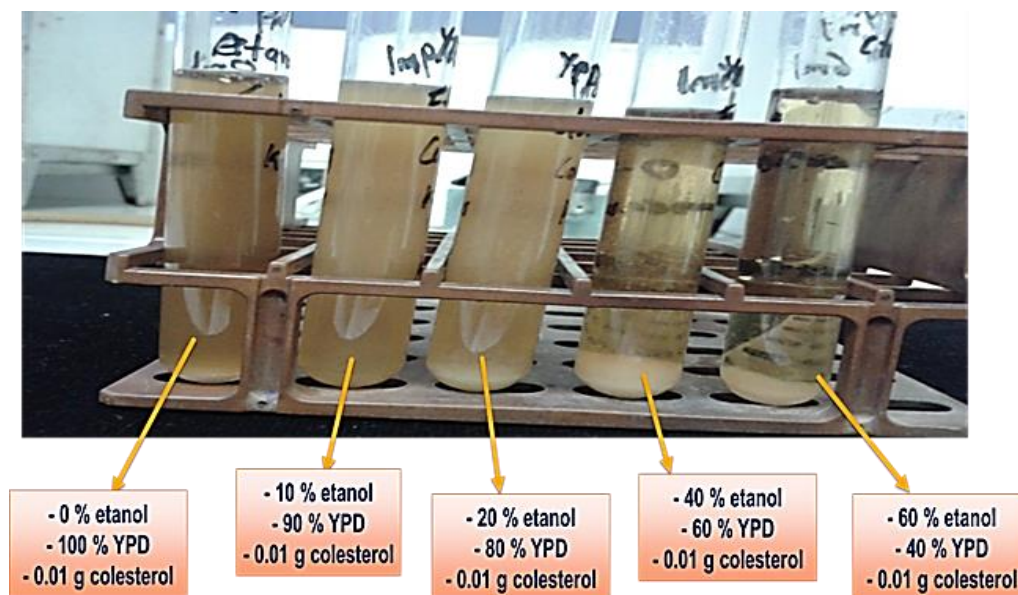


Figura 7. Solubilización del colesterol en caldo YPD utilizando etanol como disolvente, a diferentes concentraciones. En la figura se muestran los medios utilizados para evaluar la hidrosolubilidad del colesterol, observándose un medio más homogéneo y estable entre el 10 y 20 % de etanol, comparado con los medios con mayor concentración de etanol (40 y 60 %) y con el medio control (0 % de etanol).

### 8.3.2 Crecimiento de *K. marxianus* en medio YPD con colesterol solubilizado a diferentes concentraciones de etanol

Para conocer si existe crecimiento de la levadura en presencia de colesterol (0.01 g) solubilizado a diferentes concentraciones de etanol (10, 20, 40, 60 %), se adicionó al medio un inóculo de la levadura como se describe previamente en material y método. Se observó (figura 8) que sólo existe crecimiento de la levadura entre el 10 y 20 % de etanol. Ante esto, se utilizó la concentración de 10% de etanol para solubilizar el colesterol y utilizarla en los ensayos *in vitro* posteriores.

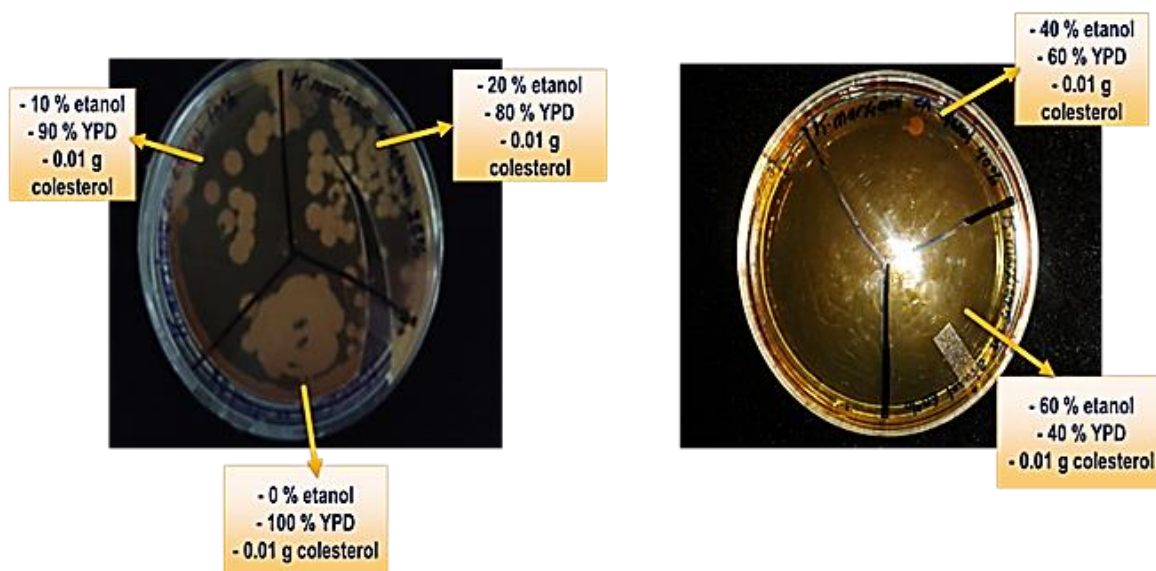


Figura 8. Crecimiento de *K. marxianus* en los medios de cultivo con colesterol solubilizado a diferentes concentraciones de etanol. Se muestra el crecimiento de la levadura, en agar YPD, de las muestras obtenidas de los medios de cultivo inoculados con la levadura, destacándose el crecimiento de la misma sólo en los medios de cultivo con una concentración de etanol del 10 y 20 %.

### 8.3.3 Crecimiento de *K. marxianus* en medios con modificación de nutrientes

Con el fin de conocer si la levadura crece en un medio rico en colesterol, se realizó una curva de crecimiento de los diferentes medios modificados en nutrientes, contrastando las UFC de cada medio con el tiempo de incubación, como se muestra en el gráfico 2.

Se pudo observar que la levadura utiliza el colesterol para su crecimiento, ya que en el medio YPC (extracto de levadura, peptona y colesterol), se observa un crecimiento acelerado de la levadura después de las 48 h de incubación con un promedio de  $9 \times 10^6$  UFC/mL, hasta alcanzar un promedio de  $141 \times 10^6$  UFC/mL a las 140 h y  $180 \times 10^6$  UFC/mL a las 120 h, aunque se observó que la levadura tuvo un periodo de adaptación mayor comparado con el medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa), que es el medio ideal para el crecimiento de levaduras, ya que en este medio la levadura tuvo un crecimiento más rápido, aunque con menor cantidad de UFC, con un promedio de  $18 \times 10^6$  UFC/mL al tiempo 0,  $82 \times 10^6$  UFC/mL a las 24 h,  $155 \times 10^6$  UFC/mL a las 96 h, sin embargo, disminuyó su crecimiento drásticamente a las 120 h con un promedio de  $54 \times 10^6$  UFC/mL.



Cabe destacar que, en el medio YPE (extracto de levadura, peptona y etanol) también se observa crecimiento acelerado de la levadura después de 48 h de incubación, aunque con un menor número de UFC/ mL comparado con el medio YPC.

En los medios Y (extracto de levadura) y YP (extracto de levadura y peptona), que son los medios con mayor restricción de nutrientes, se observó una drástica disminución del crecimiento de la levadura entre las 24 y 48 h de incubación.

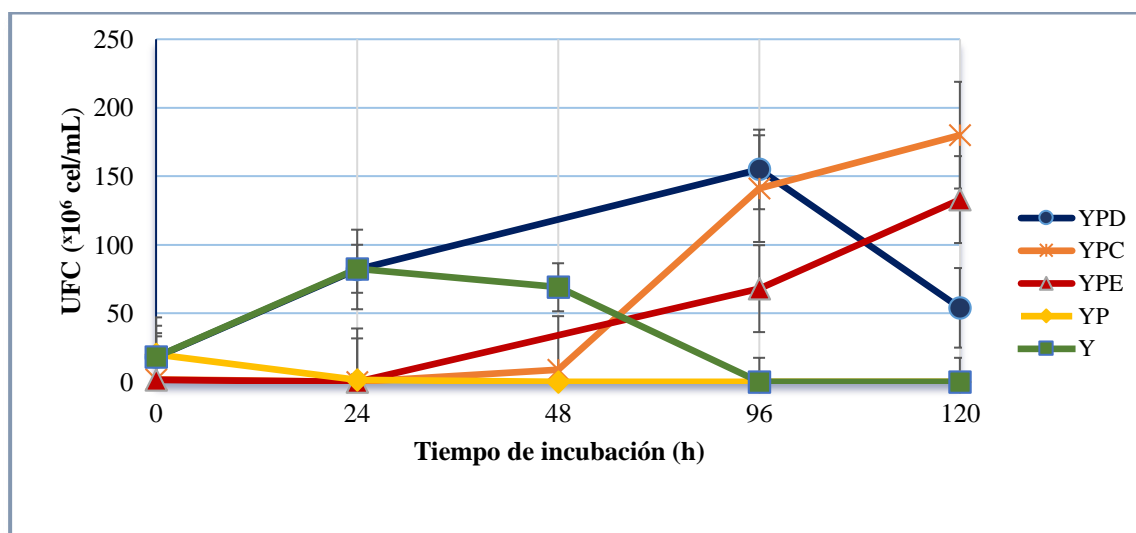


Gráfico 2. Crecimiento de *K. marxianus* en diferentes medios modificados en nutrientes y a diferentes tiempos de incubación. YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa), YPC (extracto de levadura, peptona y colesterol), YPE (extracto de levadura, peptona y etanol), YP (extracto de levadura y peptona) y Y (extracto de levadura). Los datos son presentados con las medias y desviaciones estándar ( $\pm$ DE), n=2.

#### 8.3.4 Concentración de colesterol en medios de cultivo con y sin *K. marxianus*

Con el objetivo de determinar si la levadura reduce el colesterol en el medio de cultivo, se realizó la medición de esta molécula en diferentes medios modificados en nutrientes con y sin la adición de la levadura, como se describe en el apartado de métodos. En el gráfico 3a, 3b y 3c se muestran las concentraciones de colesterol de los diferentes medios problema analizados a diferentes tiempos de incubación, con sus respectivos controles.

Se observó que, en todos los medios con colesterol a los que se les adicionó la levadura y después de su incubación a 37°C durante 10 días, hubo una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de esta molécula respecto a sus niveles iniciales, destacando el medio YPDC (extracto de levadura, peptona, dextrosa y colesterol con *K. marxianus*) con una reducción media de la concentración de colesterol de 69.2 mg/dL, seguido por el medio YPC (extracto de levadura, peptona y colesterol con *K. marxianus*) con una reducción media de colesterol de 45.45 mg/dL y por último, el medio YC (extracto de levadura y colesterol con *K. marxianus*) con una reducción de 14.3 mg/dL de colesterol.

De los tres medios control con colesterol y sin adición de la levadura, en dos de ellos se observó reducción de colesterol respecto a sus niveles iniciales, aunque esta reducción fue menor que los medios a los que se les adicionó la levadura. Estos medios fueron: el medio YPDC (extracto de levadura, peptona, dextrosa y colesterol) con una reducción media de colesterol de 24.3 mg/dL y el medio YC (extracto de levadura y colesterol) con una reducción media de 22.25 mg/dL en sus niveles de colesterol. En los medios control sin colesterol y con adición de la levadura, no se observaron cambios significativos.

Con esto se comprobó que, bajo las condiciones de estudio, *K. marxianus* fue capaz de reducir, significativamente, la concentración de colesterol en todos los medios de cultivo adicionados con la levadura.

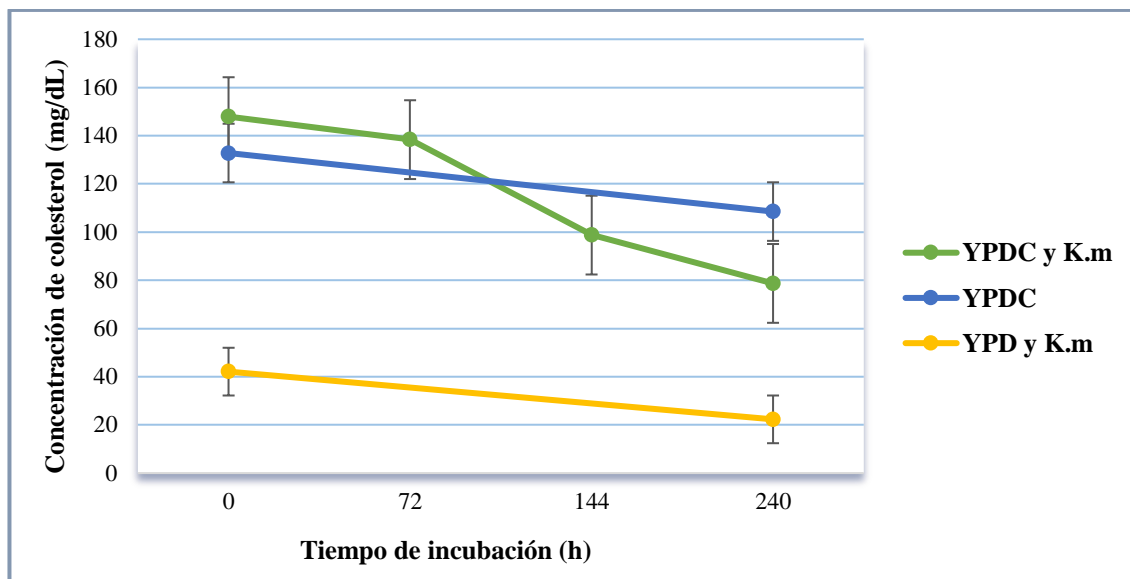


Gráfico 3a. Concentración de colesterol del medio YPD con colesterol y *K. marxianus* y sus respectivos controles, a diferentes tiempos de incubación: 0, 72, 144, 240 h. YPDC y K.m (extracto de levadura, peptona, dextrosa y colesterol con *K. marxianus*), YPDC (extracto de levadura, peptona, dextrosa y colesterol sin *K. marxianus*), YPD y K.m (extracto de levadura, peptona y dextrosa con *K. marxianus*). Los datos obtenidos son presentados con las medias y desviaciones estándar ( $\pm$ DE), n=2.

Se realizó análisis estadístico con prueba de ANOVA seguido de prueba de Tukey, la significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

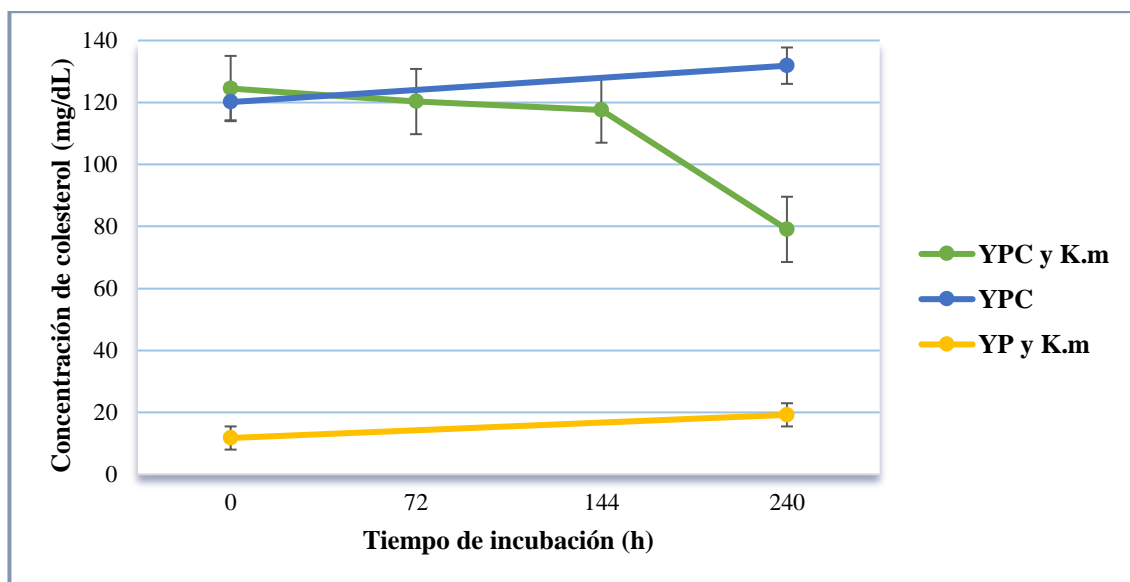


Gráfico 3b. Concentración de colesterol del medio YP con colesterol y *K. marxianus* y sus respectivos controles, a diferentes tiempos de incubación: 0, 72, 144, 240 h. YPC y K.m (extracto de levadura, peptona y colesterol con *K. marxianus*), YPC (extracto de levadura, peptona y colesterol sin *K. marxianus*), YP y K.m (extracto de levadura y peptona con *K. marxianus*).

Los datos obtenidos son presentados con las medias y desviaciones estándar ( $\pm$ DE), n=2. Se realizó análisis estadístico con prueba de ANOVA seguido de prueba de Tukey, la significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

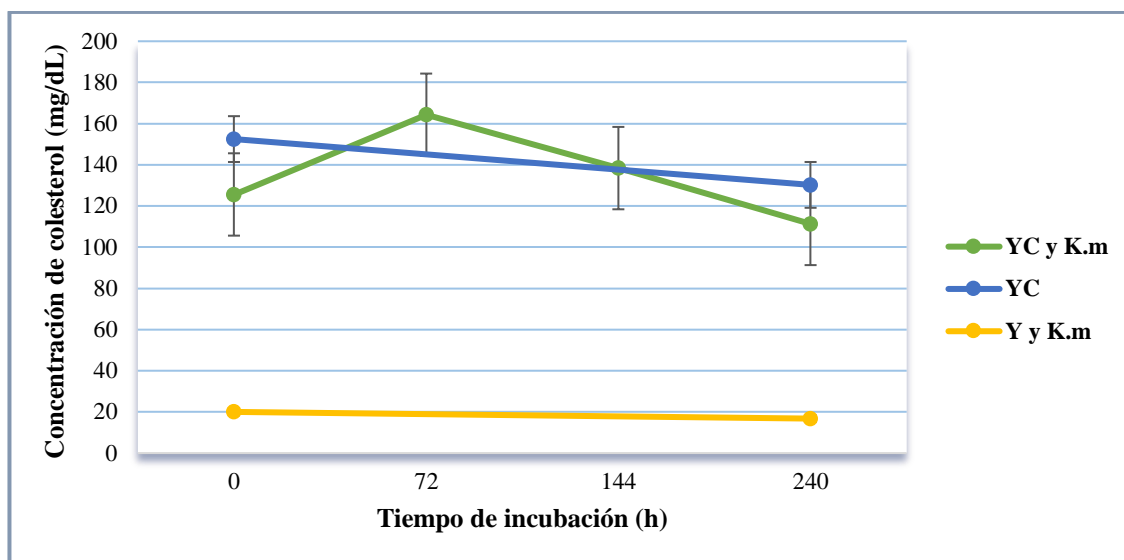


Gráfico 3c. Concentración de colesterol del medio Y con colesterol y *K. marxianus* y sus respectivos controles, a diferentes tiempos de incubación: 0, 72, 144, 240 h. YC y K.m (extracto de levadura y colesterol con *K. marxianus*), YC (extracto de levadura y colesterol sin *K. marxianus*), Y y K.m (extracto de levadura con *K. marxianus*).

Los datos obtenidos son presentados con las medias y desviaciones estándar ( $\pm$  DE),  $n=2$ . Se realizó análisis estadístico con prueba de ANOVA seguido de prueba de Tukey, la significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

### 8.3.5 Concentración de colesterol en sueros humanos con y sin *K. marxianus*

Para evaluar si *K. marxianus* reduce el colesterol en sueros humanos, se llevó a cabo este ensayo con 10 sueros. Se determinó la concentración inicial de colesterol de todas las muestras y posteriormente, se extrajeron dos alícuotas de cada uno de los sueros, las cuales se utilizaron como sueros control (sin adición de la levadura) y sueros con adición de *K. marxianus* ( $6 \times 10^7$  células de levadura), ambas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 6 días.

Los resultados mostraron que, después de 6 días de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , en 9 de los 10 sueros a los que se les adicionó la levadura hubo una reducción media de la concentración de colesterol de 26.28 mg/dL, lo que fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en los sueros sin inoculación de la levadura y sometidos a las mismas condiciones, ya que en éstos sólo hubo una reducción media de 3.59 mg/dL en la concentración de colesterol, lo que no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Con esto se comprueba que, bajo las condiciones de estudio, *K. marxianus* es capaz de reducir, *in vitro*, la concentración de colesterol del suero sanguíneo. Los resultados obtenidos se representan en el gráfico 4.

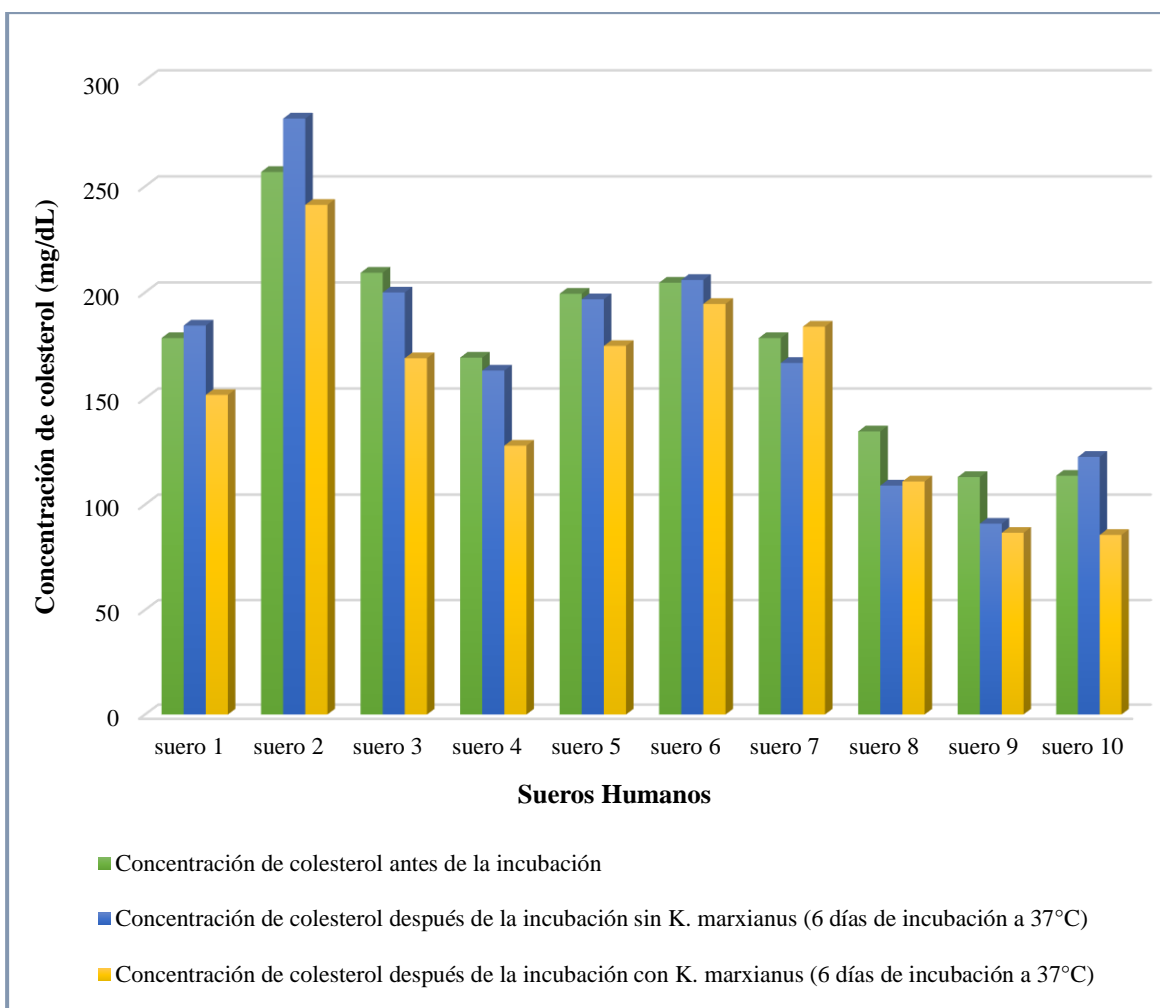


Gráfico 4. Concentración de colesterol en diferentes sueros humanos antes y después de su incubación a 37°C por 6 días, con y sin adición de la levadura *K. marxianus*. Se analizaron 10 sueros humanos diferentes con concentraciones variables de colesterol. Se realizó análisis estadístico con prueba de T de Student, la significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ ,  $n=10$ .

#### 8.4 Formación de biopelícula por *K. marxianus*

Para saber si esta levadura forma biopelícula, se sembró la levadura en agar BHI y rojo congo conforme se describe en el apartado de material y métodos. La figura 9 muestra de manera macroscópica, la formación de biopelícula (halo negro alrededor del crecimiento de la levadura), por lo que se comprueba que *K. marxianus* forma esta matriz polimérica extracelular y puede ser uno de los mecanismos que tiene la levadura para adherirse a la mucosa intestinal y de este modo colonizarla.

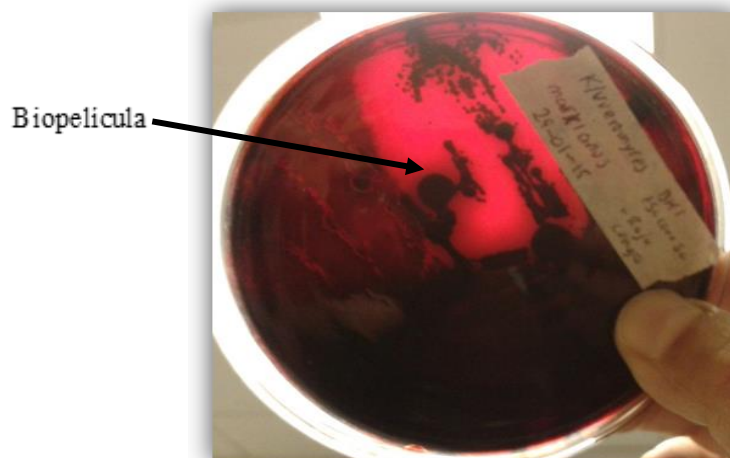


Figura 9. Formación de biopelícula por *K. marxianus* sembrada en agar BHI y rojo congo. La flecha indica la formación de un halo negro (biopelícula) alrededor del crecimiento de la levadura.

### 8.5 Colonización de *K. marxianus* en intestinos extraídos de ratones CD1

Con el propósito de saber si *K. marxianus* coloniza el intestino extraído de ratones CD1, se realizó esta prueba por duplicado, extrayendo el intestino delgado y grueso de los ratones e inoculando la levadura. Los resultados demostraron que, después del tratamiento realizado que incluyó: un periodo de incubación inicial a 37°C durante 72 h con la levadura inoculada en las secciones de intestino, y posteriormente 3 lavados periódicos de las porciones de intestino, cada lavado con un periodo de incubación de 24 h, la levadura permaneció adherida al intestino de los ratones y siguió creciendo, al observarse su presencia en ambas fracciones de intestino durante el tiempo que duró el ensayo (figura 10).

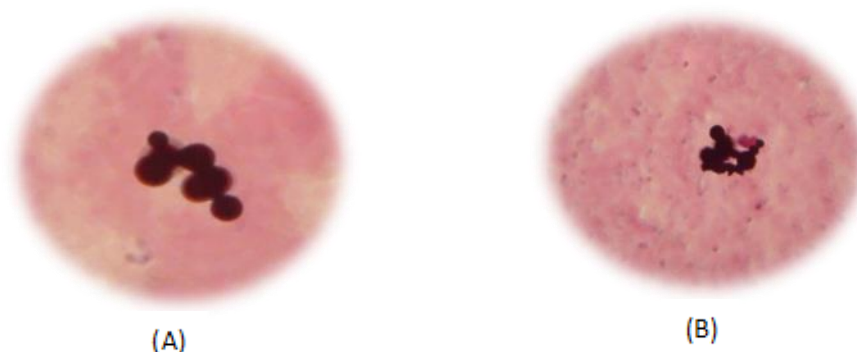


Figura 10. *K. marxianus* en intestino delgado y grueso extraídos de ratón CD1. Se observa la presencia de algunas levaduras en estas porciones del intestino, después de lavados periódicos y su incubación a 37 °C por 6 días. Levadura en intestino delgado (A), levadura en intestino grueso (B). Se utilizó tinción de Gram.

## 8.6 Colonización de *K. marxianus* en ratones CD1 inoculados vía oral con la levadura

A la par que el experimento anterior, se realizó esta prueba con el objetivo de saber si *K. marxianus* tiene la capacidad de colonizar el intestino de los ratones vivos. Se realizó este ensayo mediante la inoculación vía oral de *K. marxianus* por 6 días, como se detalla en el apartado de métodos. Los resultados se muestran en las figuras 11, 12, 13 y 14, en donde se comprueba la presencia *K. marxianus* en el intestino y heces de los ratones sacrificados en diferentes días (a los 2, 4 y 6 días posteriores a la inoculación). Con esto se demuestra la capacidad que tiene esta levadura de colonizar el intestino. Cabe destacar que, la presencia de la levadura fue disminuyendo del primer al último ratón sacrificado.

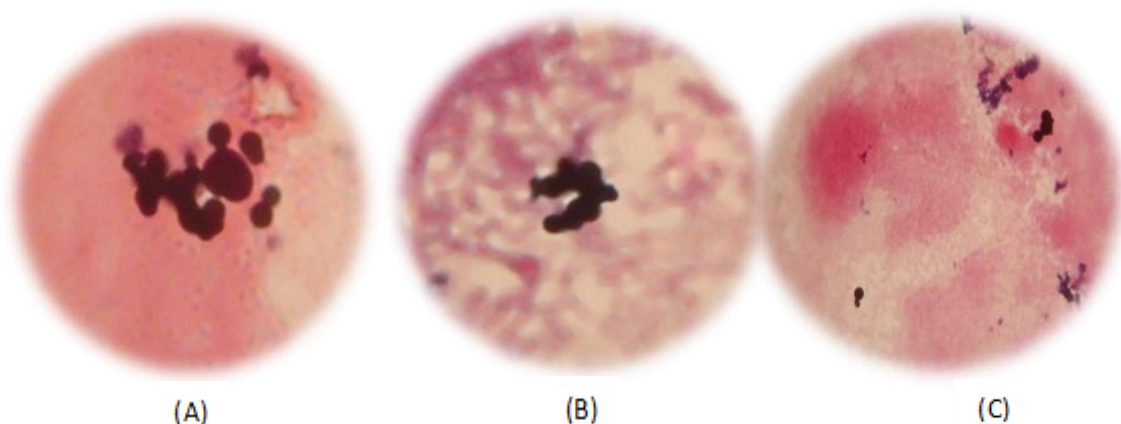


Figura 11. *K. marxianus* en intestino delgado de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días. Se observa la levadura presente en el raspado de intestino delgado de los ratones (sembrado en agar YPD e incubado a 37°C por 24 h), después de ser inoculados con la levadura por 6 días: intestino de ratón

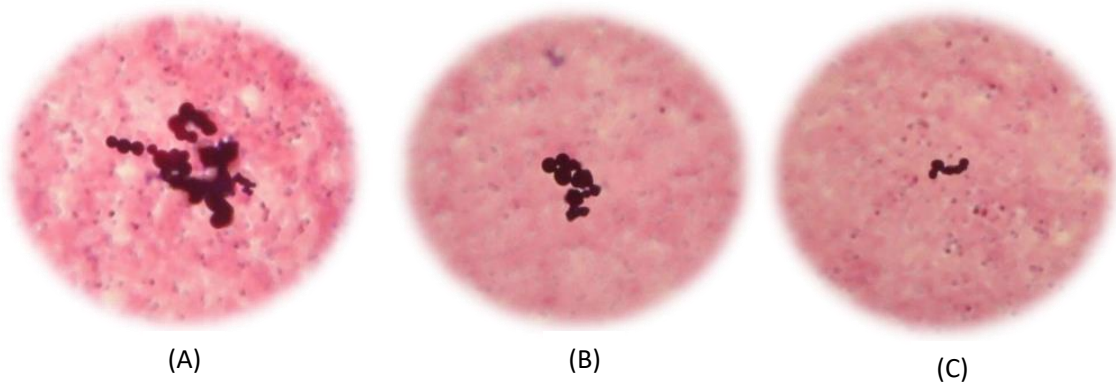


Figura 12. *K. marxianus* en intestino grueso de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días. Se observa la levadura presente en el raspado de intestino grueso de los ratones (sembrado en agar YPD e incubado a 37°C por 24 h), después de ser inoculados con la levadura por 6 días: intestino de ratón sacrificado al día 8 (A), intestino de ratón sacrificado al día 10 (B), intestino de ratón sacrificado al día 12 (C). Se utilizó tinción de Gram.

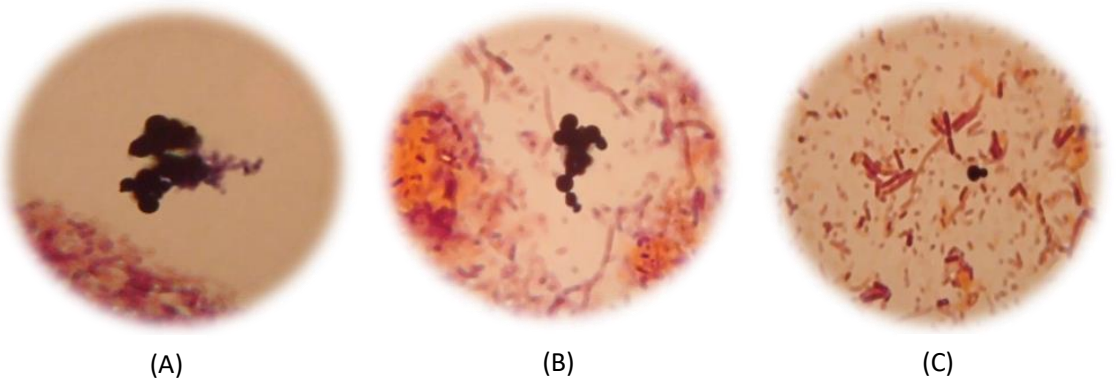


Figura 13. *K. marxianus* en heces de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días y sembradas en agar YPD. Se observa la levadura en las heces sembradas e incubadas a 37°C por 24 h: heces de ratón sacrificado al día 8 (A), heces de ratón sacrificado al día 10 (B), heces de ratón sacrificado al día 12 (C). Se utilizó tinción de Gram.

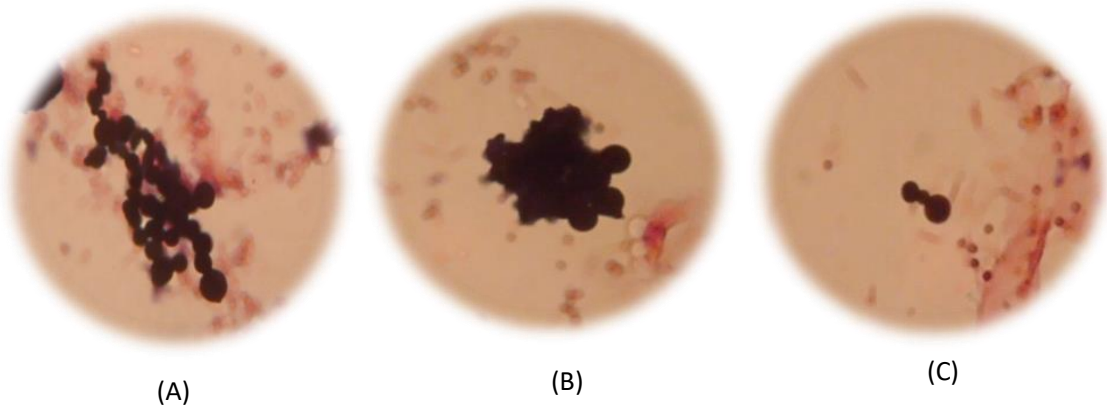


Figura 14. *K. marxianus* en heces frescas de ratones CD1 inoculados con la levadura durante 6 días. Se observa la levadura en: heces frescas de ratón sacrificado al día 8 (A), heces frescas de ratón sacrificado al día 10 (B), heces frescas de ratón sacrificado al día 12 (C). Se utilizó tinción de Gram.



### **8.7 Reducción del colesterol total en suero de ratones CD1 inoculados con la levadura *K. marxianus***

Con la finalidad de conocer si *K. marxianus* es capaz de disminuir los niveles de colesterol sérico en ratones CD1 hembras alimentados con una dieta alta en colesterol, los animales de estudio se dividieron en 3 lotes ( $n=4$ ). Los ratones del lote 1, el cual se denominó como ratones tratados con dieta alta en colesterol y sin inoculación de la levadura *K. marxianus* (RC) y los del lote 2, el cual se denominó como ratones tratados con dieta alta en colesterol y con inoculación de la levadura *K. marxianus* (RCK), se alimentaron con dieta alta en colesterol y sacarosa y el lote 3, el cual se denominó como ratones tratados con dieta normal y sin inoculación de *K. marxianus* (RN), se alimentaron con dieta del bioterio, como se describió previamente en el apartado de material y métodos.

Para verificar, en principio, que el consumo de la dieta alta en colesterol aumentó la concentración de este lípido en la sangre de los roedores, se determinó en los ratones de los distintos lotes, la concentración de colesterol sérico antes de la administración de la dieta y después de 60 días de la misma, mostrando los ratones de los lotes 1 (RC) y 2 (RCK), un aumento de los niveles de colesterol en suero de 72.1 mg/dL y 90.4 mg/dL, respectivamente, en comparación con sus niveles iniciales, aumento significativamente superior ( $p < 0.05$ ) en comparación con el lote tratado con dieta normal (RN), cuya concentración de colesterol aumento sólo 29.8 mg/dL respecto a sus niveles iniciales. Esto indicó que el modelo de ratón con hipercolesterolemia experimental inducida por la dieta había sido establecido.

Posteriormente, para conocer el efecto de *K. marxianus* en los niveles de colesterol sanguíneo, se administró la levadura ( $6 \times 10^7$  células) en forma oral por 10 días a los ratones del lote 2 (RCK) y se determinó nuevamente la concentración de colesterol en el suero de los ratones de los 3 lotes (RC, RCK y RN), observando en el análisis al interior de cada lote, una disminución significativa de colesterol ( $p < 0.05$ ) en los ratones de los grupos RC y RCK.

No obstante, en los ratones del lote RCK, a los cuales se les administró dosis diaria de la levadura por 10 días, se observó una disminución promedio de colesterol de 53.78 mg/dL, la cual fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en el grupo RC tratado sólo con dieta alta en colesterol, cuya disminución fue de 42.07 mg/dL. El grupo RN, alimentado con dieta normal, tuvo una reducción media de colesterol de 35.9 mg/dL, lo cual no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ).

Estos resultados demostraron que, bajo las condiciones de estudio, la levadura *K. marxianus* fue capaz de disminuir el colesterol total de los ratones CD1 hembras con hipercolesterolemia inducida por dieta. Las concentraciones de colesterol total en suero de las diferentes muestras extraídas de los ratones se muestran en la tabla 3 y se representan en el gráfico 5.

**Tabla 3. Concentración media de colesterol de ratones CD1 hembras durante las diferentes fases de experimentación**

| Lotes de ratones | Concentración media de colesterol (mg/dL) |                   |                     |
|------------------|---|-------------------|---------------------|
|                  | 1era. extracción*                         | 2da. Extracción** | 3era. Extracción*** |
| Lote 1 (RC)      | 100.4 ± 9.8                               | 172.5 ± 31.2      | 130.5 ± 12.2        |
| Lote 2 (RCK)     | 100.4 ± 9.8                               | 190.8 ± 16.5      | 137.1 ± 6.4         |
| Lote 3 (RN)      | 100.4 ± 9.8                               | 130.2 ± 30.8      | 94.3 ± 18.7         |

Los datos obtenidos son presentados con las medias y desviaciones estándar ( $\pm$ DE), n=4

\* Concentración inicial de colesterol en suero de ratones.

\*\* Concentración de colesterol sérico después de 60 días de dieta

\*\*\* Concentración de colesterol sérico después de 10 días de inoculación diaria de *K. marxianus* (lote de ratones RCK) y mantenimiento de dieta (los 3 lotes de ratones: RC, RCK y RN).

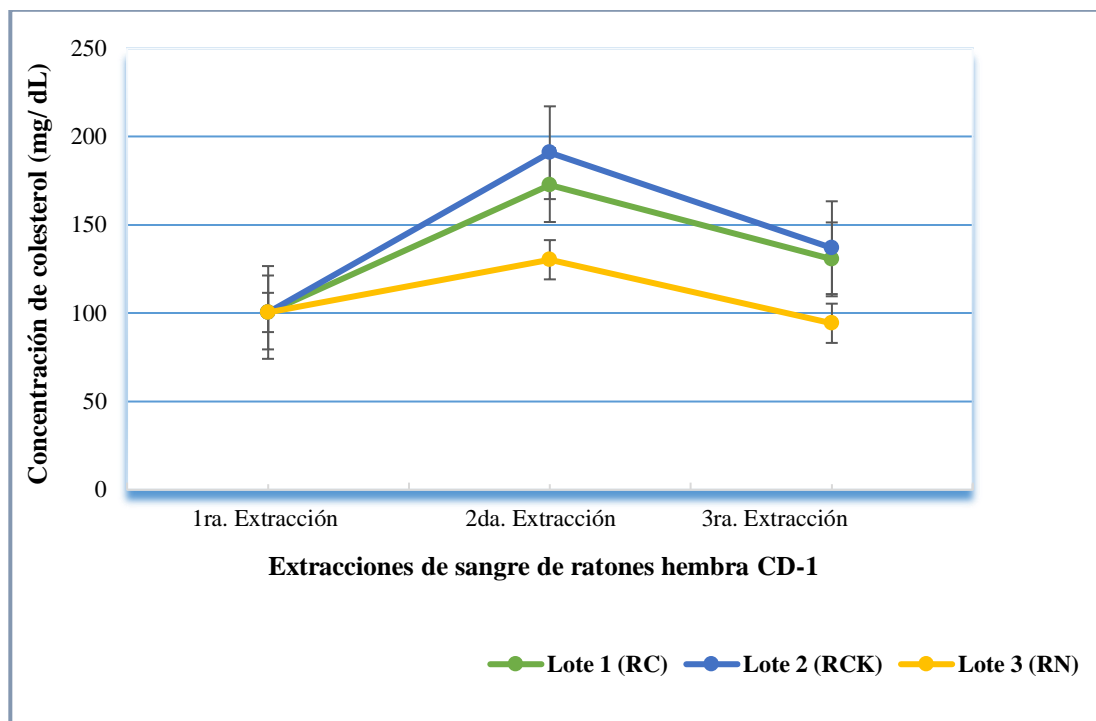


Gráfico 5. Concentración media de colesterol en suero de los ratones de los 3 lotes, durante las diferentes fases del estudio. 1era. Extracción (concentración media de colesterol de los ratones de los 3 lotes al inicio del estudio), 2da. extracción (concentración media de colesterol de los ratones de cada lote después de 60 días de dieta) y 3ra. extracción (concentración media de colesterol de los ratones de cada lote después de 10 días de inoculación con *K. marxianus*- sólo lote 2 (RCK)- y mantenimiento de dieta – lote 1 (RC), lote 2 (RCK) y lote 3 (RN)-).

- RC (ratones con dieta alta en colesterol y sin inoculación de *K. marxianus*)
- RCK (ratones con dieta alta en colesterol e inoculación de *K. marxianus*)
- RN (ratones con dieta normal sin inoculación de *K. marxianus*)

Se realizó análisis estadístico con prueba de ANOVA seguido de prueba de Tukey, la significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ .

Adicionalmente, para corroborar la presencia de la levadura en los ratones hipercolesterolémicos, después del periodo de inoculación con *K. marxianus*, se analizaron microscópicamente el intestino delgado y grueso, así como las heces frescas de los ratones del lote inoculado con la levadura (RCK). Se pudo observar la presencia de *K. marxianus* tanto en heces como en intestinos después de 10 días de haberlos inoculado con la levadura (figura 15), por lo que se pudo comprobar que el efecto en la reducción del colesterol del lote inoculado se debe a la presencia de la levadura en el tracto digestivo de los roedores.

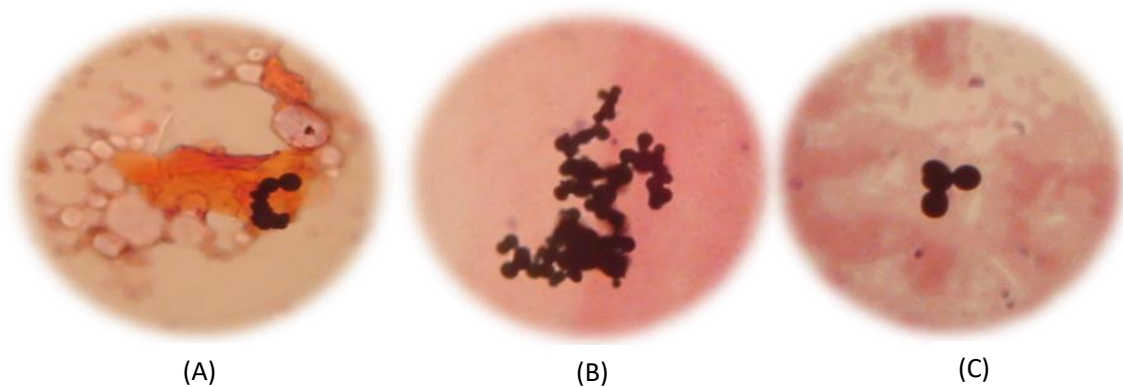


Figura 15. *K. marxianus* presente en intestino delgado, intestino grueso y heces frescas de ratones CD1 hipercolesterolémicos, después de su inoculación con la levadura. Se observa la levadura en: heces frescas (A), así como el raspado de intestino delgado (B) e intestino grueso (C) sembrado en agar YPD e incubado a 37° C durante 24 h. Se utilizó tinción de Gram.

## 9. DISCUSIÓN

El presente estudio fue dirigido a investigar el papel que tiene la levadura *K. marxianus*, aislada del pulque, en la disminución de colesterol en ensayos *in vitro* utilizando medios de cultivo ricos en colesterol y sueros humanos, así como ensayos *in vivo* utilizando ratones CD-1 hembras a los que se les indujo hipercolesterolemia mediante una dieta rica en carbohidratos y colesterol.

En los estudios *in vitro*, uno de los objetivos fue obtener un medio de cultivo rico en colesterol soluble en el medio, para lo cual se utilizó etanol como solvente. Se realizaron previamente pruebas de viabilidad de la levadura a diferentes concentraciones de etanol, demostrando que la levadura es capaz de sobrevivir y crecer a concentraciones de etanol entre 10 y 20%, mientras que a concentraciones por arriba del 20% se inhibe su crecimiento, a pesar de tener otros nutrimentos en el medio. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Cervantes-Contreras *et al* <sup>(114)</sup>, quienes evaluaron, entre otros parámetros, el porcentaje de etanol y la población microbiana de una muestra de pulque del estado de Tlaxcala, México, obteniendo como resultado un porcentaje de etanol, tras 48 horas de fermentación a temperatura ambiente, de 10.35 %. Ante esto, se seleccionó la concentración de etanol a la que la cepa demostró mayor tolerancia, para solubilizar el colesterol.

Además, cabe destacar que, en estas pruebas preliminares se observó que la levadura también utiliza el etanol como sustrato, por lo que se utilizó, para los ensayos *in vitro*, un medio de cultivo control con etanol para observar el comportamiento de la levadura y poder atribuir los resultados obtenidos al colesterol presente en el medio.

Respecto a los resultados obtenidos *in vitro* en la reducción de la concentración de colesterol por *K. marxianus*, se obtuvieron resultados relevantes al observar una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de esta molécula en todos los medios inoculados con la levadura, después de su incubación a 37°C por 10 días, así mismo se observó esta disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de colesterol en los sueros humanos inoculados con *K. marxianus* y sometidos a las mismas condiciones de incubación, por 6 días.

Al respecto, cabe destacar que, al momento, no existen reportes de la actividad *in vitro* de esta especie de levadura, sin embargo, de acuerdo a un estudio realizado por Psomas, *et al* <sup>(115)</sup>, con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* KK1, conocida como una de las principales levaduras con propiedades probióticas, en las que destaca su capacidad para reducir los niveles de colesterol, se encontró que su mecanismo mediante el cual reduce los niveles de esta molécula, en condiciones *in vitro*, es mediante la incorporación de la misma a su membrana celular, confiriéndole mayor resistencia a la membrana y por lo tanto mayor resistencia a la lisis celular ante condiciones adversas del ambiente. Este pudiera ser el mecanismo de reducción de colesterol *in vitro* de *K. marxianus*, ya que *Saccharomyces cerevisiae* es una especie cercana, desde el punto de vista genético, al género *Kluyveromyces*.

En los ensayos *in vivo*, es importante mencionar que, previo a la realización del estudio para observar la capacidad que tiene la cepa de *K. marxianus* de reducir el colesterol total, se realizaron experimentos de colonización de la levadura tanto en ensayos *in vitro*, extrayendo los intestinos delgado y grueso de ratones CD1, como *in vivo*, inoculando la levadura en ratones CD1, con la finalidad de comprobar su capacidad de colonización del intestino. Al respecto, los resultados obtenidos mostraron una alta supervivencia de la cepa estudiada en las porciones de intestino analizadas. Esto se puede deber, en gran medida, a la capacidad observada de *K. marxianus* de formar biopelícula, que se confirma con lo descrito por Mossel *et al* <sup>(44)</sup>, quienes resaltan la capacidad que tienen las levaduras del género *Kluyveromyces*, entre otros géneros de levaduras, de formar biofilms. Además, lo obtenido en este ensayo coincide con lo observado por Diosma, *et al* <sup>(20)</sup>, quienes encontraron que dentro de las 31 cepas que aislaron del kefir, las cepas *K. marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112 mostraron mayor capacidad de adherirse a las células epiteliales intestinales en ensayos *in vitro* y también observaron una mayor capacidad de estas cepas de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal de ratones BALB/c.

En el estudio realizado en los ratones CD-1 hembras se pudo observar una reducción significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) del colesterol sérico en los ratones sometidos a una dieta alta en colesterol e inoculados con la levadura por 10 días, en comparación con los ratones que sólo mantuvieron una dieta rica en colesterol, lo que demuestra el potencial probiótico de *K. marxianus*. No obstante, los mecanismos de acción que tienen los microorganismos probióticos para reducir la concentración de colesterol en animales y humanos, en la actualidad no han sido bien establecidos, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis para explicar algunos resultados obtenidos, de las cuales, gran parte se han establecido en bacterias probióticas.

Una de las hipótesis sugiere que ciertas cepas probióticas tienen la capacidad de asimilar el colesterol de un medio de cultivo en condiciones anaerobias <sup>(39)</sup>, mientras que, en condiciones *in vivo*, se sabe que las bacterias intestinales metabolizan el colesterol exógeno, por lo que reduce la cantidad de colesterol disponible para la absorción <sup>(2)</sup>.

Otro mecanismo propuesto señala que parte del colesterol puede ligarse a la superficie bacteriana celular o incorporarse en las membranas celulares bacterianas <sup>(2)</sup>. Algunas especies de Lactobacilos como *L. acidophilus* poseen receptores sensibles a la proteasa en su superficie celular con el que se unen fuertemente al colesterol y lo incorporan a sus membranas celulares o incluso, es convertido en coprostanol por la colesterol reductasa que es producida por algunas cepas de lactobacilos. Bacterias tales como *Sterolibacterium denitrificans* producen colesterol deshidrogenasa/isomerasa que cataliza la conversión de colesterol a coprostanol que se excreta en las heces <sup>(37)</sup>.

Otra hipótesis se basa en la capacidad que tienen algunos microorganismos probióticos de fermentar carbohidratos no digeribles para producir ácidos grasos de cadena corta en el intestino, lo que puede influir en la síntesis de colesterol hepática y/o en la redistribución de colesterol del plasma para el hígado <sup>(3,37)</sup>, posiblemente por la competición o inhibición de la formación de micelas <sup>(2)</sup>.

Sin embargo, el mecanismo que más se ha propuesto en diversos estudios apunta a la capacidad de ciertas cepas probióticas para desconjugar las sales biliares que se atribuye a la actividad de una enzima producida por estos microorganismos, la hidrolasa de sales biliares (BSH), que hidroliza los enlaces amida entre los ácidos biliares y sus conjugados <sup>(37,39)</sup>.

Los hepatocitos del hígado producen sales biliares a partir del colesterol, esto aumenta el transporte de este lípido a través del epitelio intestinal, produciendo sales biliares conjugadas con glicina, para formar ácido glicocólico o con taurina, para formar ácido taurocólico. Dado que las sales biliares conjugadas son muy solubles, la mayoría de ellas entran en la circulación enterohepática después de la absorción, lo que contribuye a un aumento de colesterol en la sangre <sup>(37)</sup>.

Por lo tanto, los probióticos que sintetizan BSH pueden hidrolizar sales biliares conjugadas, en el área donde colonizan, para liberar los ácidos biliares primarios libres que son menos solubles y, por consiguiente, se reabsorben con menor eficiencia en la luz intestinal, lo que evitaría la reabsorción del colesterol de las sales biliares, excretándose en las heces <sup>(3,95)</sup>. Además se propone que el eventual aumento de las pérdidas fecales de sales biliares conduciría a un aumento compensatorio de su síntesis hepática a partir del colesterol <sup>(37,39,95)</sup>. Todo esto se reflejaría en una reducción de los niveles de colesterol en la sangre. Ante esto, se ha sugerido que la actividad BSH debería ser un requisito en la selección de organismos probióticos con propiedades reductoras del colesterol <sup>(95)</sup>.

*K. marxianus* pudiera tener este mecanismo para reducir el colesterol *in vivo*, ya que en estudios realizados en la cepa de *K. marxianus* M3 aislada de hongos tibetanos se clonó el gen de la enzima BSH (GenBank adhesión: JQ247427.1) y posteriormente, se estudiaron los efectos de esta misma cepa en el colesterol total, TG, HDL y LDL, en suero e hígado de ratas Wistar hembras con hiperlipidemia inducida por dieta, obteniendo como resultado una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) del colesterol total, TG, LDL y del índice aterogénico en suero e hígado, en las ratas inoculadas con la cepa de *K. marxianus* M3 por vía oral, además, se observó un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de los niveles de HDL y el índice contra aterogénico en comparación con el grupo control <sup>(111)</sup>. Esta hipótesis se puede reforzar con la capacidad natural para excretar enzimas que se ha encontrado en esta especie de levadura <sup>(46)</sup>.



No obstante, es conveniente mencionar que *K. marxianus* se ha aislado de una gran variedad de hábitats y por lo tanto su diversidad metabólica es amplia <sup>(46)</sup>. Ante esto, se plantea la realización de estudios específicos en la cepa estudiada que puedan confirmar los mecanismos propuestos por otros investigadores que han estudiado otras cepas de la levadura.

Adicionalmente, se destaca la importancia de realizar estudios más profundos de heces fecales de los animales de experimentación con la finalidad de encontrar la posible vía por la que esta cepa de *K. marxianus* disminuye el colesterol, como lo realizado por Guo y Li <sup>(108)</sup>, quienes evaluaron la presencia de esteroides neutros fecales (colesterol, coprostanol y coprostanona) y de ácidos biliares fecales, en ratas hipercolesterolémicas a las que se les administró *Lactobacillus casei* F0822.

Así mismo, es relevante mencionar que, si bien se ha estudiado ampliamente el potencial hipocolesterolémico de los probióticos, todavía no se han establecido dosis adecuadas de administración de estos microorganismos. En la actualidad hay muy pocos estudios sobre dosis-respuesta de los probióticos para determinar la dosis mínima efectiva de probióticos necesarios para reducir los niveles de colesterol en sangre. En algunos estudios realizados se ha observado que las dosis efectivas de probióticos varían mucho y depende de las cepas usadas, además de las condiciones clínicas de cada animal o individuo de estudio, como lo son sus perfiles lipídicos. Por lo tanto, la dosis clínicamente eficaz de los probióticos para los seres humanos se debe establecer en base a estudios de la cepa específica <sup>(109)</sup>.

Finalmente, aunque se requieren estudios más profundos con la cepa estudiada, es fundamental considerar el potencial probiótico de las levaduras en la disminución del colesterol plasmático y, en un futuro cercano, considerarlas como una alternativa para pacientes con reacciones alérgicas a los compuestos de medicamentos hipolipemiantes, aunado a que se evitan los efectos adversos que estos pudieran tener, además de los beneficios al reducir la incidencia de enfermedad cardiovascular y, en específico, la enfermedad cardíaca coronaria que en la actualidad representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial.

## 10. CONCLUSIONES

- La hidrosolubilidad del colesterol, así como el crecimiento de la levadura, es mayor a concentraciones de 10 y 20 % de etanol.
- En los ensayos *in vitro*, se observó que la levadura sí utiliza el colesterol, aunque tiene un periodo de adaptación mayor que en el medio YPD, el cual es el medio de cultivo seleccionado para el crecimiento de levaduras. La reducción de las concentraciones de colesterol en medios ricos con esta molécula, al inocularles la levadura *K. marxianus*, habla de la capacidad de esta cepa para disminuir el colesterol.
- La levadura permanece por más de 6 días en el intestino de los ratones inoculados, lo que demuestra la gran capacidad de colonización de la levadura y, por ende, sus posibles efectos positivos a largo plazo.
- *K.marxianus* redujo, significativamente ( $p < 0.05$ ), los niveles de colesterol en medios de cultivo adicionados con esta molécula y en sueros humanos, en comparación con sus respectivos controles.
- Se obtuvo un modelo de ratón con hipercolesterolemia inducida por dieta, al observarse, después de 60 días con alimentación alta en colesterol, un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles séricos de colesterol en los 2 grupos tratados, con un aumento de las concentraciones de esta molécula de 72.1 y 90.4 mg/dL respecto a sus niveles iniciales, en comparación con el grupo tratado con dieta normal, cuyo aumento fue de 29.8 mg/dL de colesterol sérico, respecto a sus niveles iniciales.
- Los ratones hembra con hipercolesterolemia inducida por dieta e inoculados con la levadura *K. marxianus* por 10 días tuvieron una reducción media de colesterol sérico de 53.78 mg/dL, nivel de reducción significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que los grupos de ratones hembra tratados con dieta alta en colesterol y con dieta normal, que no fueron inoculados con la levadura.

## 11. RECOMENDACIONES

- Con el propósito de mantener las propiedades de la cepa de la levadura, se considera importante hacer pases periódicos de la misma.
- Es importante mencionar que, aunque se observó la formación de biopelícula por la levadura *K. marxianus* en el medio de cultivo, este ensayo fue de manera cualitativa, por lo que se considera importante realizar ensayos de manera cuantitativa y a diferentes rangos de pH, propios del ambiente gastrointestinal, con la finalidad de conocer que capacidad tiene la cepa analizada de formar biofilm y como interviene el pH en la adhesión y por lo tanto en la colonización de la levadura en el intestino, aspecto importante para considerarla como un buen microorganismo probiótico.
- Se recomienda realizar estudios de sonicación, con el objetivo de verificar si la levadura incorpora el colesterol a su membrana, alterando su estructura y dándole mayor resistencia a condiciones de estrés tal como la lisis celular generada por este método.
- Se plantea la realización de estudios de la actividad de la enzima BSH de la cepa estudiada, así como de esteroides fecales en animales de experimentación inoculados con la levadura, con el fin de explicar el mecanismo de acción por el cual la cepa disminuye el colesterol.
- Para los ensayos *in vivo* con animales de experimentación, se sugiere evaluar, en estudios posteriores, el uso de dosis variables de *K. marxianus* durante períodos de tiempo más largos, para conocer la dosis efectiva y segura de la esta cepa en específico, así como su potencial probiótico a largo plazo.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chrispin J, Martin SS, Hasan RK, Joshi PH, Minder CM, McEvoy JW, et al. Landmark lipid-lowering trials in the primary prevention of cardiovascular disease. *Clin Cardiol*. 2013;36(9):516–23.
2. Maldonado O, Ramírez I, García J, Ceballos G, Méndez E. Colesterol : función biológica e implicaciones médicas. *Rev Mex Cienc Farm*. 2012;43(2):7–22.
3. Alhaj OA, Kanekanian AD, Peters AC, Tatham AS. Hypocholesterolaemic effect of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (Bb12) and trypsin casein hydrolysate. *Food Chem*. 2010;123(2):430–5.
4. Remagni MC, Paladino M, Locci F, Romeo FV, Zago M, Povo M, et al. Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia Microbiol (Praha)*. 2013;58(6):443–9.
5. Sistema Nacional de vigilancia epidemiología, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2008. México: SINAVE/DGE/SALUD; 2011.
6. Zhang F, Hang X, Fan X, Li G, Yang H. Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. *Anaerobe*. 2007;13(5-6):185–92.
7. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(2):300–10.
8. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):361S–364S.
9. Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, et al. Current level of consensus on probiotic science--report of an expert meeting--London, 23 November 2009. *Gut Microbes*. 2010;1(6):436–9.

10. Szajewska H, Wanke M, Patro B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(9):1079–87.
11. Aggarwal J, Swami G, Kumar M. Probiotics and their effects on metabolic diseases: an update. *J Clin Diagnostic Res.* 2013;7(1):173–7.
12. Mazloom Z, Yousefinejad A, Dabbaghmanesh MH. Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: a clinical trial. *Iran J Med Sci.* 2013;38(1):38–43.
13. De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(2):405–11.
14. Moreno Y, Hernández M, Collado MC, Hernández E. Aplicación de fluorocromos para el estudio de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en productos lácteos. *Ars Pharm.* 2000;41(3):287–92.
15. Shin HS, Lee JH, Pestka JJ, Ustunol Z. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *J Food Prot.* 2000;63(3):327–31.
16. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.* 2012;3:421.
17. Moslehi-Jenabian S, Pedersen LL, Jespersen L. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients.* 2010;2:449–73.
18. Arellano-Barragán J, Quicaña-Rodríguez M, Flores-Abad M, Obeso-Villazón C. Actividad de la B-galactosidasa en células de *Kluyveromyces Sp.* permeabilizadas con etanol a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos. *Sciéndo.* 2012;15(1):43–51.
19. Girard P, Pansart Y, Verleye M. Anti-hypercholesterolemic effect of *Saccharomyces boulardii* in the hamster. *Pharmacology.* 2014;94(5-6):239–44.

20. Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(1):43–53.
21. Estrada-Godina AR, Cruz-Guerrero AE, Lappe P, Ulloa M, García-Garibay M, Gómez-Ruiz L. Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World J Microbiol Biotechnol.* 2001;17(6):557–60.
22. Magalhães KT, de M Pereira GV, Dias DR, Schwan RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26(7):1241–50.
23. Escalante A, Rodríguez ME, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;235(2):273–9.
24. Molina MT, Vázquez CM, Ruiz Gutiérrez V. Metabolismo del colesterol. Su regulación a nivel hepático e intestinal. *Grasas Aceites.* 1991;42(4):298–308.
25. Tudela V. El colesterol: lo bueno y lo malo. 4a ed. México: FCE, SEP, CONACyT; 2008. p.80.
26. Corral P, Blanco GH, Waitz AM. El colesterol y sus valores. Cuando “normal” no es lo “fisiológico”. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2012; 41(3): 161-4.
27. Kapourchali FR, Surendiran G, Goulet A, Moghadasian MH. The role of dietary cholesterol in lipoprotein metabolism and related metabolic abnormalities: a mini-review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* De próxima aparición 2016.
28. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly, PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper *Bioquímica ilustrada.* 29a ed. México: Mc Graw Hill; 2013. p. 253.
29. Méndez N, Uribe M. Inhibición de la absorción intestinal de colesterol. Una nueva estrategia para el tratamiento médico de la litiasis biliar de colesterol. *Med Univ.* 2008;10(41):230–4.

30. Ferrebee CB, Dawson PA. Metabolic effects of intestinal absorption and enterohepatic cycling of bile acids. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(2):129–34.
31. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 5a ed. Barcelona: Omega; 2009. p. 805-850.
32. Errico TL, Chen X, Martin JM, Julve J, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clínica e Investig en Arterioscler*. 2013;25(2):98–103.
33. Carvajal C. Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. Revisión bibliográfica. *Med Leg Costa Rica*. 2014;31(2):829–37.
34. Campbell MK, Farrell SO. *Bioquímica*. 6a ed. México:Cengage Learning; 2010. p. 822.
35. Alphonse PA, Jones PJ. Revisiting human cholesterol synthesis and absorption: the reciprocity paradigm and its key regulators. *Lipids*. 2016;51(5):519-36.
36. Aguilar CA, Gómez FJ, Lerman I, Vázquez C, Pérez Ó, Posadas C. Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias: posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. *Rev Endocrinol y Nutr*. 2004;12(1):7–41.
37. Daliri EB-M, Lee BH. New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Sci Hum Wellness*. 2015;4(2):56–65.
38. Ghosh AR. Appraisal of probiotics and prebiotics in gastrointestinal infections. *WebmedCentral Gastroenterol*. 2012;3(10):1–27.
39. Dalto P, Takehara NA. Efecto de los probióticos sobre el colesterol plasmático. Ensayo clínico controlado aleatorizado. *Diaeta*. 2012;30(139):11–7.
40. Contreras-Leal E, Santiago-García J. Obesidad, síndrome metabólico y su impacto en las enfermedades cardiovasculares. *Rev Biomed*. 2011;22(3):103–15.

41. Martens GW, Arian MC, Lee J, Ren F, Vallerkog T, Kornfeld H. Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis. *Infect Immun*. 2008;76(8):3464–72.
42. Chen Z-Y, Ma KY, Liang Y, Peng C, Zuo Y. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *J Funct Foods*. 2011;3(2):61–9.
43. Pelton K, Krieder J, Joiner D, Freeman MR, Goldstein SA, Solomon KR. Hypercholesterolemia promotes an osteoporotic phenotype. *Am J Pathol*. 2012;181(3):928–36.
44. Mossel D, Moreno B, Struijk C. Microbiología de los alimentos. 2a ed. España: Acirbia; 2006.
45. Yousef A, Carlstrom C. Microbiología de Alimentos. Manual de laboratorio. México: Limusa; 2006.
46. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;79(3):339–54.
47. Lane MM, Burke N, Karreman R, Wolfe KH, O'Byrne CP, Morrissey JP. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;100(4):507–19.
48. Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, Suzuki Y, Rodrussamee N, Matsutani M, *et al*. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8(1):47.
49. Yépez BO, Converti A, Maugeri F. Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balances. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44(4):479–83.



50. Bender JP, Mazutti MA, de Oliveira D, Di Luccio M, Treichel H. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 2006;129-132:951–8.
51. Ray B, Bhunia A. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2010.
52. Parrondo J, García LA, Díaz M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. Brazilian J Chem Eng. 2009;26(3):445–56.
53. Raimondi S, Zanni E, Amaretti A, Palleschi C, Uccelletti D, Rossi M. Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. Microb Cell Fact. 2013;12:1–7.
54. Camacho MI, Serrat M de J, Orberá T, Rodríguez S. Evaluación de dos métodos de conservación para *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 en la colección de cultivos del CEBI. Rev la Soc Venez Microbiol. 2014;34:91–6.
55. Montiel X, Carruyo I, Marcano L, Mavárez M. Optimización del proceso de extracción de lactasa de *Kluyveromyces marxianus* ATTC 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea. Rev Científ FCV-LUZ. 2005;15(5):476–82.
56. Araujo K, Chávez A, Chávez S, Páez G, Mármol Z, Rincón M. Extracción de la  $\beta$ -D-galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 en lactosuero diluido. Afinidad. 2010;67(546):143–8.
57. Cori de Mendoza ME, Rivas N, Dorta B, Pacheco de Delahaye E, Bertsch A. Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* cultivada en suero lácteo desproteinizado. Rev Científ FCV-LUZ. 2006;16(3):315–24.
58. Jain SC, Jain PC, Kango N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. Braz J Microbiol. 2012;43(1):62–9.

59. Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, *et al.* Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol.* 2012;154(3):87–97.
60. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 1965;147(3659):747–8.
61. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989;66(5):365–78.
62. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998;39(3):237–8.
63. Sanz Y, Collado MC, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediatr Esp.* 2003;61(9):476–82.
64. Guarner F, Requena T, Marcos A. Consensus statements from the Workshop “Probiotics and Health: Scientific evidence”. *Nutr Hosp.* 25(5):700–4.
65. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma, Italia: FAO/OMS; 2006. Estudio FAO Alimentación y Nutrición: 85.
66. Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;50(1):1–16.
67. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(6):679–92.
68. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev.* 1992;50(12):438–46.
69. Tannock G, Munro K, Harmsen H, Welling G, Smart J, Gopal P. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(6):2578–88.
70. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(1):1–6.

71. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;91(1):6–21.
72. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(6):G807–19.
73. Werner T, Haller D. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res*. 2007;622(1-2):42–57.
74. Smelt MJ, de Haan BJ, Bron PA, van Swam I, Meijerink M, Wells JM, *et al*. The impact of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 teichoic acid D-alanylation on the generation of effector and regulatory T-cells in healthy mice. *PLoS One*. 2013;8(4):e63099.
75. Meijerink M, Wells JM. Probiotic modulation of dendritic cells and T cell responses in the intestine. *Benef Microbes*. 2010;1(4):317–26.
76. Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(7):938–56.
77. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, *et al*. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med*. 2007;13(1):35–7.
78. Amara AA, Shibl A. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J*. 2015;23(2):107–14.
79. Thomson AB, Chopra A, Clandinin MT, Freeman H. Recent advances in small bowel diseases: Part I. *World J Gastroenterol*. 2012;18(26):3336–52.
80. Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45 Suppl:S149–53.
81. Ouwehand AC. Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr*. 2007;137(3 Suppl 2):794S – 7S.

82. Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutr Cancer*. 2012;64(6):871–8.
83. Maroof H, Hassan ZM, Mobarez AM, Mohamadabadi MA. *Lactobacillus acidophilus* could modulate the immune response against breast cancer in murine model. *J Clin Immunol*. 2012;32(6):1353–9.
84. Baryshnikova NV. Helicobacter pylori-associated gastroenterological diseases: genetic features and probiotic treatment. *Benef Microbes*. 2012;3(2):157–61.
85. Liu LW. Chronic constipation: current treatment options. *Can J Gastroenterol*. 2011;25 Suppl B:22B – 28B.
86. Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N, *et al*. Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J Dermatol Sci*. 2012;67(2):130–9.
87. Lamberti C, Mangiapane E, Pessione A, Mazzoli R, Giunta C, Pessione E. Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomics*. 2011;11(11):2212–21.
88. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients*. 2011;3(12):118–34.
89. Reid G. The growth potential for dairy probiotics. *Int Dairy J*. 2015;49:16–22.
90. Rubio A, Hernández M, Aguirre A, Poutou R. Identificación preliminar *in vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Rev MVZ Cordoba*. 2008;13(1):1157–69.
91. Otero MA, Guerrero I, Wagner JR, Cabello AJ, Sceni P, García R, *et al*. Yeast and its derivatives as ingredients in the food industry. *Biotechnol Apl*. 2011; 28(4):272-75.

92. Živković M, Čadež N, Uroić K, Miljković M, Tolinački M, Doušova P, *et al.* Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2015;4(1):12–8.
93. Maccaferri S, Klinder A, Brigidi P, Cavina P, Costabile A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(4):956–64.
94. Mendoza AS. Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico [Tesis]. Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Medicina; 2013.
95. Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, *et al.* Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:902917.
96. Gulati M, Merz CN. New cholesterol guidelines and primary prevention in women. *Trends Cardiovasc Med.* 2015;25(2):84–94.
97. Russo A, Barreira de Aguiar G, Rezende A, Tomaz de Sousa FT, Chiara M. Statins in acute coronary syndromes. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(4):350–6.
98. Spalvieri MP, Oyola ME. Estatinas: incidencia de efectos adversos. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 2011;45(4):727–38.
99. Kuda T, Yazaki T, Ono M, Takahashi H, Kimura B. *In vitro* cholesterol-lowering properties of *Lactobacillus plantarum* AN6 isolated from aji-narezushi. *Lett Appl Microbiol.* 2013;57(3):187–92.
100. Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr.* 1974;27(5):464–9.
101. Huang Y, Wang X, Wang J, Wu F, Sui Y, Yang L, *et al.* *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *J Dairy Sci.* 2013;96(5):2746–53.

102. Tomaro-Duchesneau C, Jones ML, Shah D, Jain P, Saha S, Prakash S. Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an *in vitro* investigation. Biomed Res Int. 2014;2014:380316.
103. Madani G, Mirlohi M, Yahay M, Hassanzadeh A. How much *in vitro* cholesterol reducing activity of *lactobacilli* predicts their *in vivo* cholesterol function?. Int J Prev Med. 2013;4(4):404–13.
104. Wang J, Zhang H, Chen X, Chen Y, Menghebilige, Bao Q. Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. J Dairy Sci. 2012;95(4):1645–54.
105. Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;84(2):341–7.
106. Xie N, Cui Y, Yin Y-N, Zhao X, Yang J-W, Wang Z-G, *et al.* Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. BMC Complement Altern Med. 2011;11(1):1-11.
107. Fazeli H, Moshtaghian J, Mirlohi M, Shirzadi M. Reduction in serum lipid parameters by incorporation of a native strain of *Lactobacillus plantarum* A7 in mice. Iran J Diabetes Lipid Disord. 2010;9:1–7.
108. Guo CF, Li JY. Hypocholesterolaemic action of *Lactobacillus casei* F0822 in rats fed a cholesterol-enriched diet. Int Dairy J. 2013;32(2):144–9.
109. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. Int J Mol Sci. 2010;11(6):2499–522.
110. Ataie-Jafari A, Larijani B, Alavi Majd H, Tahbaz F. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. Ann Nutr Metab. 2009;54(1):22–7.

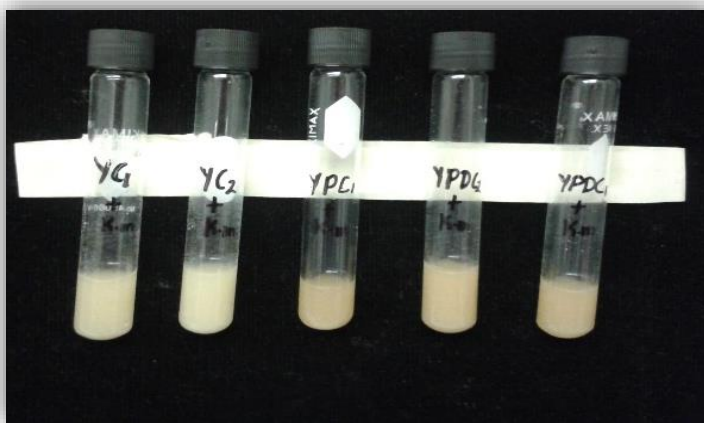
111. Xie Y, Zhang H, Liu H, Xiong L, Gao X, Jia H, *et al.* Hypocholesterolemic effects of *Kluyveromyces marxianus* M3 isolated from Tibetan mushrooms on diet-induced hypercholesterolemia in rat. *Braz J Microbiol.* 2015;46(2):389–95.
112. Yoshida Y, Yokoi W, Wada Y, Ohishi K, Ito M, Sawada H. Potent hypocholesterolemic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 in rats fed a high cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(6):1185–92.
113. Yoshida Y, Yokoi W, Ohishi K, Ito M, Naito E, Sawada H. Effects of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(4):714–23.
114. Cervantes-Contreras M, Pedroza-Rodríguez AM. El pulque : características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA.* 2007;5(8):135–46.
115. Psomas EI, Fletouris DJ, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and Feta cheese. *J Dairy Sci.* 2003;86(11):3416–22.

## 13. ANEXOS

### Anexo 1: Medios de cultivo problema y control utilizados en ensayos *in vitro*

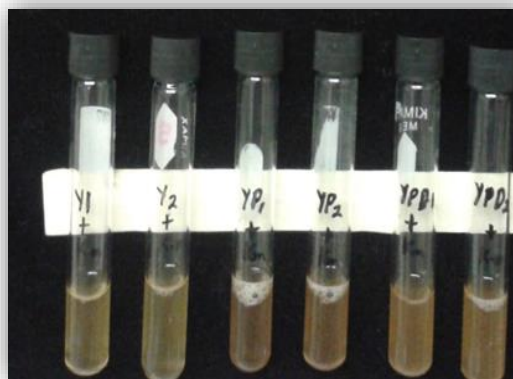
#### MEDIOS PROBLEMA:

Medios de cultivo con colesterol e inóculo de la levadura *K. marxianus*



#### MEDIOS CONTROL:

Medios de cultivo con colesterol y sin inóculo de la levadura *K. marxianus* (figura de la izquierda) y medios de cultivo sin colesterol y con inóculo de la levadura *K. marxianus* (figura de la derecha)





**Anexo 2: Técnica de inoculación de la levadura *K. marxianus* a ratones CD1 por vía intragástrica usando cánula curva de acero inoxidable.**



**Anexo 3: Lotes de ratones CD1 hembras utilizados para ensayos de efecto de la levadura *K. marxianus* en los niveles de colesterol sérico.**



**Anexo 4: Imágenes de la técnica de extracción de sangre empleada en ratones CD1.**

